

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Slavko B. Mojsilović

**UTICAJ INTERLEUKINA-17 NA MEZENHIMSKE
MATIČNE ĆELIJE KOSTNE SRŽI MIŠA U
IN VITRO USLOVIMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

SCHOOL OF MEDICINE

Slavko B. Mojsilović

**EFFECTS OF INTERLEUKIN-17 ON MOUSE
BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL
STEM CELLS *IN VITRO***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014

Mentor:

Prof. dr Vladimir Trajković, vanredni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Komentor:

Dr Diana Bugarski, naučni savetnik Instituta za medicinska istraživanja
Univerziteta u Beogradu

Članovi komisije:

Prof. dr Dušan Popadić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Aleksandra Isaković, vanredni profesor Medicinskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

Dr Aleksandra Jauković, naučni saradnik Instituta za medicinska istraživanja
Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane doktorske disertacije:

Ova disertacija je u potpunosti urađena u Laboratoriji za eksperimentalnu hematologiju i matične ćelije Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, u okviru projekta osnovnih istraživanja br. 175062, pod nazivom „Regenerativni i modulatorni potencijal adultnih matičnih ćelija“, finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Mojoj Sonji i našoj Minji

Svom mentoru, prof. dr Vladimiru Trajkoviću, koji me je još od studentskih dana inspirisao i značajno uticao na moje profesionalno usmerenje, dugujem veliku zahvalnost na ukazanom poverenju i pruženom zadovoljstvu da saradujem sa njim.

Veliku zahvalnost dugujem svom šefu i komentoru, dr Diani Bugarski, na dugogodišnjem poverenju i pruženoj mogućnosti da radim u jednom od najaktuelnijih polja biomedicinskih nauka.

Zahvalan sam na velikom strpljenju, svesrdnoj i kontinuiranoj pomoći, konstruktivnim razgovorima i dobronamernim sugestijama u svakoj fazi, od uobličavanja teme do finalne izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se članovima komisije, prof. dr Dušanu Popadiću i prof. dr Aleksandri Isaković, na konkretnim sugestijama i neprocenjivoj pomoći oko konačnog oblikovanja disertacije.

Posebno se zahvaljujem članu komisije, kolegici i prijatelju, dr Aleksandri Jauković, na predusretljivosti, dragocnim savetima i praktičnoj pomoći u izradi ove disertacije.

Svojim kolegama na Institutu za medicinska istraživanja, posebno dr Huanu Santibanjezu, dr Vesni Ilić, dr Jeleni Krstić i Drenki Trivanović, dugujem iskrenu zahvalnost za nesebičnu pomoć u radu, korisne savete i konstruktivne diskusije koji su neizmerno doprineli kvalitetu i uspešnom završetku disertacije. Takođe se zahvaljujem Snežani Marković na nezamenljivoj tehničkoj pomoći i podršci.

Svojim roditeljima i bratu Bojanu se najtoplije zahvaljujem na beskrajnoj ljubavi i bezrezervnoj podršci koju su mi pružali u svim mojim profesionalnim i životnim usmerenjima.

Mojim najmilijima, Sonji i Minji, mojim životnim inspiracijama, dugujem beskrajnu zahvalnost za svu ljubav i oslonac koji mi pružaju u životu.

UTICAJ INTERLEUKINA-17 NA MEZENHIMSKE MATIČNE ĆELIJE KOSTNE SRŽI MIŠA U *IN VITRO* USLOVIMA

Slavko B. Mojsilović

REZIME

Mezenhimske matične ćelije (MSC) pripadaju populaciji multipotentnih adultnih matičnih ćelija koje se nalaze u mnogim tkivima gde ostvaruju važne uloge u održavanju homeostaze. Zahvaljujući višestrukome potencijalu u regeneraciji tkiva, regulaciji hematopoeze i imunomodulaciji, kao i relativno lakoj dostupnosti iz raznih adultnih i perinatalnih tkiva, intenzivirana su istraživanja kako osnovne biologije MSC, tako i ona usmerena ka mogućnosti njihove terapijske primene. Iako je u poslednjoj deceniji došlo do značajnog i brzog napretka u razumevanju njihove prirode, raznovrsnih funkcija i mehanizama njihovog delovanja, još smo daleko od rasvetljavanja nekih osnovnih pitanja ključnih za njihovu efikasnu i bezbednu kliničku primenu. Poslednjih godina se sve više uviđa značaj lokalne mikrosredine u usmeravanju MSC ka obavljanju mnogobrojnih i često suprotstavljenih funkcija. Interleukin-17 (IL-17) je plejotropni citokin sa značajnim ulogama u mnogim fiziološkim i patološkim procesima organizma, poput inflamacije, imunskog odgovora i regulacije hematopoeze. IL-17 svoje efekte ostvaruje uglavnom indirektno, delujući na stromalne ćelije, modulišući u njima ekspresiju različitih solubilnih i membranskih faktora. Iako su istraživanja uticaja IL-17 na proliferaciju i diferencijaciju humanih i mišjih MSC započeta, mnogi efekti, poput uticaja na regulatornu ulogu ovih ćelija u hematopoezi i imunskom odgovoru, kao i mehanizmi i značaj njegovog delovanja na MSC, još nisu dovoljno ispitani.

Cilj ovog istraživanja bio je da se izoluju i okarakterišu MSC iz kostne srži miša (mBM-MSC) i utvrdi efekat IL-17 na fenotipske karakteristike, sposobnost višelinijske diferencijacije, proliferaciju, kapacitet održavanja hematopoeze i imunomodulatorne sposobnosti ovih ćelija. Takođe, ispitivani su i mehanizmi delovanja IL-17 na

mBM-MSC, uključujući aktivaciju signalnih puteva i ulogu NO kao posrednika u ovim efektima.

