

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jakub Hlávka

Vliv environmentálních faktorů na mezenchymální kmenové buňky

The effect of environmental factors on mesenchymal stem cells

Bakalářská práce

Školitelka: doc. RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Praha, 2024

Poděkování

Chtěl bych poděkovat především své školitelce doc. RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D. za její podporu, trpělivost a rychlou odezvu během psaní této práce. Dále bych rád poděkoval své rodině a kamarádům za jejich podporu.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto práci zpracoval samostatně a uvedl veškeré použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 29. 4. 2024

Jakub Hlávka

Abstrakt

Mezenchymální kmenové buňky (MSCs) mají potenciál být cenným terapeutickým nástrojem díky jejich diferenciací a imunomodulačním schopnostem. Avšak pro zajištění jejich účinnosti v klinických aplikacích, je nutné porozumět faktorům ovlivňujících jejich vlastnosti. Tato bakalářská práce se zabývá vlivem faktorů prostředí, včetně fyzické aktivity, teploty a světla, na funkčnost MSCs. Dále popisuje základní mechanismy, které se podílejí na působení těchto faktorů. Nakonec hodnotí teoretické důsledky využívání faktorů prostředí ke zlepšení vlastností MSCs. Pro optimalizaci jejich terapeutického potenciálu a rozvoj strategií regenerativní medicíny je nezbytné porozumět vlivu environmentálních faktorů na chování MSCs.

Klíčová slova: mezenchymální kmenové buňky, environmentální faktory, fyzická aktivita, teplota, světlo

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) have the potential to be a valuable therapeutic tool due to their capacity for differentiation and immunomodulation. However, in order to ensure their efficacy in clinical applications, it is necessary to gain a comprehensive understanding of the factors influencing their properties. This bachelor thesis investigates the influence of environmental factors, including physical activity, temperature and light exposure, on MSCs functionality. Additionally it describes the underlying mechanisms involved in the action of these factors. Finally, it evaluates the theoretical implications of exploiting environmental cues to enhance MSCs properties. An understanding of how environmental conditions shape MSCs behavior is essential for optimising their therapeutic potential and advancing regenerative medicine strategies.

Key words: mesenchymal stem cells, environmental factors, physical activity, temperature, light

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Základní epigenetické mechanismy ovlivňující vlastnosti MSCs.....	2
2.1	Metylace DNA	2
2.2	Modifikace histonů.....	3
2.2.1	Acetylace histonů	3
2.2.2	Metylace histonů	4
2.3	Modifikace pomocí nekódujících RNA	4
3	Vliv fyzické aktivity.....	4
3.1	Zlepšení vlastností MSCs po fyzické aktivitě myši na běžícím pásu	5
3.2	Mechanismy zahrnující protein SIRT1	6
3.2.1	Spuštění antioxidantních reakcí aktivací signální dráhy AMPK-SIRT1.....	6
3.2.2	Regulace autofagie prostřednictvím SIRT1	6
3.3	Podpora osteogeneze epigenetickou regulací signální dráhy Hedgehog.....	7
3.4	Role miRNA v diferenciaci MSCs po fyzické aktivitě	7
3.5	Ovlivnění genové exprese prostřednictvím komponent cytoskeletu.....	8
3.6	Vliv cvičení na migrační aktivitu MSCs	9
4	Vliv teploty.....	9
4.1	Vliv teploty na diferenciaci MSCs	10
4.2	Protinádorové účinky MSCs indukované hypertermií	11
4.3	Vliv teploty na protizánětlivé účinky MSCs	11
4.4	Vliv teploty na antioxidantní účinky MSCs	12
5	Vliv světelného záření.....	13
5.1	Modulace proliferace MSCs pomocí světelného záření.....	14
5.2	Vliv světla na diferenciaci MSCs.....	15
5.3	Účinek fotobiomodulace na „omlazení“ MSCs	16
5.4	Ovlivnění migrace MSCs pomocí světelného záření	16

5.5	Protizánětlivé účinky zajištěné fotobiomodulací	17
6	Závěr.....	18
7	Seznam použité literatury	22

Seznam použitých zkratek

MSCs	mesenchymal stem cells (mezenchymální kmenové buňky)
CD	cluster of differentiation (diferenciační skupina)
BMSCs	bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs izolované z kostní dřevě)
UCMSCs	umbilical cord derived mesenchymal stem cells (MSCs izolované z pupečníku)
miRNA	micro RNA (mikro RNA)
ALP	alkaline phosphatase (alkalická fosfatáza)
AMSCs	adipose tissue derived mesenchymal stem cells (MSCs izolované z tukové tkáně)
ROS	reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)
SIRT1	sirtuin 1
IL	interleukin
HSP	heat shock protein (protein teplotního šoku)
LPS	lipopolysacharid
VD	vlnová délka
LED	light-emitting diode (elektroluminiscenční dioda)
NIR	near infra red (záření o vlnových délkách blízkých infračerveným)
ATP	adenosine triphosphate (adenosintrifosfát)
cAMP	cyclic adenosine monophosphate (cyklický adenosinmonofosfát)
NF- κ B	nukleární faktor kappa B

1 Úvod

Mezenchymální kmenové buňky (MSCs – mesenchymal stem cells) jsou jedním z mnoha typů kmenových buněk. Vzhledem k neucelené charakterizaci těchto buněk, zejména kvůli odlišným izolačním a kultivačním metodám, byla v roce 2006 společností International Society for Cellular Therapy navržena minimální kritéria pro definování MSCs. Mezi tato kritéria se řadí adheze buněk k plastovému povrchu, dále jejich multipotentní diferenciací potenciál, tedy schopnost se diferencovat v osteocyty, chondrocyty a adipocyty. Třetím kritériem je pak přítomnost vybraných povrchových markerů, tedy diferenciací skupin (CD – cluster of differentiation) CD73, CD90 a CD105, a naopak absence hematopoetických povrchových markerů, jako jsou CD34, CD45, CD14 / CD11b, CD79 α / CD19 a molekul hlavního histokompatibilního systému (Dominici et al., 2006). Vzhledem k tomu, že kombinace povrchových markerů se může lišit při izolaci buněk z různých živočichů a typů tkání, jsou první dvě kritéria pro charakterizaci více vypovídající (Ghaneialvar et al., 2018). Původně byly MSCs izolovány z kostní dřeně, později byly objeveny i další zdroje, mezi které lze mimo jiné zařadit tukovou tkáň, synoviální tekutinu, plíce, pupečník a pupečnickovou krev. Další významnou rolí MSCs je také jejich schopnost imunomodulace, tedy interakce s buňkami imunitního systému a ovlivňování jejich vlastností. Obecným mechanismem imunomodulace je přímý kontakt mezi buňkami pomocí adhezivních molekul nebo interakce skrze sekretom MSCs, zahrnující například cytokiny, růstové faktory a další molekuly. Vzhledem k jejich vlastnostem, jsou MSCs vhodným kandidátem pro využití v regenerativní medicíně. Problémem je však jejich vysoká ztrátovost a omezená životnost při vpravení do hostitelské tkáně (*Samsonraj et al., 2017). Mikroprostředí do značné míry ovlivňuje vlastnosti MSCs. Při jeho stárnutí například dochází k uvolňování pro-zánětlivých molekul senescentními buňkami, což vede ke zhoršení funkcí MSCs (*Liu et al., 2022). Optimalizací mikroprostředí vlivem různých faktorů, za účelem zvýšení proliferačního a diferenciací potenciálu a dalších vlastností MSCs, bychom teoreticky mohli prodloužit jejich životnost a dosáhnout tak lepších výsledků u specifických terapií.

Vlastnosti MSCs ovlivňují také změny na epigenetické úrovni. Působí přes různé mechanismy, jako je například úprava struktury chromatinu pomocí acetylace a deacetylace histonů nebo metylace DNA. Tyto modifikace pak regulují přístupnost genů, a tedy i genovou expresi, což v konečném důsledku vede ke změně fenotypu MSCs. Některé environmentální

faktory pak dokážou vyvolat epigenetické změny a měnit tak vlastnosti MSCs (*Smith et al., 2023).

Cílem této bakalářské práce je shrnout současné poznatky týkající se této problematiky. Konkrétně tedy představit MSCs a obecný mechanismus působení faktorů prostředí na jejich vlastnosti. Dále pak rozvést tuto problematiku u vybraných faktorů – vlivu fyzické aktivity, teploty a světelného záření. Nakonec pak zhodnotit možnost jejich využití.

2 Základní epigenetické mechanismy ovlivňující vlastnosti MSCs

Mezi hlavní epigenetické mechanismy, které mají vliv na vlastnosti MSCs se řadí metylace DNA, modifikace histonů zahrnující acetylaci/deacetylaci a další úpravy jejich konců, dále pak modifikace prostřednictvím různých nekódujících RNA. Tyto modifikace modulují přístupnost genů podílejících se například na diferenciaci MSCs do různých buněčných typů. Faktory prostředí pak vlastnosti MSCs ovlivňují mimo jiné na epigenetické úrovni, což bude více rozebráno v dalších kapitolách (*Smith et al., 2023). Tato kapitola je zaměřena na uvedení základních epigenetických modifikací a mechanismů jejich působení u MSCs.

2.1 Metylace DNA

Významnou epigenetickou modifikací je metylace DNA, při které dochází k přenosu metylové skupiny z S-adenyl methioninu na pátý uhlík cytosinu za vzniku 5-methylcytosinu. Na regulaci metylace se podílí tři skupiny enzymů. Takzvané „writers“, které zajišťují připojení metylové skupiny, „erasers“, které ji odstraňují a „readers“, které ji dokážou rozpoznat a navázat se na ni. Do první skupiny se řadí různé DNA metyltransferázy, které lze rozlišit podle typu metylace, kdy buď přenáší modifikace na nově syntetizované vlákno při replikaci DNA, nebo zajišťují metylaci *de novo*. Většina metylací se vyskytuje v CpG oblastech. Přítomnost metylové skupiny umožňuje navázání represorů, ale také brání nasednutí různých transkripčních faktorů. Metylace má tedy zásadní vliv na genovou expresi, kdy zpravidla způsobuje její umlčování. Naopak v případě demethylace pak dochází k obnovení exprese genů (*Moore et al., 2013).

Při dlouhodobé kultivaci MSCs zůstává úroveň metylace DNA víceméně stabilní. Metylační vzory se liší mezi buňkami izolovanými z kostní dřevě a tukové tkáně. Zároveň je

pozorována korelace mezi metylací DNA a modifikacemi histonů H3, což naznačuje vzájemný vliv těchto epigenetických modifikací (Schellenberg et al., 2011). Metylace DNA se dále podílí na regulaci diferenciaci a schopnosti sebe-obnovy MSCs, a to zejména v oblastech tzv CpG ostrůvků, což jsou úseky DNA, ve kterých se vyskytuje velká část genových promotorů a je zde vysoká hladina genové exprese, značně ovlivňovaná metylací. Současně metylace ovlivňuje také stárnutí MSCs (*Smith et al., 2023). Dále hraje tato epigenetická modifikace roli také v imunomodulačních mechanismech MSCs. Použití 5-azacytidinu, inhibitoru DNA metyltransferázy, vede k posílení imunosupresivních účinků lidských MSCs tím, že reguluje sekreci některých solubilních faktorů a snižuje tak proliferaci imunitních buněk. Zároveň použití tohoto inhibitoru podporuje migraci MSCs do míst zánětu zvýšením exprese genů zodpovědných za chemotaxi. Tato pozorování byla dále potvrzena i na *in vivo* myším modelu (Lee et al., 2015).

