



## Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu

**APVV-19-0193**

**Noví hráči v nanoterapii neurodegeneračných ochorení: kondicionované médium (KM) a extracelulárne vezikuly (EV) somatických kmeňových buniek**

Zodpovedný riešiteľ **prof. MVDr. Daša Čížková, DrSc.**

Príjemca **Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach.

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Laboratoire PRISM - Unité Inserm 1192 Université de Lille (prof. Michel Salzet),  
Francúzsko.

### Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

Z výsledkov projektu doposiaľ neboli podané patentové prihlášky, ani úžitkové vzory.

### Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1. V3 / ADC HUDÁKOVÁ, Nikola - MUDROŇOVÁ, Dagmar- MARCINČÁKOVÁ, Dana - SLOVINSKÁ, Lucia - MAJEROVÁ, Petra - MALOVESKÁ, Marcela - PETROUŠKOVÁ, Patrícia - HUMENÍK, Filip - ČÍŽKOVÁ, Dáša. The role of primed and non-primed MSC-derived conditioned media in neuroregeneration. In Frontiers in molecular neuroscience. ISSN 1662-5099, 2023, vol. 16, no., art. no. 1241432, p. [1-15].
2. V3 / ADC CAPUZ, Alice - SYLVAIN, Osien - KARNOUB, Melodie Anna - ABOULOUIARD, Soulaïmane - LAURENT, Estelle - COYAUD, Etienne - RAFFO-ROMERO, Antonella - DUHAMEL, Marie - BONNEFOND, Amélie - DERHOURHI, Mehdi - TREROTOLA, Marco - YAZIDI-BELKOURA, Ikram EI - DEVOS, David - ŽILKOVÁ, Monika - KOBIESSY, Firas - VANDEN ABEELE, Fabien - FOURNIER, Isabelle - ČÍŽKOVÁ, Dáša - RODET, Franck - SALZET, Michel. Astrocytes express aberrant immunoglobulins as putative gatekeeper of astrocytes to neuronal progenitor conversion. In Cell death and disease. ISSN 2041-4889, 2023, vol. 14, no. 4, art. no. 237, p. [1-16]. (2022: 9.0 IF, 9.2 - IF 5y, Q1 - JCR Best Q)
3. V3 / ADC HUMENÍK, Filip - MALOVESKÁ, Marcela - HUDÁKOVÁ, Nikola - PETROUŠKOVÁ, Patrícia - ŠUFLIARSKA, Zuzana - HORŇÁKOVÁ, Ľubica - VALENČÁKOVÁ, Alexandra - KOŽÁR, Martin - ŠÍŠKOVÁ, Barbora - MUDROŇOVÁ, Dagmar - BARTKOVSKÝ, Martin - ČÍŽKOVÁ, Dáša. Impact of canine amniotic mesenchymal stem cell conditioned media on the wound healing process: In vitro and in vivo study. In International Journal of Molecular Sciences. ISSN 1422-0067, 2023, vol. 24, no. 9, art. no. 8214, p. [1-14]. (2022: 5.6 - IF, 6.2 - IF 5y, Q1 - JCR Best Q)