Iz kostne srži miševa CBA soja uspešno su izolovane i u prisustvu baznog fibroblastnog faktora rasta (bFGF) umnožene mBM-MSC koje su pokazivale karakteristike MSC u skladu sa kriterijumima Komiteta za mezenhimske matične ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju: adhezivnost za plastiku, ekspresiju karakterističnih mezenhimijskih markera (endoglin, vimentin, α -SMA, fibronektin, Stro-1 i Snail1), odsustvo hematopoetskih linijskih markera (CD5, CD45R/B220, CD11b, Gr-1, TER-119 i 7/4) i sposobnost diferencijacije u pravcu hondroblasta, osteoblasta, adipocita i miofibroblasta. Nakon utvrđivanja ispoljenosti receptora za IL-17 na ovim ćelijama, pokazano je da IL-17 ne utiče na osnovne osobine koje određuju mBM-MSC, poput imunofenotipskih karakteristika i potencijala za višelinijску diferencijaciju. Ispitivanjem uticaja IL-17 na proliferaciju i klonogeni potencijal mBM-MSC utvrđeno je da ovaj citokin dovodi do dozno zavisnog povećanja proliferacije mBM-MSC, kako sam, tako i u kombinaciji sa bFGF. Analizom fosforilacije protein tirozin kinaza (PTK) i mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK), kao i korišćenjem specifičnih inhibitora ovih signalnih puteva, utvrđeno je da se efekti IL-17 i bFGF na proliferaciju mBM-MSC ostvaruju preko p38 i ERK MAPK, dok PTK i JNK MAPK nemaju značajnu ulogu u ovom procesu. Uspešnim uspostavljanjem sistema dugotrajne kulture kostne srži, pokazano je da su mBM-MSC sposobne da održavaju hematopoetske ćelije u kulturi duže od tri nedelje. IL-17 je pozitivno uticao na ovu sposobnost mBM-MSC, što se ogledalo u većem broju kako ukupnih neadherentnih ćelija, tako i opredeljenih progenitora i morfološki prepoznatljivih prekursora hematopoeze u kokulturi sa IL-17 pretretiranim mBM-MSC, u odnosu na kontrolne, netretirane mBM-MSC. Na moguću ulogu NO kao posrednika preko kojeg IL-17 ostvaruje svoje dejstvo na ćelije hematopoeze ukazuje povećana ekspresija gena za endotelnu NO sintazu (eNOS) u mBM-MSC pod uticajem ovog citokina. Imunomodulatorni potencijal mBM-MSC, kao i uticaj IL-17 na ovu sposobnost mBM-MSC, nije pokazan u kokulturama sa mitogenom stimulisanim singenim ćelijama slezine, ali su mBM-MSC značajno suprimirale kako mitogenom stimulisanu proliferaciju humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi, tako i aloantigenom stimulisanu proliferaciju u mešanoj limfocitnoj reakciji.

Dobijeni podaci ističu kompleksnost biologije MSC i njihove interakcije sa faktorima mikrosredine, kao i specifičnost mišjih u odnosu na humane sisteme, otvarajući put za dalja istraživanja u cilju pronalaženja najboljih modaliteta potencijalne primene ovih ćelija u terapijske svrhe.

KLJUČNE REČI: Mezenhimske matične ćelije, interleukin-17, miš, kostna srž, proliferacija, hematopoeza, imunomodulacija

NAUČNA OBLAST: Medicina

UŽA NAUČNA OBLAST: Imunologija

UDK: 616-097-092.9:577.112.85:576.32 (043.3)

EFFECTS OF INTERLEUKIN-17 ON MOUSE BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS *IN VITRO*

Slavko B. Mosjilović

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent adult stem cells that are found in many tissues where they play an important role in maintaining the tissue homeostasis. Due to their enormous potential in tissue regeneration, regulation of hematopoiesis, and immunomodulation, as well as the fact that they are readily available from numerous adult and perinatal tissues, MSCs have been in the focus of basic and clinical research in the last few decades. Although a significant and rapid progress in understanding the nature, various functions, and mechanisms of action of MSCs has been made during the last decade, we are still far from resolving some of the key issues that are necessary for their effective and safe use in the clinics. The importance of the local microenvironment in directing MSCs to perform their numerous and often conflicting functions have been increasingly recognized over the recent years. Interleukin-17 (IL-17) is a pleiotropic cytokine with important roles in many physiological and pathological processes, such as inflammation, immune response, and regulation of hematopoiesis. This cytokine achieves its functions indirectly, by modulating the expression of variety of soluble and membrane-bound factors in stromal cells. Although some effects of IL-17 on the proliferation and differentiation of MSCs have been demonstrated in human and mouse models, other potential effects, such as the influence of this cytokine on the regulatory role of MSCs in hematopoiesis and immune response, as well as the mechanisms and the significance of its action, are not sufficiently elucidated.

The aim of this study was to isolate and characterize MSCs from mouse bone marrow (mBM-MSCs) and to analyze the effects of IL-17 on their phenotype, multilineage differentiation, proliferation, hematopoietic supportive capacity, and immunomodulatory activity. The mechanisms of action, including the signaling pathways and the role of NO as a mediator, were also examined.

Mesenchymal stem cells were successfully isolated from the bone marrow of CBA mice, and propagated in the presence of basic fibroblast growth factor (bFGF). The cells showed characteristics of MSCs that followed the criteria established by the MSCs Committee of the International Society for Cellular Therapy, namely: plastic-adherence; expression of the characteristic mesenchymal markers (endoglin, vimentin, α -SMA, fibronectin, Stro-1 and Snail1); the absence of hematopoietic lineage markers (CD5, CD45R/B220, CD11b, Gr-1, TER-119, and 7/4), and the ability to differentiate towards chondroblasts, osteoblasts, adipocytes, and myofibroblasts. After we established the presence of IL-17 receptor on these cells, we showed that IL-17 did not affect the basic characteristics of MSCs, such as their immunophenotype and multilineage differentiation potential. Upon examining the effects of IL-17 on proliferation and clonogenic potential of mBM-MSCs we found that this cytokine increased the mBM-MSCs' proliferation in a dose dependent manner, both alone and in combination with bFGF. The analysis of the phosphorylation of protein tyrosine kinases (PTKs) and mitogen-activated protein kinases (MAPKs), and the usage of specific inhibitors of these signaling pathways showed that the effects of IL-17 and bFGF on the proliferation of mBM-MSCs were dependent on the p38 and ERK MAPK pathways, whereas PTKs and JNK MAPK did not have significant role in this process. By the successful establishment of the long-term bone marrow culture system, it was shown that the mBM-MSCs have the capability of supporting the hematopoiesis *in vitro* longer than three weeks. IL-17 exhibited a positive effect on this ability of mBM-MSCs, as shown by the increased number of total non-adherent cells, as well as committed progenitors and morphologically recognizable hematopoietic precursors in cocultures with IL-17-pretreated mBM-MSCs, in comparison to the control, untreated mBM-MSCs. The possible role of NO in IL-17-mediated effects on hematopoietic cells was implied by the increased expression of the endothelial NO synthase (eNOS) mRNA in IL-17-treated mBM-MSCs. The immunomodulatory potential of the mBM-MSCs and the effect of IL-17 on this ability were not shown in the cocultures of mBM-MSCs with mitogen-stimulated syngeneic spleen cells. However, mBM-MSCs significantly suppressed the proliferation of mitogen-stimulated human peripheral blood-derived mononuclear cells, as well as the alloantigen-stimulated proliferation in a mixed lymphocyte reaction.

The results of this study emphasized the complexity of the biology of MSCs and their interaction with microenvironmental factors, as well as the specificity of the mouse system, as opposed to human, thus paving the way for further research in order to find the best possible modalities for prospective therapeutic use of these cells.

KEYWORDS: Mesenchymal stem cells; interleukin-17; mouse; bone marrow; proliferation; hematopoiesis; immunomodulation.