2.2 Modifikace histonů

Histony jsou proteiny, jejichž oktamery vytvářejí společně s DNA komplexy zvané nukleozomy. Nukleozomy zajišťují kondenzaci chromatinu v jádře eukaryotických buněk. Existují 4 typy histonů, podílejících se na struktuře tohoto komplexu – H2A, H2B, H3 a H4. N- a C- konce histonů mohou být různými způsoby modifikovány. Mezi hlavní modifikace se řadí acetylace a metylace, existují však i další, jako je fosforylace, sumoylace a ubikvitinace histonů. Důsledkem těchto modifikací je pozměněná struktura chromatinu a následně i exprese genů (*Zhang et al., 2021).

2.2.1 Acetylace histonů

První z výčtu modifikací je acetylace / deacetylace histonů zajišťovaná enzymy histon acetyltransferázami a histon deacetylázami. Typicky jsou acetylovány lysinové zbytky histonů. Přítomnost acetylové skupiny redukuje náboj na histonech a umožňuje tak uvolnění navázané DNA (*Zhang et al., 2021). U MSCs má tato modifikace vliv například na jejich diferenciaci. Vlivem působení histon deacetylázy 8, dochází k inhibici osteogeneze MSCs izolovaných z kostní dřeně (BMSCs – bone marrow derived mesenchymal stem cells). Pokud je tento enzym inhibován pomocí kyseliny valproové, osteogeneze je naopak zvýšená (Fu et al., 2014). Použití jiných inhibitorů histon deacetyláz, konkrétně largazolu a trichostatinu A, na lidské MSCs izolované z pupečníku (UCMSCs – umbilical cord derived mesenchymal stem cells), podporuje jejich proliferaci a schopnost sebe-obnovy (Wang et al., 2013). Při stárnutí MSCs obecně

dochází k poklesu v acetylaci histonů, což způsobuje snížení genové exprese některých genů důležitých pro sebe-obnovu buněk (*Smith et al., 2023).

2.2.2 Metylace histonů

Další modifikací je metylace histonů. Podobně jako v případě acetylace, se vyskytuje na lysinových zbytcích histonů, na které je metylová skupina přenášena pomocí enzymů histon metyltransferáz. Typicky dochází i k několikanásobným metylacím, respektive di- a trimethylacím histonů. Demethylace je prováděna pomocí histon demethyláz (*Zhang et al., 2021). V kontextu MSCs metylace histonů ovlivňuje mimo jiné rovnováhu mezi diferenciací v osteoblasty a adipocyty. Lze zmínit například metyltransferázu Ezh2, která spouští adipogenezi. Proti ní pak působí demethyláza KDM6A, podporující naopak osteogenezi (Hemming et al., 2014). Dle novější studie se Ezh2 podílí také na regulaci proliferace a senescence MSCs (Li et al., 2017a). Dalšími demethylázami podporujícími diferenciaci v osteoblasty jsou pak KDM6B a KDM4B, při jejichž nedostatku je upřednostňována naopak adipogeneze (Ye et al., 2012).

2.3 Modifikace pomocí nekódujících RNA

Poslední ze zde uvedených epigenetických modifikací je modifikace pomocí nekódujících RNA, konkrétně mikro RNA (miRNA – micro RNA). Tyto molekuly, dlouhé přibližně 18-25 nukleotidů, jsou schopné post-transkripčně regulovat genovou expresi (*Yao et al., 2019). U MSCs hrají miRNA podstatnou roli například při osteogenezi (Schoolmeesters et al., 2009).

3 Vliv fyzické aktivity

Fyzická aktivita je jedním z potenciálních faktorů prostředí ovlivňujících vlastnosti MSCs, především pak jejich diferenciační potenciál (*Smith et al., 2023). Výzkum zaměřený na tuto problematiku se soustřeďuje zejména na BMSCs. Při srovnání BMSCs izolovaných z myší podstupujících tréninkový protokol s myšmi, které nevykonávaly cvičení, bylo pozorováno několik rozdílů. Ze cvičících myší bylo izolováno větší množství MSCs, které při následné kultivaci vykazovaly zvýšenou schopnost tvořit kolonie. Dále u nich byla detekována zvýšená hladina některých osteogenních markerů, jako jsou alkalická fosfatáza (ALP), osteopontin a osteokalcin. Naopak u necvičících myší byla pozorována zvýšená adipogeneze MSCs a vyšší počet adipocytů v kostní dřeni (Marędziak et al., 2015). *In vitro* studie porovnávající vliv

cvičení mezi myšími BMSCs a MSCs izolovanými z tukové tkáně (AMSCs – adipose tissue derived mesenchymal stem cells) došla k závěru, že u obou buněčných typů dochází vlivem fyzické aktivity ke zvýšení proliferace a snížení adipogeneze. V případě BMSCs byla pozorována také zlepšená schopnost osteogeneze. Výše popsané výsledky byly detekovány jak ve fyziologických podmínkách, tak v podmínkách napodobujících prostředí během transplantace buněk, čímž chtěli autoři poukázat na teoretické uplatnění těchto poznatků i během terapií (Liu et al., 2017).

V jedné ze studií se autoři zaměřili na mechanickou stimulaci MSCs, simulující podmínky při fyzické aktivitě. Vibrace o nízké intenzitě podporovaly proliferaci a částečně i osteogenezi myších MSCs během dlouhodobé kultivace (60 pasáží). U kontrolní skupiny došlo během pasážování buněk ke zpomalení proliferace, zatímco skupina stimulovaná vibracemi dvakrát denně si udržela vysokou míru proliferace. Zároveň došlo u MSCs v počátečních pasážích ke zlepšení osteogenní diferenciace, což nebylo detekováno u déle kultivovaných buněk (Bas et al., 2020).

Na základě různých studií existuje více možných mechanismů, skrze které fyzická aktivita může působit na vlastnosti MSCs. Některé z těchto mechanismů budou podrobněji popsány v následujících podkapitolách.

3.1 Zlepšení vlastností MSCs po fyzické aktivitě myši na běžícím pásu

V *in vivo* experimentu prováděném na myších bylo prokázáno, že fyzická aktivita v podobě cvičení na běžícím pásu podporuje tvorbu kostní tkáně. Na buněčné úrovni se tento efekt projevoval zvýšenou expresí osteogenních markerů a aktivací signální dráhy BMP-Smad, která je zásadní pro osteogenní diferenciaci BMSCs (*Chen et al., 2012). Zapojení této dráhy bylo prokázáno zhoršenými účinky cvičení na tvorbu kostní tkáně při použití jejího inhibitoru LDN-193189HCL. Dále byly z myši izolovány BMSCs. Na základě jejich analýzy bylo zjištěno, že fyzická aktivita zvýšila počet osteogenních BMSCs a jejich diferenciační potenciál (Zhang et al., 2020).

V jiné studii byl zkoumán efekt kombinace MSCs a fyzické aktivity na regeneraci nervového systému. V experimentu na myších modelech s poraněním míchy byly do oblasti léze aplikovány MSCs. Po dvou týdnech od zranění byly myši podrobeny cvičení na běžícím

páse třikrát týdně po dobu osmi týdnů. Studie zahrnovala čtyři skupiny myši, u nichž byla léčba prováděna různými metodami. Skupina podstupující kombinovanou terapii (MSCs + cvičení) vykazovala lepší výsledky v porovnání s ostatními. Konkrétně u ní byla pozorována lepší tkáňová regenerace, větší množství zachovalých myelinizovaných vláken a zvýšená hladina neurotrofických faktorů. Zároveň se myši z této skupiny vyznačovaly zlepšenou motorikou (Massoto et al., 2020).

3.2 Mechanismy zahrnující protein SIRT1

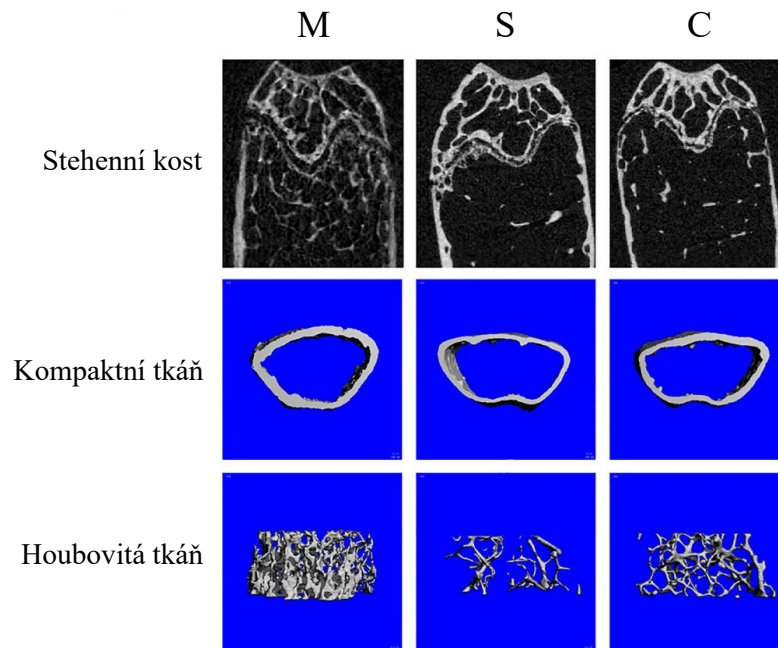
3.2.1 Spuštění antioxidantních reakcí aktivací signální dráhy AMPK-SIRT1

Lidské BMSCs byly *in vitro* vystaveny opakovanému mechanickému stimulu, který napodoboval fyzickou aktivitu. Důsledkem této stimulace byla zvýšená osteogeneze a proliferace buněk, spolu se zlepšenou tvorbou extracelulární matrix. Současně došlo k nárůstu počtu antioxidantních enzymů, což mělo za následek úbytek reaktivních forem kyslíku (ROS – reactive oxygen species). Nejvyšší nárůst byl zaznamenán u enzymu superoxid dismutázy 1. Pro aktivaci antioxidantních enzymů byla potvrzena důležitost proteinu sirtuinu 1 (SIRT1), který je součástí signální dráhy AMPK-SIRT1 (Chen et al., 2018). SIRT1 je NAD⁺ dependentní histon deacetyláza, která se podílí na remodelaci chromatinu a tím ovlivňuje další buněčné procesy (Vaquero et al., 2004). Zároveň SIRT1 ovlivňuje transkripční faktor FoxO3a a tím reguluje expresi genu RUNX2, čímž napomáhá osteogenezi. Po inhibici SIRT1 došlo k útlumu antioxidantních účinků a osteogenní diferenciaci. Důležité je zdůraznit, že výše uvedené výsledky byly dosaženy při aplikaci longitudinálního napětí o intenzitách 2,5 % a zejména pak 5 %, které simulují fyziologickou zátěž. Použití 10% napětí mělo na buňky naopak negativní vliv a působilo proti osteogenním a antioxidantním účinkům (Chen et al., 2018).