4. V3 / ADC CAPUZ, Alice - SYLVAIN, Osien - CARDON, Tristan - KARNOUB, Melodie Anna - ABOULOUARD, Soulaïmane - RAFFO-ROMERO, Antonella - DUHAMEL, Marie - ČÍŽKOVÁ, Dáša - TREROTOLA, Marco - DEVOS, David - KOBEISSY, Firas - VAN DEN ABELLE, Fabien - BONNEFOND, Amélie - FOURNIER, Isabelle - RODET, Franck - SALZET, Michel. Heimdall, an alternative protein issued from a ncRNA related to kappa light chain variable region of immunoglobulins from astrocytes: a new player in neural proteome. In Cell death and disease. ISSN 2041-4889, 2023, vol. 14, no. 8, art. no. 526, p. [1-23]. (2022: 9.0 IF, 9.2 - IF 5y, Q1 - JCR Best Q)
  5. V3 / ADC MALLAH, Khalil - ZIBARA, Kazem - KERBAJ, Coline - EID, Ali - KHOSHMAN, Nour - OUSSEILY, Zahraa - KOBIESSY, Abir - CARDON, Tristan - ČÍŽKOVÁ, Dáša - KOBIESSY, Firas - FOURNIER, Isabelle - SALZET, Michel. Neurotrauma investigation through spatial omics guided by mass spectrometry imaging: Target identification and clinical applications. In Mass spectrometry reviews. ISSN 0277-7037, 2023, vol. 42, no. 1, p. 189-205. (2022: 6.7 - IF, 8.1 - IF 5y, Q1 - JCR Best Q).
  6. V3 / ADF HUDÁKOVÁ, Nikola - MALOVESKÁ, Marcela - PETROUŠKOVÁ, Patrícia - HUMENÍK, Filip - ČÍŽKOVÁ, Dáša. Nová generácia liečiv na báze kmeňových buniek. In Folia Pharmaceutica Cassoviensia. ISSN 2585-9609, 2023, roč. 5, č. 2, s. 71-83.
  7. V3 / ADC HUMENÍK, Filip - MALOVESKÁ, Marcela - HUDÁKOVÁ, Nikola - PETROUŠKOVÁ, Patrícia - HORŇÁKOVÁ, Ľubica - DOMANIŽA, Michal - MUDROŇOVÁ, Dagmar - BODNÁROVÁ, Simona - ČÍŽKOVÁ, Dáša. A comparative study of canine mesenchymal stem cells isolated from different sources. In Animals. ISSN 2076-2615, 2022, vol. 12, no. 12, art. no. 1502, p. [1-13]. (2021: 3.231 - IF, 3.312 - IF 5y, 43 - H-index, 0.610 - SJR, Q1 - SJR Best Q, Q1 - JCR Best Q).
  8. V3/ ADD HUMENÍK, Filip - JEGO, Sonia - HORŇÁKOVÁ, Ľubica - MALOVESKÁ, Marcela - VALENČÁKOVÁ, Alexandra - VIKARTOVSKÁ, Zuzana - MUDROŇOVÁ, Dagmar - HUDÁKOVÁ, Nikola - ŽILKOVÁ, Monika - ČÍŽEK, Milan - ČÍŽKOVÁ, Dáša. Impact of mesenchymal stem cells derived conditioned media on neural progenitor cells. In General Physiology and Biophysics. ISSN 0231-5882, 2021, vol. 40, no. 6, p. 551-559. (2020: 1.512 - IF, 1.650 - IF 5y, 39 - H-index, 0.376 - SJR, Q3 - SJR Best Q, Q4 - JCR Best Q).
  9. V3/ ADM SYKOVÁ, Eva - ČÍŽKOVÁ, Dáša - KUBINOVÁ, Šárka. Mesenchymal stem cells in treatment of spinal cord injury and amyotrophic lateral sclerosis. In Frontiers in cell and developmental biology. ISSN 2296-634X, 2021, vol. 9, no., art. no. 695900, p. [1-17]. (2020: 6.684 - IF, 7.219 - IF 5y, 53 - H-index, 2.452 - SJR, Q1 - SJR Best Q, Q1 - JCR Best Q).
  10. V3/ ADC VIKARTOVSKÁ, Zuzana - FARBÁKOVÁ, Jana - SMOLEK, Tomáš - HANES, Jozef - ŽILKA, Norbert - HORŇÁKOVÁ, Ľubica - HUMENÍK, Filip - MALOVESKÁ, Marcela - HUDÁKOVÁ, Nikola - ČÍŽKOVÁ, Dáša. Novel diagnostic tools for identifying cognitive impairment in dogs: behavior, biomarkers, and pathology. In Frontiers in veterinary science. ISSN 2297-1769, 2021, vol. 7, no., art. no. 551895, p. [1-13]. (2020: 3.412 - IF, 3.588 - IF 5y, 31 - H-index, 0.877 - SJR, Q1 - SJR Best Q, Q1 - JCR Best Q).
  11. V3/ ADD BAČIAK, Ladislav - MELICHERČÍK, Ľubomír - MATÉ, Veronika - MURGOČI, Adriana - Natalia - SMOLEK, Tomáš - JURÁNEK, Ivo - GOGOLA, Daniel - HUDÁKOVÁ, Nikola - ČÍŽEK, Milan - ČÍŽKOVÁ, Dáša. Improved tissue integrity after alginate treatment in rat spinal cord injury: evidence from ex vivo diffusion tensor imaging. In General Physiology and Biophysics. ISSN 0231-5882, 2021, vol. 40, no. 6, p. 561-568. (2020: 1.512 - IF, 1.650 - IF 5y, 39 - H-index, 0.376 - SJR, Q3 - SJR Best Q, Q4 - JCR Best Q).
  12. V3/ADC Stem cell conditioned medium treatment for canine spinal cord injury: pilot feasibility study / Zuzana Vikartovská, Mária Kuricová, Jana Farbáková, Tomáš Lipták, Dagmar Mudroňová, Filip Humeník, Aladár Mađari, Marcela Maloveská, Eva Syková, Dáša Čížková. In International Journal of Molecular Sciences. - ISSN 1422-0067. - Vol. 21, no. 14 (2020), art. no. 5129, p. [1-21]. (4.556 - IF2019).
  13. V3/ADM Dobroslava Bujňáková, Anna Čuvalová, Milan Čížek, Filip Humeník, Michel Salzet, Dáša Čížková. Canine bone marrow mesenchymal stem cell conditioned media affect bacterial growth, biofilm-associated Staphylococcus aureus and AHL-dependent quorum sensing / In Microorganisms. - ISSN 2076-2607. - Vol. 8, no. 10 (2020), art. no. 1478, p. [1-14]. (4.152 - IF2019).
- Pozvané prednášky: prof. MVDr. Dasa Cizkova, DrSc.  
Švajčiarsko:

TESCT 2023-Gruyère-Switzerland, 11th Workmeeting, April 15, 2023  
(TransEuropeanStemCellTherapy-Society Bern London Chennei)  
„Canine models in neurodegenerative diseases for translational research“  
Česká republika: Praha  
BIOCEV Regeneration II, 7th of June, 2022 - V4RM Praha  
Bridging the gap between science, education and enterprise in regenerative medicine  
„Stem cell-based therapies in veterinary medicine: from experiments to a clinic“.

### **Uplatnenie výsledkov projektu**

Originálne výsledky nášho výskumu významne rozširujú poznatky v oblasti pochopenia neuroprotektívnych mechanizmov a využitia acelulárnej terapie, ktorá môže byť vhodnou náhradou bunkovej terapie vo veterinárnej medicíne. V našich klinických pilotných štúdiách pri liečbe neurodegenerácie, poranení mäkkých tkanív (nehojacie sa rany, syndróm suchého oka, rohovkové vredy) sme využili acelulárnu terapiu, ktorá bola špecificky selektovaná vzhľadom na zdroj pôvodných buniek, obsahové zloženie proteómu KM (trofické, imunomodulačné, protektívne faktory), aby cielene ovplyvnila dominantné patologické procesy jednotlivých ochorení. Tieto atribúty veľkou mierou prispeli k úspešnosti terapie, ktorá pri optimálnej stratifikácii má veľkú perspektívu uplatnenia sa primárne v rámci experimentálnej liečby malých zvierat, v prípade neúspešnej konvenčnej terapie. Pri rozšírení acelulárnej terapie na väčší počet psov je vysoká pravdepodobnosť štandardizácie tejto terapie a uvedenie do bežnej veterinárnej praxe.