SCIENTIFIC FIELD: Medicine

SPECIALIZED SCIENTIFIC FIELD: Immunology

UDC: 616-097-092.9:577.112.85:576.32 (043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. MEZENHIMSKE MATIČNE ČELIJE	1
1.1.1. Matične ćelije – istorijat i pojam matičnosti	1
1.1.2. Problemi definisanja i karakterizacije MSC	4
1.1.3. Specifičnosti mišjih MSC	6
1.1.4. Diferencijacija MSC	8
1.1.5. Izvori mezenhimskih matičnih ćelija	11
1.1.6. MSC i hematopoeza	12
1.1.7. MSC i regulacija imunskog odgovora	14
1.2. INTERLEUKIN-17	18
1.2.1. Produkcija IL-17	19
1.2.2. Signalizacija preko IL-17R	20
1.2.3. Biološki efekti IL-17	22
1.2.4. IL-17 i MSC	25
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	27
3. MATERIJAL I METODE	31
3.1. REAGENSI	31
3.2. MEDIJUMI I PUFERI	33
3.3. ŽIVOTINJE	34
3.4. ČELIJE I ČELIJSKE KULTURE	34
3.4.1. Izolacija i kultivacija mBM-MSK	34
3.4.2. Izolacija hematopoetskih ćelija kostne srži	35
3.4.3. Izolacija ćelija slezine	35
3.4.4. Izolacija humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi	36
3.5. PROLIFERACIJA	36
3.6. ANALIZA KLONOGENOG POTENCIJALA MSC	37
3.7. DIFERENCIJACIJA	37
3.7.1. Osteogena diferencijacija	37
3.7.2. Adipogena diferencijacija	38
3.7.3. Hondrogena diferencijacija	38
3.7.4. Diferencijacija u miofibroblaste (vaskularne glatkomišićne ćelije)	38
3.8. ODREĐIVANJE EKSPRESIJE PROTEINA	39
3.8.1. Imunofluorescentna mikroskopija	39
3.8.2. Western Blot	39
3.9. ODREĐIVANJE GENSKE EKSPRESIJE	41
3.9.1. Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze	41

3.10. ISPITIVANJE HEMATOPOEZE.....	44
3.10.1. <i>Analiza morfološki prepoznatljivih ćelija hematopoeze</i>	44
3.10.2. <i>Analiza broja hematopoetskih progenitora</i>	44
3.10.3. <i>Dugotrajna kultura kostne srži</i>	45
3.11. ISPITIVANJE IMUNOMODULATORNIH SVOJSTAVA MSC.....	46
3.11.1. <i>Određivanje proliferacije limfocita merenjem ugradnje BrdU</i>	46
3.12. ODREĐIVANJE PRODUKCIJE NO.....	47
3.13. STATISTIČKA ANALIZA.....	48
4. REZULTATI.....	49
4.1. IZOLOVANJE I KULTIVACIJA mBM-MSC.....	49
4.2. UČESTALOST mBM-MSC.....	50
4.3. KARAKTERIZACIJA mBM-MSC.....	52
4.3.1. <i>Imunofenotipske karakteristike mBM-MSC</i>	52
4.3.2. <i>Diferencijacija mBM-MSC</i>	53
4.4. EFEKAT IL-17 NA KARAKTER mBM-MSC.....	55
4.5. UTICAJ IL-17 NA KLONOGENI POTENCIJAL I PROLIFERACIJU mBM-MSC.....	59
4.6. SIGNALNI PUTEVI UKLJUČENI U DELOVANJE IL-17.....	61
4.7. UTICAJ IL-17 NA SPOSOBNOST MSC DA PODRŽAVAJU HEMATOPOEZU.....	66
4.8. UTICAJ IL-17 NA EKSPRESIJU NOS I PRODUKCIJU NO.....	70
4.9. IMUNOMODULATORNA SPOSOBNOST mBM-MSC.....	72
5. DISKUSIJA.....	75
6. ZAKLJUČCI.....	87
7. LITERATURA.....	89

1.

U V O D

1.1. MEZENHIMSKE MATIČNE ĆELIJE

1.1.1. Matične ćelije – istorijat i pojam matičnosti

Smatra se da je termin „matične ćelije“ prvi u nauku uveo ruski naučnik Aleksandar Maksimov 1909. godine na kongresu Berlinskog hematološkog društva, opisujući ćelije nalik limfocitima od kojih u embrionalnom i post-fetalnom razvoju nastaju drugi elementi krvi (*Maximov, 1909*). Međutim, zbog specifičnih osobina ove populacije ćelija, njihove izuzetno male brojčane zastupljenosti u hematopoetskom tkivu, kao i činjenice da se morfološki ne mogu razlikovati od drugih ćelija koje liče na limfocite, ostale su neotkrivene sve do početka šezdesetih godina prošlog veka. Začetnicima nauke o matičnim ćelijama se zato smatraju Ernest McCulloch i James Till koji su 60-ih godina 20. veka pokazali postojanje matičnih ćelija hematopoeze (eng. *hematopoietic stem cells*, HSC) u kostnoj srži (*Till i McCulloch, 1961; Becker i sar., 1963*). Oni su 1961. godine uveli tehniku direktnog merenja radiosenzitivnosti ćelija kostne srži normalnog miša i uočili da se nakon intravenskog ubrizgavanja ćelija kostne srži u letalno ozračenog miša, na slezini uočavaju kolonije brzoproliferišućeg hematopoetskog tkiva u vidu jasno izraženih čvorića čiji je broj linearno zavisao od broja ubrizganih ćelija kostne srži. Oni su ćelije koje imaju kapacitet da formiraju ove kolonije nazvali jedinicama koje formiraju kolonije (eng. *spleen colony-forming unit*, CFU-S), s obzirom na to da je u prvo vreme razmatrana mogućnost da kolonija nastaje iz agregata monopotentnih matičnih ćelija. Ovaj naziv se zadržao do danas, iako se danas zna da se radi o heterogenom odeljku matičnih ćelija hematopoeze. Kasnije je dokazano da svaka kolonija u slezini potiče od pojedinačne ubrizgane ćelije kostne srži (*Becker i sar., 1963*). Činjenica da se većina kolonija sastojala od mešavine zrelih ćelija različitih loza ukazala je da je izvorna ćelija imala kapacitet višelinijske diferencijacije, i potvrdila osnovnu funkcionalnu karakteristiku matičnih ćelija – mogućnost diferencijacije u veći broj specijalizovanih ćelija (*Till i sar., 1964*). Pored toga, ponovnom transplantacijom pojedinačnih kolonija, pokazano je da se u njima nalaze matične ćelije iz kojih nastaju sekundarne kolonije, nove CFU-S, što je bio dokaz druge

osnovne karakteristike matičnih ćelija – sposobnosti samobnove, kojom se obezbeđuje obnavljanje i održavanje veličine sopstvene populacije (*Siminovitch i sar., 1963*).