3.2.2 Regulace autofagie prostřednictvím SIRT1

Další mechanismus ovlivňující diferenciaci BMSCs vlivem fyzické aktivity také zahrnuje SIRT1. Tento enzym se mimo jiné podílí na regulaci autofagie (Lee et al., 2008), která je důležitá pro udržování kmenovosti buněk a jejich úspěšnou diferenciaci (*Sbrana et al., 2015). Během fyzické aktivity, konkrétně běhu, byl u myši pozorován nárůst exprese několika autofagických genů. Stárnoucí myši měly expresi těchto genů obecně nízkou, po zařazení fyzické aktivity se naopak zvýšila. Současně u myši docházelo vlivem fyzické aktivity k nárůstu kostní tkáně, což bylo znázorněno mimo jiné mikro-CT snímky jejich stehenních

kostí (viz Obrázek 1). Součástí studie byl také *in vitro* experiment, ve kterém bylo zjištěno, že mechanické napětí aplikované na BMSCs podporuje jejich osteogenezi. Avšak při použití buněk s deletovaným genem pro SIRT1, se vliv mechanického napětí snížil a došlo ke snížení exprese osteogenních genů. Je tedy pravděpodobné, že mechanický stimul aktivuje proces autofagie prostřednictvím SIRT1 a tím zlepšuje potenciál BMSCs diferencovat se v osteoblasty (Zhu et al., 2023).



Obrázek 1: Mikro-CT snímky znázorňující stehenní kost mladých (M), starých (S) a cvičících (C) myši. Převzato a upraveno podle (Zhu et al., 2023)

3.3 Podpora osteogeneze epigenetickou regulací signální dráhy Hedgehog

Jedním z mechanismů, kterým mechanická stimulace podporuje diferenciaci MSCs v osteoblasty, je regulace metylace DNA. Při aplikaci cyklického mechanického napětí na BMSCs dochází k poklesu množství DNA metyltransferázy 3b. Pokles tohoto enzymu následně vede k demethylaci a tím i aktivaci genu Sonic Hedgehog. Tento gen následně spustí signální dráhu podporující osteogenezi BMSCs. (Wang et al., 2017a).

3.4 Role miRNA v diferenciaci MSCs po fyzické aktivitě

Jedním z regulátorů MSCs na epigenetické úrovni jsou miRNA (*Smith et al., 2023). Některé specifické miRNA se účastní procesu osteogeneze a jsou schopny ho modulovat

různými mechanismy. Například miR-129-p se podílí na inhibici STAT1, který působí jako represor genu RUNX2, zodpovědného za osteogenní diferenciaci MSCs (Xiao et al., 2016). miR-21-5p reguluje signální dráhy AKT a SMAD, které vedou k aktivaci genu RUNX2. Dále také reguluje buněčnou proliferaci a migraci (Li et al., 2017b). miR-188-5p u MSCs podporuje adipogenezi na úkor osteogeneze (Li et al., 2015). Bylo zjištěno, že fyzická aktivita má vliv na expresi těchto miRNA, což má následně dopad na diferenciací schopnost MSCs. Z běžců absolvujících půlmaraton bylo izolováno krevní sérum. Po kultivaci BMSCs se sérem došlo k navýšení exprese u miR-21-5p a miR-129-5, v případě miR-188-5p se exprese naopak snížila. Menší množství miR-188-5p poté vedlo k útlumu exprese genu PPAR γ 2, nezbytného pro adipogenezi. Docházelo tedy k snížené tvorbě adipocytů. Tato zjištění naznačují, že fyzická aktivita může ovlivňovat diferenciaci MSCs ve prospěch osteogenní linie mimo jiné prostřednictvím regulace zahrnující miRNA (Valenti et al., 2019).

3.5 Ovlivnění genové exprese prostřednictvím komponent cytoskeletu

Další mechanismus, jakým fyzická aktivita působí na MSCs, zejména pak na jejich diferenciaci, spočívá v regulaci exprese genů prostřednictvím cytoskeletu. Během fyzické aktivity je vznikající mechanický signál detekován integriny v plazmatické membráně a dále přenášen přes aktinový cytoskelet do jádra pomocí LINC komplexu (Uzer et al., 2015). Tento proteinový komplex propojuje cytoskelet s vnitřkem buněčného jádra, kde interaguje s chromatinem, laminy a dalšími komponenty, což může vést k redistribuci chromatinu a následně i modulaci genové exprese. Důležitou roli zde hraje signalizační kaskáda, na jejímž konci se nachází protein β -katenin. Mechanický stimul dokáže aktivovat tuto kaskádu a udržuje tak aktivitu β -kateninu, což umožňuje MSCs zachovat jejich multipotentní charakter a upřednostnit diferenciaci v osteoblasty před adipocyty (*Rubin et al., 2018). Zároveň by mohla být osteogeneze podporována omezením dostupnosti represoru YAP v jádře, který zde reprimuje expresi již dříve zmíněného genu RUNX2, klíčového pro osteogenezi (Zaidi et al., 2004). Tímto způsobem by tedy fyzická aktivita částečně mohla zabraňovat tvorbě tukové tkáně. Aktinová vlákna, vyskytující se jak uvnitř, tak vně jádra, ovlivňují jeho tvar a zajišťují přestavbu chromatinu, čímž se rovněž podílejí na regulaci genové exprese. Tyto procesy tedy představují jeden z dalších mechanismů, jakým mechanické signály z prostředí indukované například fyzickou aktivitou, dokážou s využitím cytoskeletu ovlivnit strukturu a komponenty buněčného jádra a tím regulovat genovou expresi MSCs. (*Rubin et al., 2018).

3.6 Vliv cvičení na migrační aktivitu MSCs

Fyzická aktivita má potenciál zvýšit počet některých typů kmenových buněk v krevním oběhu (Marycz et al., 2016). Jedním z možných mechanismů, který by mohl tento jev podporovat, je zvýšená migrační aktivita buněk. Sérum získané ze sportovců po cvičení zvyšovalo migrační aktivitu lidských MSCs. Při podrobné analýze 120 solubilních faktorů bylo dále zjištěno, že u jedenácti z nich dochází po cvičení k nárůstu koncentrace (Schmidt et al., 2009). Jedním z faktorů, jehož koncentrace byla zvýšena, byl například interleukin (IL) 6, který se mimo jiné podílí právě na modulaci migrace MSCs (Schmidt et al., 2006). Cvičení tedy pravděpodobně vede také k uvolňování cytokinů a dalších solubilních faktorů, které jsou schopny zvyšovat migrační aktivitu MSCs (Schmidt et al., 2009).

4 Vliv teploty

Dalším vybraným environmentálním faktorem, který ovlivňuje MSCs, je teplota. Optimalizace teploty během manipulace s MSCs, například při jejich kultivaci nebo skladování, může ovlivnit vlastnosti MSCs a tím i účinnost buněčných terapií využívajících tyto buňky. Rozdílné teplotní podmínky mají různý vliv na životaschopnost MSCs. Studie porovnávající kultivaci ve třech různých teplotách zjistila, že při kultivaci ve fyziologické teplotě (37 °C) a v hypotermii (4 °C) docházelo k výraznému poklesu počtu živých AMSCs, zatímco ve 23 °C buňky přežívaly mnohem lépe. Kromě toho teplota rovněž ovlivňovala metabolickou aktivitu buněk a expresi stresových markerů (Kubrova et al., 2020). Jiná studie využívala hovězí UCMSCs. Pokud byly buňky vystaveny teplotám v rozsahu 39-42 °C, snižovala se jejich schopnost se dělit a tvořit kolonie. Tyto buňky také vykazovaly morfologii typickou pro senescentní buňky (Varela-Nieto et al., 2020). Dále okolní teplota ovlivňovala vlastnosti lidských UMSCs a BMSCs kryoprezervovaných při -130 °C. Pokud byly tyto buňky během rozmražení ponechané v pokojové teplotě, vykazovaly vlivem rychlejšího zahřívání zhoršenou funkčnost oproti MSCs ponechaným na suchém ledu. MSCs v pokojové teplotě měly narušené imunomodulační vlastnosti, což se projevovalo zhoršenou schopností potlačovat proliferaci T-buněk. Dále u nich byla pozorována zhoršená adheze, zapříčiněná pravděpodobně poškozením membrány, které způsobil nedostatek proteinu teplotního šoku (HSP – heat shock protein) 27. Tento protein se mimo jiné podílí na zachování buněčné integrity a chrání membránu proti teplotnímu šoku (Chabot et al., 2017).

4.1 Vliv teploty na diferenciaci MSCs

Dosavadní studie naznačují, že teplota může mít jak pozitivní, tak negativní dopad na diferenciaci MSCs. V této podkapitole jsou podrobněji rozebrány výsledky pozorované různými autory, kteří se tímto tématem zabývali. Potkaní BMSCs kultivované při teplotě 32 °C vykazovaly lepší diferenciační vlastnosti, v porovnání s MSCs kultivovanými při 37 °C. Ke zlepšené diferenciaci zde pravděpodobně přispívaly i zvýšené hladiny některých HSP, například HSP27 (Stolzing & Scutt, 2006b). Vystavení myších BMSCs teplotě 17 °C po dobu 60 minut *in vitro* spouštělo myogenní diferenciaci buněk. Tento efekt byl způsoben aktivací proteinu TRPM8 (Takagi et al., 2023). Tento protein je teplotně-senzitivní kanál, k jehož aktivaci dochází mimo jiné vlivem působení nízké teploty (Peier et al., 2002). V další studii bylo zjištěno, že snížení kultivační teploty ze 37 °C na 30 °C vedlo k potlačenému růstu a zlepšené osteogenní diferenciaci lidských MSCs izolovaných z placenty, která se projevovala zvýšenou expresí ALP a větším ukládáním vápníku. Množství vápníku se zároveň zvyšovalo s prodlužující se dobou kultivace při nízké teplotě (Chen et al., 2009). Na druhou stranu, jiná studie uvádí, že mírný tepelný šok, respektive vystavení lidských BMSCs teplotám 39 °C a 41 °C, také zvyšuje hladinu ALP a tím zlepšuje osteogenezi. Expresí ALP byla zvýšena o 23 % při vystavení BMSCs teplotě 39 °C po dobu 96 hodin, a naopak snížena o 62 % při 33 °C působících stejnou dobu. Dále byla teplotou ovlivněna i mineralizace. Krátkodobá a stejně tak dlouhodobá kontinuální expozice BMSCs teplotě v rozsahu 39-41 °C mineralizaci značně zvýšila, zatímco expozice nižší teplotě (33 °C) ji inhibovala (Shui & Scutt, 2001). Další ze studií došla k podobným závěrům. Při periodickém působení teploty 41 °C po dobu jedné hodiny s týdenním opakováním, docházelo k urychlení diferenciaci lidských BMSCs v osteoblasty, což se opět projevovalo zvýšenou aktivitou ALP, dále pak vyšší expresí osteogenních markerů a zlepšenou mineralizací v pozdější fázi diferenciaci (Chen et al., 2013). Dle autorů by tedy teoreticky mohla termoterapie napomáhat regeneraci kostní tkáně (Chen et al., 2013; Shui & Scutt, 2001). Autoři více recentní studie však došli v podobném experimentu k opačným výsledkům, kdy buňky vystavené teplotám v rozmezí 39-42 °C vykazovaly horší diferenciační schopnosti a to jak při krátkodobé (1h), tak dlouhodobé expozici (24, 48 a 72h). V tomto případě byly ve studii použity hovězí UCMSCs (Varela-Nieto et al., 2020).