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)**

Získali sme originálne výsledky, ktoré potvrdili určité rozdiely z hľadiska výťažnosti, expanzie kaninných mezenchýmových kmeňových buniek (MSC) neonatálneho a dospelého pôvodu, ale aj obsahu ich bioaktívnych látok v kondicionovaných médiách (KM). Podľa našich analýz amniotické membrány novorodencov predstavujú najbohatší zdroj MSC, avšak najvyššiu proliferačnú aktivitu sme zaznamenali v populácii MSC izolovanej z tuku. Pri posúdení proteomického profilu KM získaného z amniotických MSC (AM-MSC), tukových MSC (AT-MSC) a MSC kostnej drene (BM-MSC), sme zistili mierne rozdiely v obsahu trofických faktorov s protektívnymi, regeneračnými, ale aj s antimikrobiálnymi účinkami. Naše výsledky patria k prvým, potvrdzujúc antimikrobiálny potenciál KM získaného z kaninných BM-MSC, ktoré inhibovalo rast niektorých vybraných baktérií, dokázalo znížiť kapacitu tvorby biofilmu a blokoval produkciu faktorov virulencie. Významné zvýšenie obsahu niektorých trofických faktorov v KM (z AT-MSC) sa nám podarilo dosiahnuť stimuláciou s INF- $\gamma$  (priming). Ich biologickú funkčnosť sme potvrdili in vitro analýzami, kde sme zdokumentovali protizápalové účinky KM, ktoré redukovalo IFN- $\gamma$  indukované zápalové mechanizmy v neuroblastómovej línii SH-SY5Y. Navyše, po mechanickom poškodení SH-SY5Y, pridanie KM do kultivačného média zvýšilo migráciu buniek, prerastanie neuritov a urýchlilo regeneráciu. Na základe in vitro analýz sme dospeli k názoru, že účinnosť acelulárnej terapie súvisí s výberom KM a jeho optimálnym trofickým a imunomodulačným profilom, ktorý by mal byť zacielený na špecifické regeneračné procesy daného ochorenia. V rámci animálnych experimentov naše počiatočné výsledky poukazujú na využitie neurofilamentového proteínu s ľahkým reťazcom (NFL) ako biomarkera neurodegenerácie u psov so zníženými kognitívnymi funkciami. V prípade psov s chronickým poranením miechy sme potvrdili, že viacnásobné podanie KM (BM-MSC/ AT-MSC) bolo bezpečné a priaznivo ovplyvnilo obnovu motorických funkcií v kombinácii s cieľovou fyzioterapiou. Podobne sme sledovali benefičné účinky KM neonatálneho pôvodu (AM-MSC) aj pre účely hojenia rán a liečby ochorení oka (trauma rohovky, suché oko) a pri liečbe osteochondrálnych defektov. Vzhľadom na priaznivé regeneračné účinky KM, detegované v klinickom prostredí u psov po poranení miechy a mäkkých tkanív, budú potrebné rozsiahlejšie štúdie zamerané na pochopenie mechanizmov neuroregeneratívneho účinku, imunitnej odozvy a interakcií v rámci mikroprostredia.

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)**

We obtained original results that confirmed certain differences in yield, expansion of canine mesenchymal stem cells (MSC) of neonatal and adult origin, and the content of their

bioactive molecules in conditioned media (CM). According to our analyses, the amniotic membranes of newborns represent the richest source of MSCs, however, we recorded the highest proliferative activity in the MSC population isolated from adipose tissue. When assessing the proteomic profile of CM obtained from amniotic MSCs (AM-MSCs), adipose MSCs (AT-MSCs), and bone marrow MSCs (BM-MSCs), we found slight differences in the content of factors with trophic, protective, regenerative but also antimicrobial effects. Our results are among the first to confirm the antimicrobial potential of CM obtained from canine BM-MSCs, which inhibited the growth of selected bacteria, reduced the biofilm formation capacity, and blocked the production of virulence factors. We achieved a significant increase in the content of some trophic factors in CM (AT-MSC) by stimulation with INF- $\gamma$  (priming). We confirmed their biological functionality by in vitro analyses, where we documented the anti-inflammatory effects of CM, which reduced IFN- $\gamma$  induced inflammatory mechanisms in the SH-SY5Y neuroblastoma line. Furthermore, after mechanical injury of SH-SY5Y, the addition of CM to the culture medium increased cell migration, neurite outgrowth and accelerated regeneration. Based on in vitro analyses, we came to the opinion that the effectiveness of acellular therapy is related to the choice of CM and its optimal trophic and immunomodulating profile, which should be targeted at the specific regenerative processes of the given disease. In animal experiments, our initial results suggest the use of neurofilament light chain protein (NFL) as a biomarker of neurodegeneration in dogs with cognitive dysfunction. In the case of dogs with chronic spinal cord injury, we confirmed that multiple administration of BM (BM-MSC/ AT-MSC) was safe and had a beneficial effect on the recovery of motor functions in combination with targeted physiotherapy. Similarly, we monitored the beneficial effects of CM of neonatal origin (AM-MSC) also for the purposes of wound healing and treatment of eye diseases (corneal trauma, dry eye), and in the treatment of osteochondral defects. Considering the beneficial regenerative effects of CM detected in the clinical setting in dogs after spinal cord and soft tissue injury, more extensive studies aimed at understanding the mechanisms of the neuroregenerative effect, immune response and interactions within the microenvironment will be necessary.