Tokom 60-ih i 70-ih godina prošlog veka Friedenstein i saradnici su u kostnoj srži pokazali postojanje i male subpopulacije nehematopoetskih, stromalnih ćelija koje poseduju potencijal za osteogenu diferencijaciju. Za razliku od hematopoetskih ćelija, ove ćelije su posedovale sposobnost adhezije za plastičnu podlogu, a u kulturi, od ovih ćelija nastajale su pojedinačne kolonije ćelija sličnih fibroblastima, zbog čega su ih nazvali jedinice koje stvaraju fibroblastne kolonije (eng. *colony-forming unit – fibroblastic*, CFU-F) (*Friedenstein i sar., 1974^a; Friedenstein i sar., 1976*). Na osnovu ovog originalnog sistema kultivisanja ukazano je na adherentnu, klonogenu, nefagocitnu i fibroblastnu prirodu ovih ćelija, pa se CFU-F test i danas koristi kao test za određivanje broja i klonogenog potencijala stromalnih matičnih ćelija. Osamdesetih godina prošlog veka pokazano je da se ove ćelije, kada se transplantiraju *in vivo*, mogu diferencirati u različita vezivna tkiva (kost, hrskavicu, masno tkivo), pa su ih Friedenstein i Owen nazvali „stromalne matične ćelije kostne srži“ (*Owen i Friedenstein, 1988; Owen, 1988*). Arnold Caplan je 1991. godine ćelije adultne kostne srži koje mogu da se izoluju, umnože u kulturi i stimulišu da diferenciraju u različite ćelije i tkiva mezodermalnog porekla označio pojmom „mezenhimske matične ćelije“ (eng. *mesenchymal stem cells*, MSC) (*Caplan, 1991*).

Izolovanje pluripotentnih, embrionalnih matičnih ćelija iz unutrašnje mase blastociste miša 1981. godine (*Martin i sar., 1981*), a kasnije i humanih embrionalnih ćelijskih linija (*Thomson i sar., 1998*) dovelo je do prave eksplozije interesovanja za ovu oblast istraživanja, kako u stručnoj, tako i u široj javnosti, pre svega zbog njihove potencijalne primene u regenerativnoj medicini. Međutim, prvenstveno zbog etičkih dilema vezanih za korišćenje ćelija humanih embriona, ali i zbog komplikovane procedure njihovog izolovanja i održavanja, kao i teškog kontrolisanja njihove diferencijacije i stvaranja teratoma *in vivo*, zanimanje za ovu vrstu matičnih ćelija je značajno opalo i fokus interesovanja je prebačen na adultne matične ćelije.

Otkriće indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija (iPS) je najnovije veliko otkriće vezano za matične ćelije, za koje je 2012. godine dodeljena i Nobelova nagrada za medicinu. Naime, Kazutoshi Takahashi i Shinya Yamanaka su 2006. godine pokazali

da je moguće zrele somatske ćelije (fibrociti miša) vratiti u stanje matičnosti aktivacijom samo 4 gena: Oct3/4, Sox2, c-Myc i Klf4 (*Takahashi i Yamanaka, 2006*). Ovo otkriće ne samo da je dovelo do potencijalnih novih modaliteta primene matičnih ćelija, već je srušilo dogmu da je diferencijacija i sazrevanje nepovratan proces i postavilo nove osnove za istraživanja u embriologiji i biologiji ćelije.

Iako se osnovnim karakteristikama matičnosti smatraju sposobnost samoobnove sopstvene populacije i mogućnost diferencijacije u veći broj specijalizovanih ćelija, u naučnoj javnosti ne postoji potpuno slaganje šta tačno definiše matičnost ćelija. Na hematološkoj radionici održanoj 1978. godine usvojeni su koncepti i definicije matične ćelije i matičnosti, po kojima se matičnim smatraju ćelije koje imaju „veliki kapacitet samoobnove koji može da traje tokom celog života organizma“ (*Lajtha, 1979*). Prema većini autora, sposobnost diferencijacije je takođe osnovna osobina matičnih ćelija, ali prema ovoj definiciji „potencijal za dalju diferencijaciju je osobina nekih matičnih ćelija ali nije ključna osobina koja određuje matičnost“. U novije vreme, a posebno od otkrića iPS ćelija, mnogi autori imaju stanovište da matična ćelija nije entitet, već stanje u koje može da dođe bilo koja ćelija, te da je plastičnost, a ne samoobnova, osnovna osobina matičnosti (*Zipori, 2005*). Ipak, danas se uglavnom kao radna definicija matične ćelije uzima je da je to ćelija sposobna ne samo da dâ potomke različitog tipa, već i da ima kapacitet da se samoobnavlja *in vivo*.

Na osnovu potencijala za diferencijaciju u jednu ili više linija potomaka, matične ćelije se mogu podeliti na totipotentne, pluripotentne, multipotentne, oligopotentne i unipotentne. Totipotentne matične ćelije se mogu diferencirati u sve embrionske i ekstraembrionske vrste ćelija, odn. mogu napraviti ceo živi organizam. Ovaj potencijal imaju samo oplodena jajna ćelija (zigot) i ćelije nastale nakon prvih nekoliko deoba zigota (morula). Pluripotentne matične ćelije se mogu diferencirati u ćelije porekla sva tri klicina lista (endoderm, ektoderm, mezoderm), ali ne i placentu i od njih se ne može razviti fetus ili odrasla jedinka. To su ćelije unutrašnje mase blastociste. Multipotentne ćelije se mogu diferencirati u više različitih tipova ćelija, ali samo u okviru uske familije ćelija, na primer ćelije hematopoeze, mezenhinskog tkiva, nervnog tkiva. Oligopotentne matične ćelije se mogu diferencirati u samo nekoliko vrsta ćelija, poput limfoidnih, mijeloidnih ili endotelnih matičnih ćelija. Unipotentne matične ćelije nemaju sposobnost dalje diferencijacije, već samo obnavljaju sopstvenu ćelijsku vrstu.

Takve su, na primer, hepatociti, mišićne matične ćelije ili matične ćelije kože i sluzokoža. Ontološki, odn. prema razvojnom stadijumu organizma iz kojeg su izolovane, matične ćelije mogu biti embrionalne, fetalne, neonatalne i adultne (*Katsumoto i sar., 2010; Hass i sar., 2011*).

1.1.2. Problemi definisanja i karakterizacije MSC

Značajniji napredak u kliničkoj primeni MSC, ali i uopšte u poznavanju njihove biologije, sputan je mnogim preprekama. Jedna od njih je svakako nepostojanje jedinstvenog sporazuma o definisanju osnovnih karakteristika ovih ćelija. Zahvaljujući relativno jednostavnom postupku izolovanja iz velikog broja različitih tkiva, odsustva etičkih kontroverzi i velikom potencijalu za primenu ovih ćelija u terapiji, interesovanje za ova istraživanja je poslednjih decenija značajno poraslo i sve se više istraživačkih grupa u celom svetu u njih uključuje. Međutim, različite istraživačke grupe koriste različite protokole izolovanja i kultivacije, kao i različite izvore MSC, što čini poređenje njihovih rezultata veoma teškim.