Výsledky různých studií se tedy zdají být nekonzistentní, co se týče vlivu teploty na diferenciaci. Jejich častým společným prvkem je však změna schopnosti diferenciaci MSCs v jiné teplotě než fyziologické (37 °C), ať už se jedná o teplotu o něco vyšší, nebo nižší. Zároveň se zdá, že kromě teploty samotné, ovlivňuje diferenciaci i doba a frekvence vystavení dané

teplotě a následně také zdroj, ze kterého jsou MSCs izolovány. Dále ze studií vyplývá, že i velmi malé teplotní rozdíly mohou ovlivňovat diferenciaci MSCs.

4.2 Protinádorové účinky MSCs indukované hypertermií

Jednou z vlastností MSCs je jejich schopnost migrace do míst zánětu, tedy i do nádorového prostředí (*Spaeth et al., 2008). MSCs vystavené hypertermii vykazují protinádorové účinky. Přidání MSCs ošetřených tepelným šokem do kultivačního média s nádorovými buňkami způsobovalo sníženou životaschopnost nádorových buněk. Dále docházelo ke kondenzaci jejich jádra a rozpadu cytoskeletu. Mechanismus zodpovědný za tento efekt pravděpodobně spočívá v uvolňování solubilních faktorů MSCs, které kromě samotných nádorových buněk současně modifikují mikroprostředí nádoru. Tyto faktory například snižují expresi pro-nádorových molekul, jako jsou protein lékové rezistence MDR1 a anti-apoptotický protein Bfl-1 a zároveň zvyšují expresi pro-apoptotických molekul, což vede k inhibici růstu nádorových buněk (Cho et al., 2009).

4.3 Vliv teploty na protizánětlivé účinky MSCs

Teplota dále ovlivňuje také imunomodulační vlastnosti lidských UCMSCs ko-kultivovaných s lymfocyty. Při fyziologické teplotě (37 °C) MSCs inhibovaly proliferaci imunitních buněk. Tento efekt však nebyl pozorován, pokud byly vystaveny hypertermii. Současně při hypertermii ve směsné lymfocytární kultuře v přítomnosti MSCs docházelo ke změnám v produkci některých cytokinů. Zároveň při 41 °C klesala exprese CXCL12, což snížilo schopnost MSCs migrovat do míst zánětu. Hypertermie tedy v přítomnosti MSCs zvyšovala proliferaci lymfocytů a ovlivnila hladiny některých cytokinů (Hesami et al., 2017). Ve studii využívající hovězí UCMSCs ko-kultivované s linií myších makrofágů způsobila expozice teplotě 40,5 °C po dobu 24 h a déle zhoršené imunomodulační vlastnosti buněk. Při krátkodobé expozici (1 h) k tomuto efektu nedocházelo, naopak se snižovala exprese prozánětlivých cytokinů a schopnost imunomodulace se nezhoršovala (Varela-Nieto et al., 2020). Jiná studie došla k závěru, že hypertermie podporuje protizánětlivé účinky MSCs. Lidské BMSCs ko-kultivované s makrofágy stimulovanými pomocí lipopolysacharidu (LPS), dokázaly po vystavení teplotě 38.5 °C po dobu jedné hodiny navodit změnu prozánětlivého M1 fenotypu makrofágů na protizánětlivý M2 fenotyp. Mechanismem tohoto účinku byla pravděpodobně aktivace signální dráhy, vedoucí k uvolnění prostaglandinu E2. K její aktivaci docházelo prostřednictvím hypertermií indukované translokace proteinu teplotního šoku HSF1

do jádra (McClain-Caldwell et al., 2018). Tato dráha se obecně podílí na imunosupresivních vlastnostech MSCs (Zhang et al., 2019). Autoři dále u MSCs vystavených hypertermii pozorovali změnu v hladinách některých imunosupresivních faktorů, jako je například PDL-1. (McClain-Caldwell et al., 2018)

4.4 Vliv teploty na antioxidační účinky MSCs

V somatických buňkách snížená teplota redukuje oxidační stres. Jedna ze studií došla k závěru, že k podobnému efektu dochází také u MSCs. Při porovnání kultivace potkaních BMSCs v 37 °C s buňkami kultivovanými v 32 °C se ukázalo, že nižší teplota přispívá k lepším antioxidačním účinkům. Tento jev byl důsledkem sníženého množství produkovaných ROS a zároveň zvýšené aktivity antioxidačních enzymů, jako je například glutathion peroxidáza nebo superoxid dismutáza 1. Současně MSCs kultivované při nižší teplotě vykazovaly sníženou expresi proteinů p21 a p53, což vedlo k ovlivnění buněčného cyklu a nižší proliferaci. Všechny tyto efekty měly za následek také zlepšenou schopnost sebeobnovy MSCs. Tyto výsledky byly konzistentní i během opakovaného pasážování buněk. Kultivace MSCs při nižší teplotě tedy může zamezit hromadění oxidativního stresu, což by teoreticky mohlo přispívat k jejich větší účinnosti při terapeutických aplikacích (Stolzing & Scutt, 2006b). V aktuálnější studii prováděné na AMSCs bylo zjištěno, že i mírné snížení teploty z 37 °C na 35 °C také vede ke snížené produkci ROS, avšak buněčnou proliferaci nijak zásadně neovlivňuje. Kultivace při 37 °C způsobovala naopak akumulaci ROS, což vedlo ke zvýšené expresi prozánětlivých cytokinů a vzniku prozánětlivého fenotypu AMSCs. Výše zmíněné efekty byly pozorovány jak na potkaních, tak lidských AMSCs (Tirza et al., 2020).

Na druhé straně, použití vyšší teploty, tentokrát na hovězí UCMSCs, způsobilo akumulaci ROS a zhoršení funkčnosti mitochondrií. Konkrétně k tomuto jevu docházelo při vystavení buněk 42 °C po dobu jedné hodiny. V případě teploty 39 °C nebyla hladina ROS ovlivněna. U 40,5 °C byla autory pozorována pozitivní korelace mezi počtem dní, kdy byly buňky vystaveny této teplotě a hladinou ROS (Varela-Nieto et al., 2020).

5 Vliv světelného záření

Působení světelného záření neboli fotobiomodulace se využívá při terapiích, kdy napomáhá regeneraci tkání, ale také snížení zánětu a bolesti (Hamblin et al., 2011). Při zkoumání tohoto faktoru se využívají zejména červené a modré vlnové délky (VD) světla. Zdrojem záření jsou pak především elektroluminiscenční diody (LED – light-emitting diode) nebo lasery. Na buněčné úrovni je světlo absorbováno mitochondriemi a následně ovlivňuje buněčný metabolismus. Konkrétní mechanismy nejsou zcela objasněny a lehce se liší na základě použité VD (*Mohamad et al., 2021)

Červené světlo (cca 600-700 nm), případně VD blízké infračervenému světlu (NIR – near infra red) (cca 780-1100 nm) stimulují cytochrom c oxidázu, enzym respiračního řetězce, který zároveň funguje jako chromofor, tedy molekula schopná absorpce fotonu. Po jeho stimulaci dochází k zvýšené produkci adenosintrifosfátu (ATP – adenosin triphosphate) a cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP – cyclic adenosine monophosphate), což spouští různé bio-stimulační účinky. Zároveň dochází k ovlivnění hladiny ROS, které se následně mohou podílet na buněčné signalizaci. Nejpravděpodobnějším mechanismem stimulace cytochrom c oxidázy je disociace oxidu dusnatého, který cytochrom c oxidázu za fyziologických podmínek inhibuje, a tím dochází k následné inhibici celého oxidačního řetězce (*Mohamad et al., 2021). Ovlivnění mitochondrií působením červeného světla potvrzuje i jedna poměrně recentní studie. Ozařování AMSCs červenými LED diodami (630 nm) způsobovalo změny v jejich metabolismu a sekreci některých faktorů. Ozáření světlem o energii 4 J/cm^2 vedlo ke zlepšené funkci mitochondrií a zvýšené produkci ATP. Zároveň autoři uvádějí, že záření o nižší energii, tedy $0,5$ a 2 J/cm^2 , nezpůsobovalo žádné zásadnější změny. Dále docházelo vlivem záření k ovlivnění hladiny některých cytokinů, například IL-6 a IL-10, v závislosti na použité energii. Mechanismus tohoto efektu však nebyl objasněn. (Dias et al., 2023).

Modré světlo (cca 400-500 nm) je pravděpodobně absorbováno NADPH-dependentními enzymy respiračního řetězce, případně i CRY proteiny. Bio-stimulační účinky modrého světla působí převážně prostřednictvím mírného navýšení hladiny ROS (Eichler et al., 2005). Použití záření o příliš vysoké intenzitě má na buňku inhibiční účinky, mimo jiné kvůli nadměrné hladině ROS. Obecně lze tedy říct, že pozitivní bio-stimulace probíhá pouze v určitém rozsahu aplikovaného záření (*Mohamad et al., 2021).

Během ozařování buněk lze nastavit několik parametrů, jako je například použitý zdroj světla, intenzita záření a doba expozice záření. Výsledný efekt fotobiomodulace pak závisí na kombinaci těchto parametrů. Jejich optimalizace a standardizace je potřebná pro eliminaci vedlejších účinků a pro teoretické využití fotobiomodulace při terapiích. Světelné záření dokáže, obdobně jako jiné faktory prostředí, modulovat proliferaci, diferenciaci a další vlastnosti MSCs. V případě diferenciaci je potřebné kromě optimalizace parametrů ozařování zvolit i vhodné kultivační médium, aby se efekt fotobiomodulace projevil (*Mohamad et al., 2021). V následujících podkapitolách jsou popsány výsledky několika studií zabývajících se tímto faktorem.