Problemi u definisanju MSC počinju nepostojanjem jedinstvenog profila ekspresije gena i površinskih antigena. Mnoge laboratorije su godinama bezuspešno pokušavale da identifikuju molekul ili grupu molekula koji bi nedvosmisleno okarakterisali MSC. MSC ispoljavaju mnoge adhezivne molekule (CD44, CD105, CD106, CD146, CD166), integrine (CD29, CD49a-f, CD51), enzime (CD39, CD73), receptore faktora rasta (CD140b, CD271, CD340, CD349), intermedijerne filamente (vimentin, nestin, dezmin, neurofilament), embrionalne antigene (SSEA1, SSEA4), ali nijedan nije specifično ispoljen na MSC (*Pittenger i sar., 1999; Salem i Thiemermann, 2010; Phinney i Sensebé, 2013*). Različite studije pripisuju određenim molekulima veći značaj za prospektivnu izolaciju ćelija sa velikim klonalnim kapacitetom, kao što su Stro-1, Sca-1, PDGFR α , CD146, CD200, CD271 ili nestin (*Anjos-Afonso i Bonnet, 2011; Pontikoglou i sar., 2011*). Evropski konzorcijum „Genostem“ identifikovao je 113 transkripata i 17 proteina koji razlikuju MSC humane kostne srži od hematopoetskih, endotelnih i periosteumskih ćelija i sinovijalnih fibroblasta (*Delorme i sar., 2008*). Možda i veći značaj od ispoljenosti pozitivnih markera MSC ima

neispoljavanje hematopoetskih i endotelnih linijskih markera, poput CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79 α , CD235a i sl. Problem sa fenotipskom karakterizacijom MSC se još više produbljuje ako se uzme u obzir velika heterogenost, kako među donorima, tako i između različitih tkiva iz kojih su izolovane, pa čak i unutar populacije izolovane iz istog uzorka (*da Silva Meirelles i sar., 2006; Covas i sar., 2008; Phinney, 2012*). Osim toga, neke MSC značajno menjaju svoje osobine dugim propagiranjem u kulturi (*Digirolamo i sar., 1999; Larson i sar., 2008*), ali i nakon njihove administracije *in vivo*, što s druge strane, prema nekim teorijama, možda upravo predstavlja ključ mnogih povoljnih terapijskih efekata MSC (*Lee i sar., 2009; Németh i sar., 2009*).

U cilju definisanja standardnih kriterijuma za utvrđivanje identiteta MSC, a na osnovu do tada dostupnih podataka, Komitet za mezenhimske i tkivne matične ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju je 2006. godine predložilo sledeća tri minimalna kriterijuma za definisanje MSC (*Dominici i sar., 2006*):

1. Adherentnost za plastiku u standardnim uslovima kultivacije.
2. Specifični površinski antigeni i to: pozitivni za CD105, CD73 i CD90 u $\geq 95\%$ i negativni ($\leq 2\%$) za CD34 (marker primitivnih hematopoetskih progenitora i endotelnih ćelija), CD45 (panleukocitni marker), CD14 ili CD11b (markeri monocita i makrofaga), CD79 α ili CD19 (markeri B limfocita) i HLA-DR u bazičnim uslovima kultivisanja.
3. Diferencijacija u najmanje tri mezenhimske linije: osteoblaste, adipocite i hondroblaste u standardnim uslovima za *in vitro* diferencijaciju tkivnih kultura.

Iako se ovi kriterijumi odnose na humane MSC, isti princip se može primeniti i za životinjske sisteme, s tim što fenotip nije dovoljno dobro okarakterisan za sve vrste.

Zbog nemogućnosti definitivne potvrde da ćelije koje se izoluju iz kostne srži ili drugog tkiva koje adheriraju za plastiku u potpunosti ispunjavaju uslove matičnosti, odnosno da se samoobnavljaju u dugom vremenskom periodu i diferenciraju u različite ćelijske tipove *in vivo*, ovaj Komitet je doneo preporuku da se izostavi obeležje „matične“ iz naziva tih ćelija. Ne sporeći mogućnost postojanja populacije istinskih matičnih ćelija u toj heterogenoj frakciji adherentnih ćelija, oni predlažu da se kao ispravan naziv za ove ćelije koristi termin „multipotentne mezenhimske stromalne

ćelije“ koji jasno oslikava sve osobine ovih ćelija bez implikacija njihove matičnosti, pri čemu skraćenica MSC treba da ostane, jer je već široko prihvaćena i dugo vremena prisutna kao ključna reč u naučnoj literaturi, dok termin „mezenhimske matične ćelije“ treba da bude rezervisan samo za funkcionalnim testovima potvrđene istinske matične ćelije.

Projekat „Inženjerstvo adultnim mezenhimskim matičnim ćelijama za oboljenja vezivnog tkiva: Od eksperimentalne laboratorije do bolničke postelje“, skraćeno Genostem, okupio je 30 timova iz Evrope koji su između 2004. i 2007. godine radili na istraživanju bioloških osobina i reparatornog kapaciteta MSC humane kostne srži (*Charbord i sar., 2011*). Neki od zaključaka ovog projekta su da humane mezenhimske matične ćelije kostne srži, locirane na abluminalnoj strani endotelnih ćelija sinusa (periciti), jesu iste ćelije koje formiraju niše za hematopoetske ćelije i da takve klonalne, visokoproliferativne ćelije, umnožene u kulturi, zaista jesu istinske (*bona fide*) matične ćelije, jer su samoobnavljajuće i multipotentne. Na osnovu podataka do kojih su došli, oni mezenhimske matične ćelije kostne srži definišu kao adultne tkivne matične ćelije koje vode poreklo od dela ćelija sa abluminalne strane endotela zida sinusoida kostne srži koje imaju sposobnost samoobnove, selektivno su pripremljene („prajmovane“, od eng. *to prime*) za diferencijaciju u mezenhimske i glatkomišićne ćelijske loze, da imaju osobinu plastičnosti, kao i da su sposobne da rekonstruišu hematopoetsku mikrosredinu *in vitro* i *in vivo* (*Charbord i sar., 2011*).

1.1.3. Specifičnosti mišjih MSC

Biologija MSC je jedna od retkih oblasti nauke gde postoji bolje razumevanje humanog od mišjeg sistema. Teškoće u izolovanju primarnih mišjih MSC, međusojne razlike, nestabilnost u dugotrajnim kulturama i drugi problemi, usporili su istraživanja osnovnih aspekata biologije MSC, kao i njihovog regenerativnog i modulatornog potencijala.