5.1 Modulace proliferace MSCs pomocí světelného záření

Ozařování lidských BMSCs červenými LED diodami o VD 630 nm jednorázově, nebo jednou denně po dobu pěti dnů vedlo ke zvýšené proliferaci buněk. Efekt denního ozařování byl výrazně vyšší než v případě jednorázového. Tento výsledek zároveň potvrdila zlepšená schopnost buněk tvořit kolonie. Současně bylo pozorováno, že záření o nižší intenzitě, ale stejné celkové energii (1,5 a 2,5 J/cm²), má na proliferaci příznivější vliv v porovnání s vyšší intenzitou záření. Dalším parametrem podílejícím se na vlivu světelného záření může být i počáteční hustota buněk (Li & Yuan, 2006). V další studii byl použit jiný světelný zdroj s podobným výsledkem. Působení nízko-energetického laseru (660 nm) o různých energiích na myši BMSCs zlepšilo jejich proliferaci. Optimálních výsledků bylo dosaženo použitím dávky 4 J/cm². Světlo zde pravděpodobně působilo prostřednictvím IGF1 signální dráhy, avšak autoři uvádějí, že přesný mechanismus není zcela znám a do signalizace mohou být zapojeny i další faktory (Wu et al., 2012). Jedna ze studií se zabývala fotobiomodulací dvěma VD současně (808 nm a 905 nm) pomocí speciálního laserového systému. Bylo zjištěno, že kombinované záření o energii 3, 10 a 20 J/cm² pozitivně ovlivňuje životaschopnost a proliferaci lidských BMSCs (Pasternak-Mnich et al., 2019).

Fotobiomodulace ovlivňuje také proliferaci AMSCs. Buňky byly ozařované laserem o VD 660 nm a třech různých energiích po dobu 24, 48 a 72 h. Tato studie ukázala, že proliferace se zvyšuje u všech skupin. Jedinou částečnou výjimkou bylo záření o energii 5,04 J, jehož jednorázová aplikace měla stejný výsledek, avšak opakované působení tohoto záření způsobilo akumulaci aplikovaných dávek a vedlo naopak k inhibičním účinkům (de Andrade et al., 2019). Ve studii porovnávající fotobiomodulaci lidských AMSCs mezi červeným (660 nm), NIR (810 nm), modrým (415 nm) a zeleným světlem (540 nm) o stejné energii (3 J/cm²) bylo zjištěno, že

zatímco červené a NIR světlo podporuje proliferaci MSCs, což je v souladu s výše uvedenými studiemi, tak modré a zelené ji naopak inhibuje. Inhibiční efekt se projevoval sníženou tvorbou ATP a zvýšenými hladinami vápenatých iontů a ROS. Rozdíly mezi modrým a zeleným světlem byly nepatrné. Tyto výsledky naznačují, že může existovat více mechanismů, jakými různé VD na proliferaci MSCs působí (Wang et al., 2017b). V další studii byla proliferace ovlivněna fotobiomodulací lidských AMSCs zeleným laserem (532 nm). Po pěti dnech po ozařování byla proliferace zvýšená, avšak po sedmi dnech se naopak snižovala (Tamimi et al., 2022). Modré světlo v rozsahu VD 420-480 nm vyzařované LED diodami inhibovalo také proliferaci lidských MSCs izolovaných z dásní. Nejvyšší inhibice proliferace byla zaznamenána při použití světla o energii 2 J/cm². Na druhou stranu světlo podporovalo osteogenezi MSCs, což bylo dokázáno zvýšenou expresí osteogenních markerů. Zároveň se zdá, že postupné navyšování energie záření vede k lepší mineralizaci v pozdější fázi diferenciaci (Zhu et al., 2019).

5.2 Vliv světla na diferenciaci MSCs

Ozařování myších BMSCs pomocí LED (647 nm) podporovalo osteogenní diferenciaci při expozici světlu po dobu 10, 30 a 90 s. Vlivem tohoto záření docházelo u buněk k zvýšené expresi osteogenních markerů, jako je například ALP nebo RUNX2 (Kim et al., 2009). U myších BMSCs bylo pozorováno zlepšení osteogeneze také po jejich ozáření nízkoenergetickým laserem (660 nm). Dle autorů bylo tohoto efektu dosaženo pravděpodobně signalizací inzulinu podobného růstového faktoru 1 (IGF1) a kostního morfogenetického proteinu 2 (BMP2) (Wu et al., 2012).

Jedna ze studií se zaměřila primárně na fotobiomodulaci AMSCs pomocí modrého (420 nm) a zeleného (540 nm) světla. Autoři zde došli k závěru, že i tyto VD podporují diferenciaci v osteoblasty, a to dokonce efektivněji než červené a NIR světlo. Zároveň zde navrhli jeden z dalších možných mechanismů působení světelného záření na buňky a sice světlem ovládané vápenaté kanály, po jejichž inhibici nebyly účinky fotobiomodulace detekovány. Toto však neplatilo v případě červeného a NIR světla, což naznačuje, že by odlišné VD mohly působit skrze různé mechanismy také na diferenciaci MSCs (Wang et al., 2016).

Vliv LED záření na diferenciaci byl pozorován i u lidských UCMSCs. Expozice světlu o vlnové délce 620 nm a energii 2 J/cm² zvyšovala proliferaci a osteogenní diferenciaci buněk za současného použití osteogenního média při kultivaci. V případě použití samotného LED záření

k těmto změnám však nedocházelo, což by dle autorů mohlo být ovlivněno použitým zdrojem MSCs (Yang et al., 2016).

5.3 Účinek fotobiomodulace na „omlazení“ MSCs

Stárnutí MSCs obecně zhoršuje jejich vlastnosti (Stolzing & Scutt, 2006a). Mladé buňky ve srovnání se stárnoucími reagují na světelné záření různě. Fotobiomodulace pomocí diodového laseru využívajícího NIR záření (808 nm) o energii 3 J/cm² dokázala zlepšit funkci mitochondrií a tím potlačit senescentní fenotyp stárnoucích BMSCs izolovaných z myší. Současně bylo zjištěno, že opakované ozařování buněk v jednodenních intervalech zajišťuje přetrvávající „omlazený“ fenotyp BMSCs, zatímco při jednorázovém ozáření tyto účinky vymizí po pár hodinách. (Eroglu et al., 2021).

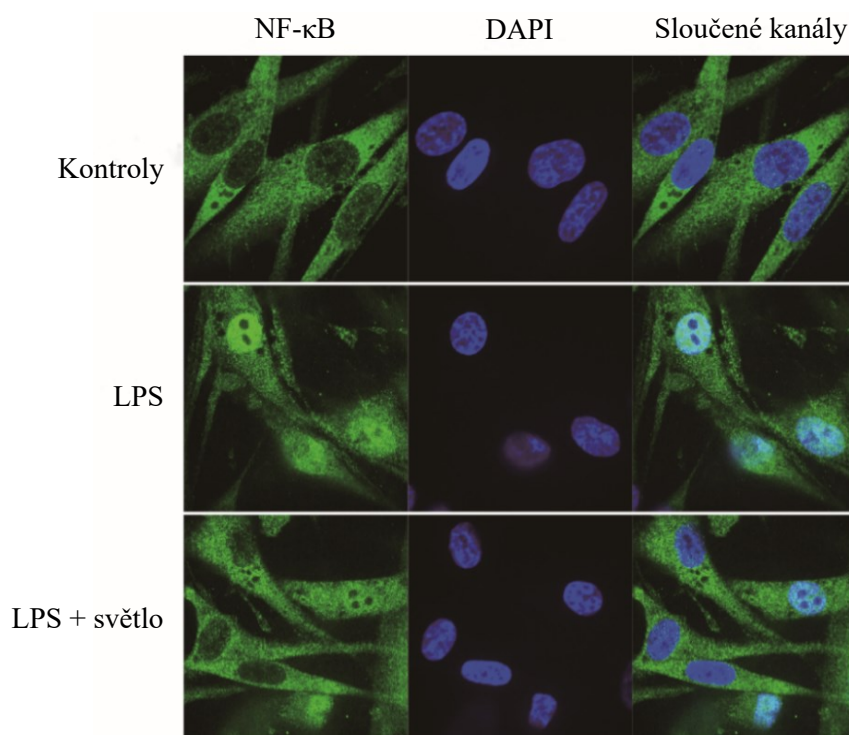
5.4 Ovlivnění migrace MSCs pomocí světelného záření

Další z vlastností MSCs, kterou může světlo ovlivňovat, je migrace. Použití LED diod využívajících NIR (850 nm) a červenou VD (630 nm) na krysí BMSCs vyvolalo zvýšenou migrační schopnost buněk. V případě červené VD byl efekt silnější. Co se týče mechanismu, světlo zde pravděpodobně zvyšovalo aktivitu matrix-metaloproteináz 2 a 9, enzymů důležitých pro migraci. Dále také modulovalo polymeraci a distribuci aktinu v buňce, což bylo dokázáno snímky z imunofluorescenční mikroskopie. Dle autorů je zde efekt fotobiomodulace zprostředkován fosforylací proteinů FAK a nukleárního faktoru kappa B (NF-κB) (Li et al., 2013).

Jedna z novějších studií zjistila, že fotobiomodulace pomocí diodového laseru o VD 808 nm zlepšila migraci lidských MSCs izolovaných z dásní. Efekt byl pozorován až 24 h po fotobiomodulaci a nejlepší výsledky byly dosaženy použitím záření o energii 1 J/cm². Mechanismem tohoto účinku byla zvýšená fosforylace proteinů JNK a IκB způsobující aktivaci NF-κB signální dráhy, kterou vyvolal nárůst mitochondriálních ROS po ozařování. Aktivace této dráhy následně vedla k tvorbě enzymu matrix-metaloproteinázy 1, který se podílí na migraci buněk. Dále byl proveden také *in vivo* pokus, při kterém fotobiomodulace podpořila hojení zraněného patra u myší (Feng et al., 2020). Dle mého názoru však fotobiomodulace v případě *in vivo* pokusu nemusela nutně ovlivňovat MSCs, ale i další buněčné typy.

5.5 Protizánětlivé účinky zajištěné fotobiomodulací

Několik studií prokázalo, že fotobiomodulace dokáže v MSCs spustit protizánětlivé účinky. Lidské AMSCs byly stimulovány LPS a následně ozařovány pomocí laseru (660 nm). Fotobiomodulace vedla k inhibici prozánětlivé odpovědi indukované LPS, což se projevilo sníženou hladinou některých prozánětlivých cytokinů při použití světla o energii 8 J/cm². Dle autorů byl tento efekt způsoben větší produkcí cAMP, která následně inhibovala expresi transkripčního faktoru NF-κB a jeho translokaci do buněčného jádra, což zabránilo spuštění signální dráhy zajišťující expresi prozánětlivých cytokinů (Wu et al., 2013). Ke stejným výsledkům došla i studie od Yin et al. Opět byl zkoumán vliv laseru (660 nm) na lidské AMSCs stimulované LPS. Vlivem fotobiomodulace byla snížena sekrece prozánětlivých cytokinů, ROS a NO. Mechanismem tohoto účinku byla také regulace NF-κB signální dráhy. Tentokrát bylo zabráněno fosforylaci proteinů umožňujících aktivaci NF-κB, což znemožnilo translokaci tohoto transkripčního faktoru do jádra (viz Obrázek 2). Současně fotobiomodulace nestimulovaných buněk zvýšila množství protizánětlivých cytokinů, konkrétně IL-4 a IL-10 (Yin et al., 2017).