Problemi u izolovanju MSC iz kostne srži miša usloveli su razvoj mnogobrojnih protokola od kojih nijedan nije opšteprihvaćen zbog ograničenja u prinosu ili čistoći. Prirodna osobina MSC kostne srži da podržava hematopoezu, jedna od prvih i osnovnih

poželjnih karakteristika koja im daje terapijski potencijal, upravo otežava njihovo prečišćavanje od kontaminirajućih hematopoetskih ćelija u primarnim kulturama (Phinney *i sar.*, 1999; Anjos-Afonso *i Bonnet*, 2011). Te kontaminirajuće hematopoetske ćelije donora imaju veliki potencijal za usađivanje *in vivo*, čime mogu da dovedu do lažnih zaključaka o funkcionalnim osobinama MSC. Ovaj problem je doveo do razvoja različitih strategija za prečišćavanje MSC od hematopoetskih progenitora, od raznih modifikacija uslova zasejavanja i kultivacije do različitih pristupa obogaćivanju populacije MSC iz kostne srži (Sun *i sar.*, 2003; Peister *i sar.*, 2004; Tropel *i sar.*, 2004; Shiota *i sar.*, 2007; Krishnappa *i sar.*, 2013). Međutim, upotreba mnogobrojnih protokola za izolaciju i kultivisanje mišjih MSC od strane različitih istraživačkih grupa širom sveta praktično onemogućava poređenje rezultata istraživanja različitih laboratorija.

Pored manje ili više uspešnih postupaka dobijanja prečišćene populacije MSC, drugi problem je relativno ograničen proliferativni kapacitet izolovanih ćelija. Naime, mišje MSC sporo rastu u prvoj pasaži, zatim ulaze u fazu zastoja, tokom koje većina ćelija odumre, nakon čega, one ćelije koje prežive ulaze u fazu brzog rasta. Međutim, pojava ove brzorastuće ćelijske populacije ukazuje na imortalizaciju, kojoj su mišje ćelije inače sklone (Prowse *i Greider*, 1995), na šta ukazuje i stvaranje tumora *in vivo* (Tolar *i sar.*, 2007). Stoga, rezultate svih istraživanja koja su rađena na prekomerno pasažiranim mišjim ćelijama treba preispitati i utvrditi da li se radi o primarnim ili imortalizovanim MSC.

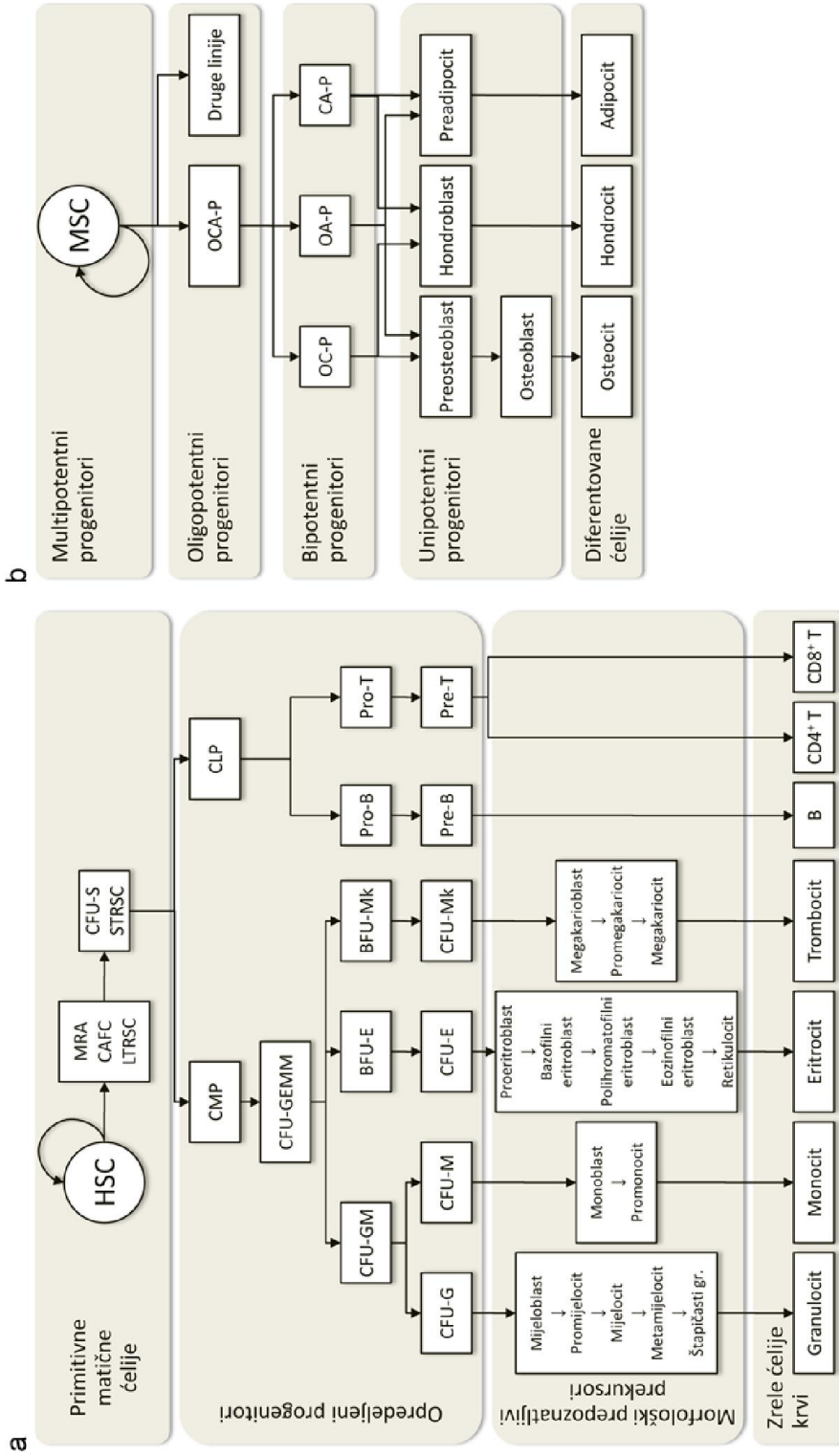
Osim problema u izolovanju i kultivaciji, problem rada sa mišjim MSC jesu međusobne razlike. MSC iz različitih visokosrodnih sojeva miševa se u visokom stepenu međusobno razlikuju u prinosu, proliferaciji, površinskim markerima i potencijalu za diferencijaciju (Phinney *i sar.*, 1999; Peister *i sar.*, 2004). Svi ovi problemi otežavaju rad na ovom životinjskom modelu. Ipak, zbog ustanovljenih eksperimentalnih modela raznih bolesti, mogućnosti manipulisanja genomom i manjim etičkim dilemama, mišji modeli ostaju metod izbora u izučavanju MSC.

1.1.4. Diferencijacija MSC

Kao paradigma razvoja matičnih ćelija uzima se matična ćelija hematopoeze (HSC). U hematopoetskom sistemu, daljom diferencijacijom, matične ćelije sukcesivno gube sposobnost samoobnavljanja i smanjuje im se potencijal za višelinijisku diferencijaciju, stvarajući tako hijerarhijski kontinuum različitih ćelijskih tipova od najprimitivnije, multipotentne HSC, pa sve do zrelih ćelija krvi. Tako nastaju prvo hematopoetski prethodnici ili progenitori, ćelije koje su opredeljene za diferencijaciju u ograničen broj različitih loza (mijeloidnu, limfoidnu, eritroidnu, megakariocitnu), a njihovom daljom diferencijacijom nastaju morfološki prepoznatljivi prekursori koji na kraju sazrevaju u zrele ćelije krvi (*Petakov i sar., 1998; Petakov i sar., 2004*). Istovremeno sa ovim procesom, matična ćelija, po principu asimetrične deobe, daje i sebi identičnu kćerku ćeliju koja tako obnavlja pul izvornih matičnih ćelija. U slučaju potrebe, matične ćelije mogu da se dele i simetričnom deobom kako bi uvećali svoj broj tokom razvoja ili prilikom oštećenja (*Morrison i Kimble, 2006*).

Po analogiji sa HSC, neki istraživači zagovaraju stanovište da se mezenhimske matične ćelije takođe diferenciraju prema hijerarhijskom programu (**Slika 1.1**). Na to ukazuju klonalne analize diferencijacije i proliferacije MSC (*Muraglia i sar., 2000; Russel i sar., 2010; Russel i sar., 2011*), uključujući i matematički model (*Sengers i sar., 2010*). Ovakva organizacija objašnjava heterogenost unutar populacije MSC izolovanih iz istog tkiva kao posledicu različitog razvojnog stadijuma progenitora. Ova heterogenost se ne eliminiše ni nakon selekcije klonova, jer se, čak i unutar kolonije potekle od jedne MSC, ćelije unutrašnje i spoljašnje regije razlikuju prema morfologiji i genskoj ekspresiji (*Ylöstalo i sar., 2008*).

Nasuprot ovome, neki autori smatraju da hijerarhijski model ne predstavlja strukturu sistema razvoja mezenhimskih, ali ni drugih matičnih ćelija, već da je ono što čini osnovu stanja matičnosti njihova plastičnost, odnosno fleksibilnost izbora puta diferencijacije – mogućnost da se matične ćelije jednog tkiva diferenciraju u ćelije drugog tkiva istog klicinog lista, ili čak i drugog klicinog lista, npr. mezoderm u endoderm (transdiferencijacija) (*Zipori, 2005*).



Slika 1.1. Diferencijacija matičnih ćelija. Hijerarhijski model diferencijacije matične ćelije hematopozeze (a) i mezenhimske matične ćelije po analogiji sa hematopoetskim sistemom (b). HSC – hematopoetska matična ćelija; MRA – ćelija sa sposobnošću repopulacije kostne srži; CAFC – ćelija koja formira polja slična kaldrmi; LTRSC – dugotrajno repopulišuća matična ćelija; CFU-S – jedinica formiranja kolonije u slezini; STRSC – kratkotrajno repopulišuća matična ćelija; CMP – zajednički mijeloidni progenitor; CLP – zajednički limfoidni progenitor; CFU – jedinica formiranja kolonije (-G – granulocita, -M – monocita, -E – eritrocita, -Mk – megakariocita); BFU – jedinica formiranja praska; MSC – mezenhimska matična ćelija; OCA-P – osteo-hondro-adipo-progenitor; OC-P – osteo-hondro-progenitor; OA-P – osteo-adipo-progenitor; CA-P – hondro-adipo-progenitor.

U odgovarajućim uslovima *in vitro* moguće je usmeriti diferencijaciju MSC u pravcu različitih ćelija mezodermalnog porekla, uključujući osteocite, adipocite, hondrocite, miocite, miofibroblaste, vaskularne glatkomišićne ćelije, tenocite, miokardiocite, ali i endotelne ćelije, nervne ćelije, ćelije jetre i dr. (Makino i sar., 1999; Pittenger i sar., 1999; Deans i Moseley, 2000; Wooddbury i sar., 2000; Sato i sar., 2005; Salem i Thiemermann, 2010; Vater i sar., 2011). Za dokazivanje potencijala za višelinijsku diferencijaciju MSC u sklopu karakterizacije najčešće se koristi *in vitro* diferencijacija u osteogenom, adipogenom i hondrogenom pravcu.

Diferencijacija je kompleksan proces tokom kojeg, pod uticajem različitih spoljnih stimulusa, dolazi do vremenski organizovane aktivacije specifičnih transkripcionih faktora koji regulišu ispoljavanje određenih gena i tako definišu fenotip diferenciranih ćelija. Tako, tokom osteogene diferencijacije dolazi do aktivacije transkripcionog faktora Runx2/Cbfa1 (od eng. *runt-related transcription factor 2*, odn. *core-binding factor subunit alpha 1*), koji se smatra ključnim za diferencijaciju u pravcu koštanog tkiva, jer aktivira osteo-specifične gene: osterix, $\alpha 1$ lanac kolagena tipa 1, osteokalcin, i dr. Runx2/Cbfa1 se zato smatra ranim markerom osteogene diferencijacije (Caetano-Lopes i sar., 2007; Vater i sar., 2011). Među drugim ranim markerima osteogene diferencijacije je i enzim alkalna fosfataza (ALP) koji je ispoljen u nepotpuno diferenciranim osteoblastima. Osteokalcin i osteopontin se javljaju kasnije tokom diferencijacije, pa se oni ubrajaju u kasne markere osteogene diferencijacije, kao i nakupljeni kalcijum, koji može da se detektuje raznim metodama bojenja (alizarin crveno, von Kossa). Ključni sastojci osteogenog medijuma koji se koristi za *in vitro* dokazivanje potencijala za osteogenu diferencijaciju su deksametazon, askorbinska kiselina i β -glicerofosfat (Vater i sar., 2011).

Osnovni faktori koji se dodaju medijumu za adipogenu diferencijaciju MSC u *in vitro* uslovima su deksametazon, insulin i 3-izobutil-1-metilksantin (IBMX). Transkripcioni faktor PPAR γ 2 (od eng. *peroxisome proliferation-activated receptor γ 2*) je jedan od ključnih u aktivaciji gena odgovornih za indukciju i progresiju adipogeneze i zajedno sa lipoprotein lipazom i $\alpha 2$ lancem kolagena tipa 6 koristi se kao rani marker adipogene diferencijacije. Za kasne markere adipogene diferencijacije mogu se koristiti leptin, FABP4 (od eng. *fatty acid-binding protein 4*) i adiponektin. Stepen diferencijacije

adipocita se može analizirati i bojenjem unutarćelijskih lipidnih vakuola ili određivanjem glicerol-3-fosfat dehidrogenaze (GPDH) (*Vater i sar., 2011*).