Obrázek 2: Mikroskopické snímky znázorňující sníženou translokaci NF-κB do jádra MSCs po fotobiomodulaci (Kontroly – kontrolní skupina buněk, LPS – buňky stimulované LPS, LPS + světlo – buňky stimulované LPS po fotobiomodulaci). Převzato a upraveno podle (Yin et al., 2017)

Další, poměrně recentní studie, zkoumala vliv zeleného světla (532 nm) na protizánětlivé účinky lidských AMSCs. V tomto případě bylo pozorováno, že působení laseru vedlo ke snížení exprese genů spojených se zánětem, jako jsou například CSF2 a CXCL2. (Tamimi et al., 2022).

6 Závěr

MSCs mají potenciál ve využití v regenerativní medicíně a při buněčných terapiích, nejen díky jejich diferenciačním a imunomodulačním schopnostem. Jejich využití má však i svá úskalí. Při izolaci MSCs lze získat pouze omezené množství buněk, které je pro terapie často nedostatečné, což vyžaduje jejich kultivaci *in vitro*. Vlivem dlouhodobé kultivace však dochází ke zhoršování vlastností MSCs. Je tedy vhodné použít různé strategie podporující jejich vlastnosti a účinnost terapií tím zvýšit. Nabízí se například využití environmentálních faktorů, jako jsou například mechanická stimulace, teplota nebo světlo.

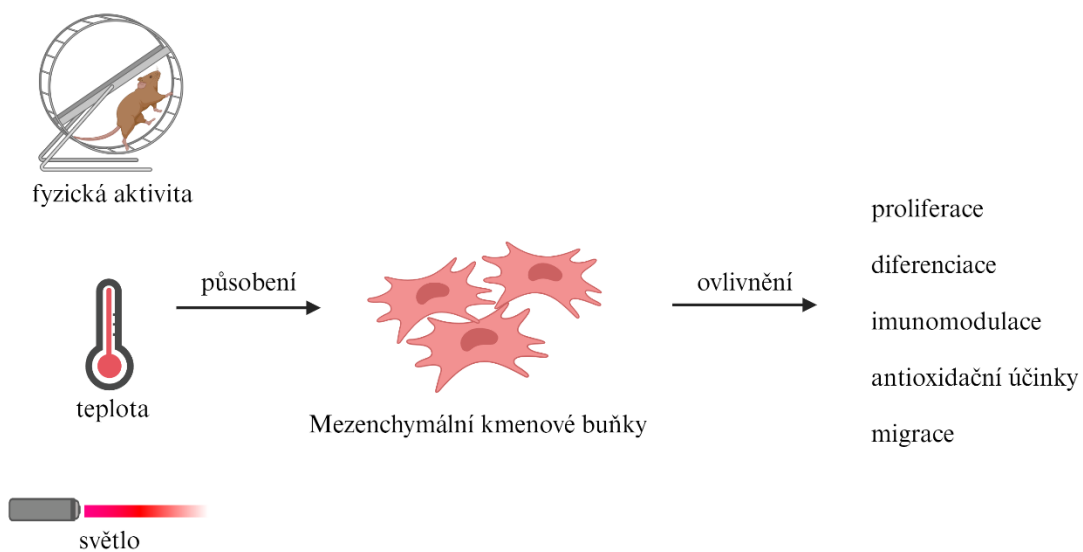
Dle dostupné literatury environmentální faktory ovlivňují především proliferační a diferenciační schopnosti, ale do určité míry také další vlastnosti MSCs (viz Obrázek 3, Tabulka 1). Působením fyzické aktivity, případně mechanického stimulu, je ovlivněna zejména rovnováha mezi osteogenní a adipogenní diferenciací. Tento faktor často ovlivňuje MSCs na epigenetické úrovni prostřednictvím různých mechanismů zahrnujících například protein SIRT1 (Chen et al., 2018; Zhu et al., 2023). Mechanická stimulace, vznikající například při fyzické aktivitě, dokáže ovlivňovat komponenty cytoskeletu v buňce a tím modulovat genovou expresi (*Rubin et al., 2018). Dále ze studií vyplývá, že působení fyzické aktivity spouští v buňce různé mechanosenzitivní signální dráhy, jako je například BMP-SMAD nebo Hedgehog (*Chen et al., 2012; Wang et al., 2017a). Tyto dráhy pak v konečném důsledku ovlivňují expresi genů důležitých pro osteogenezi, zejména pak expresi genu RUNX2. Kromě diferenciací a proliferace ovlivňuje fyzická aktivita také antioxidační účinky a migraci MSCs.

Teplota, podobně jako fyzická aktivita, dokáže ovlivňovat proliferaci, diferenciaci, antioxidační účinky a migraci MSCs. Kromě těchto vlastností má teplota vliv také na imunomodulační schopnosti MSCs. Nedá se však s jistotou tvrdit, že by určitá teplota měla specifický účinek. Použití obdobných teplot může vést k pozitivním i negativním účinkům, což může být příčinou rozdílného nastavení experimentů. Někde autoři využívali působení konkrétní teploty, jinde určitý teplotní rozsah, kdy například snižovali teplotu z 37 °C na 30 °C (Chen et al., 2009). Tyto teplotní přechody mohou teoreticky ovlivňovat buňky jiným způsobem než působení jedné specifické teploty. Dále se zdá, že kromě teploty samotné výsledný efekt

ovlivňuje například čas, v jakém daná teplota působí. V jedné ze studií krátkodobá hypertermie zlepšovala imunomodulační vlastnosti MSCs, dlouhodobá však nikoliv (Varela-Nieto et al., 2020). Zde rozebírané studie navíc využívaly buňky izolované z různých tkání (AMSCs, BMSCs, UCMSCs), v některých případech i z různých organismů (lidské, potkaní a hovězí MSCs). Buňky pocházející z různých zdrojů se teoreticky mohou do určité míry odlišovat ve svých vlastnostech, včetně citlivosti k teplotě, a reagovat jinak na stejnou teplotu. Z těchto závěrů tedy vyplývá, že vždy záleží na konkrétním nastavení experimentu, a kromě teploty výsledný efekt ovlivňují i další faktory.

Působením světla neboli fotobiomodulací je možné ovlivňovat obdobné vlastnosti MSCs, jako v případě dvou předchozích faktorů. Většina studií se zaměřuje především na účinky červených a NIR VD. Obecný mechanismus fotobiomodulace spočívá v ovlivňování funkcí mitochondrií. Různé studie naznačují, že optimální dávky záření, VD a další parametry, společně se signalizačními mechanismy fotobiomodulace, stále nejsou zcela objasněny. Zdá se, že signální dráha NF- κ B může hrát zásadní roli při ovlivňování migrace a protizánětlivých účinků MSCs (Feng et al., 2020; Li et al., 2013; Wu et al., 2013; Yin et al., 2017). Světlo může účinkovat rozdílně na různé vlastnosti MSCs, v závislosti na použité VD. Proliferaci pozitivně ovlivňují červené a NIR VD, zatímco modré a zelené ji spíše inhibují. Zdá se, že diferenciaci naopak podporují všechny čtyři VD, dle jedné ze studií jsou však modré a zelené efektivnější (Wang et al., 2016). Nevýhodou fotobiomodulace je velké množství parametrů, které je třeba optimalizovat a standardizovat pro replikovatelné výsledky. Limitací některých studií je nedostatečný popis těchto parametrů. Optimální stimulační dávkou záření se momentálně zdá být několik jednotek J/cm^2 . Dále dle studií, mimo jiné, závisí také na intenzitě a frekvenci ozařování. Naopak zdroj záření pravděpodobně není tak zásadní, vzhledem k podobným efektům v případě použití LED diod i laseru. Je nutno poznamenat, že většina uvedených experimentů probíhala primárně *in vitro* na buněčných kulturách, takže je otázkou, zda by bylo dosaženo stejných výsledků v případě použití *in vivo* modelů.

Vliv environmentálních faktorů na MSCs je tedy důležitým aspektem, avšak vzhledem k rozporům v některých studiích, musí být ještě důkladněji prozkoumán. V kontextu terapií, má využití faktorů prostředí několik potenciálních výhod. Jejich aplikace je neinvazivní, ekonomičtější a lze jí cílit na více vlastností najednou. Na druhou stranu je složitější optimalizovat a standardizovat působení těchto faktorů.



Obrázek 3: Schéma shrnující vliv environmentálních faktorů na vybrané vlastnosti MSCs. (vytvořeno v BioRender.com)

Environmentální faktory	Vlastnosti MSCs					Citace
	Proliferace	Diferenciace	Migrace	Protizánětlivé účinky	Antioxidační účinky	
Fyzická aktivita	+	+	+	0	0	(Maređziak et al., 2015; Schmidt et al., 2009; Valenti et al., 2019; Zhang et al., 2020)
Mechanická stimulace <i>in vitro</i>	+	+	0	0	+	(Bas et al., 2020; Chen et al., 2018; Liu et al., 2017; Wang et al., 2017a; Zhu et al., 2023)
Hypotermie (< 37 °C)	?	+	0	0	+	(Chen et al., 2009; Kubrova et al., 2020; Stolzing & Scutt, 2006b; Takagi et al., 2023)
Fyziologická teplota (37 °C)	-	0	0	+	-	(Hesami et al., 2017; Kubrova et al., 2020; Stolzing & Scutt, 2006b; Tirza et al., 2020)
Hypertermie (> 37 °C)	-	?	0	?	- / 0	(Chen et al., 2013; Hesami et al., 2017; MCCLAIN-CALDWELL et al., 2018; Shui & Scutt, 2001; Varela-Nieto et al., 2020)
Červené světlo	+	+	+	+	0	(de Andrade et al., 2019; Kim et al., 2009; W.-T. Li & Yuan, 2006; Wang et al., 2016, 2017b; Li et al., 2013; Wu et al., 2012, 2013; Yang et al., 2016; Yin et al., 2017)
NIR světlo	+	+	+	0	0	(Feng et al., 2020; Pasternak-Mnich et al., 2019; Wang et al., 2016, 2017b; Li et al., 2013)
Modré světlo	-	+	0	0	0	(Wang et al., 2016, 2017b; Zhu et al., 2019)
Zelené světlo	-	+	0	+	0	(Tamimi et al., 2022; Wang et al., 2016, 2017b)

Tabulka 1: Shrnující tabulka znázorňující vlivy vybraných faktorů prostředí na vlastnosti MSCs

(+ pozitivní efekt, - negativní efekt, ? nejasný efekt, 0 efekt nepozorován)

7 Seznam použité literatury

Bas, G., Loiate, S., Hudon, S. F., Woods, K., Hayden, E. J., Pu, X., Beard, R., Oxford, J. T., & Uzer, G. (2020). Low Intensity Vibrations Augment Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Differentiation Capacity during in vitro Expansion. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66055-0>

Chabot, D., Tremblay, T., Paré, I., Bazin, R., & Loubaki, L. (2017). Transient warming events occurring after freezing impairs umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells functionality. *Cytotherapy*, 19, 978–989. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.04.005>

* Chen, G., Deng, C., & Li, Y. P. (2012). TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International Journal of Biological Sciences*, 8(2), 272–288. <https://doi.org/10.7150/ijbs.2929>

Chen, J., Shi, Z. D., Ji, X., Morales, J., Zhang, J., Kaur, N., & Wang, S. (2013). Enhanced osteogenesis of human mesenchymal stem cells by periodic heat shock in self-assembling peptide hydrogel. *Tissue Engineering - Part A*, 19(5–6), 716–728. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0070>

Chen, T., Zhou, Y., & Tan, W.-S. (2009). Effects of Low Temperature and Lactate on Osteogenic Differentiation of Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14, 708–715. <https://doi.org/10.1007/s12257-009-0034-y>

Chen, X., Yan, J., He, F., Zhong, D., Yang, H., Pei, M., & Luo, Z. P. (2018). Mechanical stretch induces antioxidant responses and osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells through activation of the AMPK-SIRT1 signaling pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 126, 187–201. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2018.08.001>

Cho, J. A., Park, H., Kim, H. K., Lim, E. H., Seo, S. W., Choi, J. S., & Lee, K. W. (2009). Hyperthermia-treated mesenchymal stem cells exert antitumor effects on human carcinoma cell line. *Cancer*, 115(2), 311–323. <https://doi.org/10.1002/cncr.24032>

de Andrade, A. L. M., Luna, G. F., Brassolatti, P., Leite, M. N., Parisi, J. R., de Oliveira Leal, Â. M., Frade, M. A. C., de Freitas Anibal, F., & Parizotto, N. A. (2019). Photobiomodulation effect on the proliferation of adipose tissue mesenchymal stem cells. *Lasers in Medical Science*, 34(4), 677–683. <https://doi.org/10.1007/s10103-018-2642-2>

- Dias, B. S., Mansano, M., Pocani Da Rocha, V., Luiz, I., Teixeira, A., Antonia De Oliveira, H., Souza Vieira, S., Antonio, E. L., Ferreira Tucci, P. J., & Serra, A. J. (2023). Light-emitting Diode Can Enhance the Metabolism and Paracrine Action of Mesenchymal Stem Cells. *Photochemistry and Photobiology*, 99, 1420–1428. <https://doi.org/10.1111/php.13794>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Eichler, M., Lavi, R., Shainberg, A., & Lubart, R. (2005). Flavins are source of visible-light-induced free radical formation in cells. *Lasers in Surgery and Medicine*, 37(4), 314–319. <https://doi.org/10.1002/lsm.20239>
- Eroglu, B., Genova, E., Zhang, Q., Su, Y., Shi, X., Isales, C., & Eroglu, A. (2021). Photobiomodulation has rejuvenating effects on aged bone marrow mesenchymal stem cells. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92584-3>
- Feng, J., Li, X., Zhu, S., Xie, Y., Du, J., Ge, H., Bai, Y., Liu, Y., & Guo, L. (2020). Photobiomodulation with 808-nm diode laser enhances gingival wound healing by promoting migration of human gingival mesenchymal stem cells via ROS/JNK/NF- κ B/MMP-1 pathway. *Lasers Med Sci* 35, 1831–1839. <https://doi.org/10.1007/s10103-020-03040-z> Published
- Fu, Y., Zhang, P., Ge, J., Cheng, J., Dong, W., Yuan, H., Du, Y., Yang, M., Sun, R., & Jiang, H. (2014). Histone deacetylase 8 suppresses osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells by inhibiting histone H3K9 acetylation and RUNX2 activity. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 54, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.07.003>
- Ghaneialvar, H., Soltani, L., Rahmani, H. R., Lotfi, A. S., & Soleimani, M. (2018). Characterization and Classification of Mesenchymal Stem Cells in Several Species Using Surface Markers for Cell Therapy Purposes. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 33(1), 46–52. <https://doi.org/10.1007/s12291-017-0641-x>
- Hamblin, M. R., Huang, Y. Y., Sharma, S. K., & Carroll, J. (2011). Biphasic dose response in low level light therapy - an update. *Dose-Response*, 9(4), 602–618. <https://doi.org/10.2203/dose-response.11-009.Hamblin>

Hemming, S., Cakouros, D., Isenmann, S., Cooper, L., Menicanin, D., Zannettino, A., & Gronthos, S. (2014). EZH2 and KDM6A act as an epigenetic switch to regulate mesenchymal stem cell lineage specification. *Stem Cells*, 32(3), 802–815. <https://doi.org/10.1002/stem.1573>

Hesami, S., Mohammadi, M., Rezaee, M. A., Jalili, A., & Rahmani, M. R. (2017). The effects of hyperthermia on the immunomodulatory properties of human umbilical cord vein mesenchymal stem cells (MSCs). *International Journal of Hyperthermia*, 33(7), 705–712. <https://doi.org/10.1080/02656736.2017.1309576>

Kim, H. K., Kim, J. H., Abbas, A. A., Kim, D. O., Park, S. J., Chung, J. Y., Song, E. K., & Yoon, T. R. (2009). Red light of 647 nm enhances osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Lasers in Medical Science*, 24(2), 214–222. <https://doi.org/10.1007/s10103-008-0550-6>

Kubrova, E., Qu, W., Galvan, M. L., Paradise, C. R., Yang, J., Dietz, A. B., Dudakovic, A., Smith, J., & van Wijnen, A. J. (2020). Hypothermia and nutrient deprivation alter viability of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Gene*, 722. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144058>

Lee, I. H., Cao, L., Mostoslavsky, R., Lombard, D. B., Liu, J., Bruns, N. E., Tsokos, M., Alt, F. W., & Finkel, T. (2008). A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(9), 3374–3379. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712145105>

Lee, S., Kim, H.-S., Roh, K.-H., Lee, B.-C., Shin, T.-H., Yoo, J.-M., Kim, Y.-L., Yu, K.-R., Kang, K.-S., & Seo, K.-W. (2015). DNA methyltransferase inhibition accelerates the immunomodulation and migration of human mesenchymal stem cells. *Scientific reports*, 5(1), 8020. <https://doi.org/10.1038/srep08020>

Li, C., Chai, Y., Wang, L., Gao, B., Chen, H., Gao, P., Zhou, F. Q., Luo, X., Crane, J. L., Yu, B., Cao, X., & Wan, M. (2017a). Programmed cell senescence in skeleton during late puberty. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01509-0>

Li, C. J., Cheng, P., Liang, M. K., Chen, Y. S., Lu, Q., Wang, J. Y., Xia, Z. Y., Zhou, H. De, Cao, X., Xie, H., Liao, E. Y., & Luo, X. H. (2015). MicroRNA-188 regulates age-related switch between osteoblast and adipocyte differentiation. *Journal of Clinical Investigation*, 125(4), 1509–1522. <https://doi.org/10.1172/JCI77716>

Li, W.-T., & Yuan, C. (2006). Effect of light emitting diode irradiation on proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 26(1), 35. <http://www.invitrogen.com>

Li, W.-T., Chen, C.-W., & Huang, P.-Y. (2013). Effects of Low Level Light Irradiation on the Migration of Mesenchymal Stem Cells Derived from Rat Bone Marrow. 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), Osaka, Japan, 2013. <https://doi.org/10.1109/EMBC.2013.6610452>

Li, X., Guo, L., Liu, Y., Su, Y., Xie, Y., Du, J., Zhou, J., Ding, G., Wang, H., Bai, Y., & Liu, Y. (2017b). MicroRNA-21 promotes osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells via the Smad7-Smad1/5/8-Runx2 pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 493(2), 928–933. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.119>

* Liu, J., Gao, J., Liang, Z., Gao, C., Niu, Q., Wu, F., & Zhang, L. (2022). Mesenchymal stem cells and their microenvironment. *Stem Cell Research & Therapy*, 13(1), 429. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02985-y>

Liu, S.-Y., He, Y.-B., Deng, S.-Y., Zhu, W.-T., Xu, S.-Y., & Ni, G.-X. (2017). Exercise affects biological characteristics of mesenchymal stromal cells derived from bone marrow and adipose tissue. *International Orthopaedics*, 41, 1199-1209. <https://doi.org/10.1007/s00264-017-3441-2>

Marędziak, M., Śmieszek, A., Chrzęstek, K., Basinska, K., & Marycz, K. (2015). Physical Activity Increases the Total Number of Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, Enhances Their Osteogenic Potential, and Inhibits Their Adipogenic Properties. *Stem Cells International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/379093>

Marycz, K., Mierzejewska, K., Umieszek, A., Suszynska, E., Malicka, I., Kucia, M., & Ratajczak, M. Z. (2016). Endurance Exercise Mobilizes Developmentally Early Stem Cells into Peripheral Blood and Increases Their Number in Bone Marrow: Implications for Tissue Regeneration. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5756901>

Massoto, T. B., Santos, A. C. R., Ramalho, B. S., Almeida, F. M., Martinez, A. M. B., & Marques, S. A. (2020). Mesenchymal stem cells and treadmill training enhance function and promote tissue preservation after spinal cord injury. *Brain Research*, 1726. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146494>

McClain-Caldwell, I., Vitale-Cross, L., Mayer, B., Krepuska, M., Boyajian, M., Myneni, V., Martin, D., Marko, K., Nemeth, K., & Mezey, E. (2018). Immunogenic potential of human bone marrow mesenchymal stromal cells is enhanced by hyperthermia. *Cytotherapy*, 20(12), 1437–1444. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2018.10.002>

* Mohamad, S. A., Milward, M. R., Hadis, M. A., Kuehne, S. A., & Cooper, P. R. (2021). Photobiomodulation of mineralisation in mesenchymal stem cells. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 20(5), 699–714. <https://doi.org/10.1007/S43630-021-00047-5/TABLES/2>

* Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23-38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>

Pasternak-Mnich, K., Ziembra, B., Szwed, A., Kopacz, K., Synder, M., Bryszewska, M., & Kujawa, J. (2019). Effect of Photobiomodulation Therapy on the Increase of Viability and Proliferation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Lasers in Surgery and Medicine*, 51(9), 824–833. <https://doi.org/10.1002/lsm.23107>

Peier, A. M., Moqrich, A., Hergarden, A. C., Reeve, A. J., Andersson, D. A., Story, G. M., Earley, T. J., Dragoni, I., McIntyre, P., Bevan, S., & Patapoutian, A. (2002). A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell*, 108, 705–715. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00652-9)

* Rubin, J., Styner, M., & Uzer, G. (2018). Physical Signals May Affect Mesenchymal Stem Cell Differentiation via Epigenetic Controls. *Exercise and Sport Sciences Reviews*, 46(1), 42–47. <https://doi.org/10.1249/JES.0000000000000129>

* Samsonraj, R. M., Raghunath, M., Nurcombe, V., Hui, J. H., van Wijnen, A. J., & Cool, S. M. (2017). Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(12), 2173. <https://doi.org/10.1002/SCTM.17-0129>

* Sbrana, F. V., Cortini, M., Avnet, S., Perut, F., Columbaro, M., De Milito, A., & Baldini, N. (2015). The Role of Autophagy in the Maintenance of Stemness and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12, 621-633. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9690-4>

Schellenberg, A., Lin, Q., Schüler, H., Koch, C. M., Jousen, S., Denecke, B., Walenda, G., Pallua, N., Suschek, C. V., Zenke, M., & Wagner, W. (2011). Replicative senescence of mesenchymal stem cells causes DNA-methylation changes which correlate with repressive histone marks. *Aging (Albany NY)*, 3(9), 873. <https://doi.org/10.18632/AGING.100391>

Schmidt, A., Bierwirth, S., Weber, S., Platen, P., Schinköthe, T., & Bloch, W. (2009). Short intensive exercise increases the migratory activity of mesenchymal stem cells. *British Journal of Sports Medicine*, 43(3), 195–198. <https://doi.org/10.1136/bjism.2007.043208>

Schmidt, A., Ladage, D., Schinköthe, T., Klausmann, U., Ulrichs, C., Klinz, F., Brixius, K., Arnhold, S., Desai, B., Mehlhorn, U., Schwinger, R. H. G., Staib, P., Addicks, K., Bloch, W., Schinköthe, T., Schinköthe, S., & Klinz, F.-J. (2006). Basic Fibroblast Growth Factor Controls Migration in Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells*, 24(7), 1750-1758. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0191>

Schoolmeesters, A., Eklund, T., Leake, D., Vermeulen, A., Smith, Q., Aldred, S. F., & Fedorov, Y. (2009). Functional profiling reveals critical role for miRNA in differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*, 4(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005605>

Shui, C., & Scutt, A. (2001). Mild Heat Shock Induces Proliferation, Alkaline Phosphatase Activity, and Mineralization in Human Bone Marrow Stromal Cells and Mg-63 Cells In Vitro. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(4), 731-741. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.4.731>

* Smith, N., Shirazi, S., Cakouros, D., & Gronthos, S. (2023). Impact of Environmental and Epigenetic Changes on Mesenchymal Stem Cells during Aging. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(7), 6499. <https://doi.org/10.3390/IJMS24076499>

* Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M., & Marini, F. (2008). Inflammation and tumor microenvironments: Defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene therapy*, 15(10), 730-738. <https://doi.org/10.1038/gt.2008.39>

Stolzing, A., & Scutt, A. (2006a). Age-related impairment of mesenchymal progenitor cell function. *Aging Cell*, 5(3), 213–224. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2006.00213.x>

Stolzing, A., & Scutt, A. (2006b). Effect of reduced culture temperature on antioxidant defences of mesenchymal stem cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(2), 326–338. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.018>

- Takagi, R., Takegaki, J., Osana, S., Kano, Y., Konishi, S., & Fujita, S. (2023). Cooling-promoted myogenic differentiation of murine bone marrow mesenchymal stem cells through TRPM8 activation in vitro. *Physiological Reports*, 11(23). <https://doi.org/10.14814/phy2.15855>
- Tamimi, R., Mahmoodi, N. M., Samadikhah, H. R., Tackallou, S. H., Benisi, S. Z., & Boroujeni, M. E. (2022). Anti-inflammatory effect of green photobiomodulation in human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Lasers in Medical Science*, 37(9), 3693–3703. <https://doi.org/10.1007/s10103-022-03654-5>
- Tirza, G., Solodeev, I., Sela, M., Greenberg, I., Pasmanik-Chor, M., Gur, E., & Shani, N. (2020). Reduced culture temperature attenuates oxidative stress and inflammatory response facilitating expansion and differentiation of adipose-derived stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 11, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1542-0>
- Uzer, G., Thompson, W. R., Sen, B., Xie, Z., Yen, S. S., Miller, S., Bas, G., Styner, M., Rubin, C. T., Judex, S., Burridge, K., & Rubin, J. (2015). Cell mechanosensitivity to extremely low-magnitude signals is enabled by a LINCed nucleus. *Stem Cells*, 33(6), 2063–2076. <https://doi.org/10.1002/stem.2004>
- Valenti, M. T., Deiana, M., Cheri, S., Dotta, M., Zamboni, F., Gabbiani, D., Schena, F., Carbonare, L. D., & Mottes, M. (2019). Physical Exercise Modulates miR-21-5p, miR-129-5p, miR-378-5p, and miR-188-5p Expression in Progenitor Cells Promoting Osteogenesis. *Cells*, 8(7), 742. <https://doi.org/10.3390/cells8070742>
- Vaquero, A., Scher, M., Lee, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Reinberg, D. (2004). Human SirT1 Interacts with Histone H1 and Promotes Formation of Facultative Heterochromatin. *Molecular Cell*, 16(1), 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.031>
- Varela-Nieto, I., Gabrielli, B., Bischof, O., Schlesinger, S., Shimoni, C., Goldstein, M., Ribarski-Chorev, I., Schauten, I., Nir, D., & Strauss, C. (2020). Heat Shock Alters Mesenchymal Stem Cell Identity and Induces Premature Senescence. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 565970. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.565970>
- Wang, C., Shan, S., Wang, C., Wang, J., Li, J., Hu, G., Dai, K., Li, Q., & Zhang, X. (2017a). Mechanical stimulation promote the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells

through epigenetic regulation of Sonic Hedgehog. *Experimental Cell Research*, 352(2), 346-356. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.02.021>

Wang, Y., Chen, T., Yan, H., Qi, H., Deng, C., Ye, T., Zhou, S., & Li, F. R. (2013). Role of histone deacetylase inhibitors in the aging of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(10), 2231–2239. <https://doi.org/10.1002/jcb.24569>

Wang, Y., Huang, Y.-Y., Wang, Y., Lyu, P., & Hamblin, M. R. (2016). Photobiomodulation (blue and green light) encourages osteoblastic-differentiation of human adipose-derived stem cells: role of intracellular calcium and light-gated ion channels. *Scientific reports*, 6(1), 33719. <https://doi.org/10.1038/srep33719>

Wang, Y., Huang, Y.-Y., Wang, Y., Lyu, P., & Hamblin, M. R. (2017b). Red (660 nm) or near-infrared (810 nm) photobiomodulation stimulates, while blue (415 nm), green (540 nm) light inhibits proliferation in human adipose-derived stem cells. *Scientific reports*, 7(1), 7781. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07525-w>

Wu, J. Y., Chen, C. H., Wang, C. Z., Ho, M. L., Yeh, M. L., & Wang, Y. H. (2013). Low-Power Laser Irradiation Suppresses Inflammatory Response of Human Adipose-Derived Stem Cells by Modulating Intracellular Cyclic AMP Level and NF- κ B Activity. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054067>

Wu, J. Y., Wang, Y. H., Wang, G. J., Ho, M. L., Wang, C. Z., Yeh, M. L., & Chen, C. H. (2012). Low-Power GaAlAs Laser Irradiation Promotes the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Stem Cells via IGF1 and BMP2. *PLoS ONE*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044027>

Xiao, W. Z., Gu, X. C., Hu, B., Liu, X. W., Zi, Y., & Li, M. (2016). Role of microRNA-129-5p in osteoblast differentiation from bone marrow mesenchymal stem cells. *Cellular and Molecular Biology*, 62(3), 95–99. <https://doi.org/10.14715/cmb/2016.62.3.16>

Yang, D., Yi, W., Wang, E., & Wang, M. (2016). Effects of light-emitting diode irradiation on the osteogenesis of human umbilical cord mesenchymal stem cells in vitro. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep37370>

* Yao, Q., Chen, Y., & Zhou, X. (2019). The roles of microRNAs in epigenetic regulation. *Current opinion in chemical biology*, 51, 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.01.024>

Ye, L., Fan, Z., Yu, B., Chang, J., Al Hezaimi, K., Zhou, X., Park, N. H., & Wang, C. Y. (2012). Histone demethylases KDM4B and KDM6B promotes osteogenic differentiation of human MSCs. *Cell Stem Cell*, 11(1), 50–61. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.04.009>

Yin, K., Zhu, R., Wang, S., & Zhao, R. C. (2017). Low level laser (LLL) attenuate LPS-induced inflammatory responses in mesenchymal stem cells via the suppression of NF- κ B signaling pathway in vitro. *PLoS ONE*, 12(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179175>

Zaidi, S. K., Sullivan, A. J., Medina, R., Ito, Y., Van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Lian, J. B., & Stein, G. S. (2004). Tyrosine phosphorylation controls Runx2-mediated subnuclear targeting of YAP to repress transcription. *EMBO Journal*, 23(4), 790–799. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600073>

Zhang, L., Yuan, Y., Wu, W., Sun, Z., Lei, L., Fan, J., Gao, B., & Zou, J. (2020). Medium-Intensity Treadmill Exercise Exerts Beneficial Effects on Bone Modeling Through Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.600639>

* Zhang, Y., Sun, Z., Jia, J., Du, T., Zhang, N., Tang, Y., Fang, Y., Fang, D. (2021). Overview of histone modification. *Histone Mutations and Cancer*, 1-16. https://doi.org/10.1007/978-981-15-8104-5_1

Zhang, Z., Huang, S., Wu, S., Qi, J., Li, W., Liu, S., Cong, Y., Chen, H., Lu, L., Shi, S., Wang, D., Chen, W. J., & Sun, L. (2019). Clearance of apoptotic cells by mesenchymal stem cells contributes to immunosuppression via PGE2. *EBioMedicine*, 45, 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.016>

Zhu, C., Ding, H., Shi, L., Zhang, S., Tong, X., Huang, M., Liu, L., Guan, X., Zou, J., Yuan, Y., & Chen, X. (2023). Exercise improved bone health in aging mice: a role of SIRT1 in regulating autophagy and osteogenic differentiation of BMSCs. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1156637. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2023.1156637/BIBTEX>

Zhu, T., Wu, Y., Zhou, X., Yang, Y., & Wang, Y. (2019). Irradiation by blue light-emitting diode enhances osteogenic differentiation in gingival mesenchymal stem cells in vitro. *Lasers in Medical Science*, 34(7), 1473–1481. <https://doi.org/10.1007/s10103-019-02750-3>

Sekundární zdroje a review jsou označeny *