Hondrogena diferenciju karakteriše ekspresija transkripcionog faktora Sox-9 (*SRY-related high-mobility group 9*), koji kontroliše ispoljavanje gena za kolagene tipa 2, 9, 10 i 11, kao i agrekan. Ključni faktori za *in vitro* hondrogena diferencijaciju su deksametazon, askorbinska kiselina i transformišući faktor rasta- β (TGF- β) (*Vater i sar., 2011*). Hondrogena diferencijacija se takođe može dokazati bojenjem preparata ćelija ili tkiva bojama koje se vezuju za glikozaminoglikane, kao što su safranin i fast green.

1.1.5. Izvori mezenhimskih matičnih ćelija

Uzimajući u obzir pomenutu fenotipsku i funkcionalnu heterogenost, MSC mogu biti izolovane iz skoro svakog tkiva. Pored kostne srži, humane mezenhimske matične ćelije su izolovane iz adipoznog tkiva, dentalnog tkiva, periferne krvi, perinatalnih tkiva i dr. (*Zuk i sar., 2001; Parolini i sar., 2008; Rodríguez-Lozano, 2011*).

Kostna srž je prvootkriveni izvor matičnih ćelija uopšte, pa i MSC. MSC izolovane iz kostne srži su ujedno i najviše proučavane, pa se samim tim i najviše koriste u kliničkim ispitivanjima. Ipak, zbog invazivne procedure uzimanja kostne srži i zbog relativno slabe ekspanzivne moći ovih MSC, druga tkiva polako preuzimaju primat u izučavanju kako osnovne biologije, tako i terapijske primene MSC (*Wagner i sar., 2005*). Dostupnost izvora, kao i odsustvo etičkih nedoumica i rizika po zdravlje pacijenta, sve više u centar pažnje stavlja tkiva koja se inače odbacuju prilikom izvođenja različitih medicinskih procedura, npr. pri porođaju (tkivo placente, krv iz pupčanika, vezivno tkivo pupčanika), liposukciji (adipozno tkivo), stomatološkim procedurama (zubna pulpa, periodoncijum) i sl. (*Zuk i sar., 2001; Parolini i sar., 2008; Rodríguez-Lozano, 2011*).

MSC poreklom iz perinatalnog tkiva su posebno atraktivne pošto predstavljaju ćelije na prelazu između embrionalnih i adultnih matičnih ćelija. Humana placenta se sastoji od četiri regiona: amnionski epitel, amnionski mezenhim, horionski mezenhim i

horionski trofoblast. Iz sva četiri regiona su izolovane multipotentne ćelije: humane amnionske epitelne ćelije, humane amnionske mezenhimske stromalne ćelije, humane horionske mezenhimske stromalne ćelije i humane horionske ćelije trofoblasta (*Parolini i sar., 2008*). Primitivno, mukozno vezivno tkivo pupčanika, Vartonova pihtija (eng. *Wharton's Jelly*), nalazi se između amnionskog epitela i krvnih sudova pupčanika i predstavlja bogati izvor primitivnih MSC. Jedna od osnovnih prednosti MSC iz Vartonove pihtije jeste njihova visoka hromozomska stabilnost koja omogućava veliki broj pasaža *in vitro* i samim tim pouzdan izvor velikog broja ćelija (*Troyer i Weiss, 2008; Taghizaadeh i sar., 2011*). MSC iz ova dva perinatalna izvora, pored karakterističnih mezenhimskih markera ispoljavaju i neke embrionalne markere, poput Nanog, Sox-2 i Oct gena i mogu se diferencirati u tkiva koja potiču iz sva tri klicina lista (*Parolini i sar., 2008; La Rocca i sar., 2009*).

Dentalna tkiva su takođe privlačan izvor adultnih MSC zbog lake dostupnosti u bilo kom životnom dobu. Imaju veliki proliferativni kapacitet i mogu se pasazirati *in vitro* više puta nego MSC poreklom iz kostne srži (*Gronthos i sar., 2000; Rodríguez-Lozano, 2011; Hung i sar., 2012*).

Još jedan lako dostupan izvor MSC jeste i periferna krv (*Roufosse i sar., 2004*). Međutim, ove ćelije u krvi su malobrojne i pretpostavlja se da su to MSC koje migriraju iz drugih tkiva (npr. kostne srži) na mesta regeneracije (*Valenti i sar., 2008; Cesselli i sar., 2009*). Ove ćelije, zbog malobrojnosti i teškog izolovanja, nemaju veliki potencijal za direktnu primenu u terapijske svrhe, ali je njihovo izučavanje značajno za ispitivanje mogućnosti mobilizacije MSC i njihovog naseljavanja udaljenih lezija, što je od važnosti za mogućnost intravenske aplikacije u ćelijskoj terapiji.

1.1.6. MSC i hematopoeza

Koncept niše predstavlja skup anatomskih i funkcionalnih činilaca koji, integrišući različite signale, dovode do jedinstvenog balansiranog odgovora matičnih ćelija na potrebe organizma. Matične ćelije nisu izolovane, već je njihovo ponašanje zavisno od uslova mikrosredine. One reaguju na udružene faktore okoline kao što su druge ćelije, vanćelijski matriks, parakrini molekuli, humoralni signali, fizički stimuli,

metabolički stimulusi i nervni impulsi. Niše su dinamičan sistem, podložan promeni mesta, broja i funkcije u zavisnosti od specifičnih uslova i potreba organizma (*Scadden, 2006*).

Ćelije strome kostne srži, putem sekrecije odgovarajućih faktora rasta, direktnim kontaktom ili produkcijom vanćelijskog matriksa, obezbeđuju mikrosredinu koja je neophodna kao podrška hematopoetskim ćelijama za preživljavanje, samoobnavljanje, migraciju i diferencijaciju (*Dazzi i sar., 2006; Pontikoglou i sar., 2011*). Značaj uloge koju ćelije strome kostne srži imaju u održavanju hematopoeze prvi su uočili još Friedenstein i saradnici koji su pokazali da se heterotopijskom transplantacijom ćelija kostne srži koje *in vitro* daju kolonije ćelija sličnih fibroblastima (CFU-F) stvaraju strukture sa histološkim karakteristikama kosti i kostne srži (*Friedenstein i sar., 1974^b*). U ovim strukturama ćelije strome su vodile poreklo od davaoca, dok su ćelije hematopoeze bile primaočeve što je ukazivalo na to da su transplantirane stromalne ćelije kostne srži sposobne da pruže povoljnu mikrosredinu za naseljavanje i dalje održavanje i diferencijaciju HSC. Ovo je potvrđeno i u animalnim eksperimentalnim sistemima gde je, nakon izlaganja miševa letalnim dozama zračenja, simultanom transplantacijom MSC i HSC postignut brži oporavak hematopoeze nego primenom samo HSC (*Noort i sar., 2002; Zhang i sar., 2004*). Isto je pokazano i u studijama na ljudima (*Koç i sar., 2000*). Ova *in vivo* istraživanja su dalje potkrepljena uspostavljanjem sistema za dugotrajnu kultivaciju hematopoetskih ćelija *in vitro*, čime je pokazano da stromalne ćelije kostne srži mogu da održavaju hematopoezu duže od 6 meseci (*Dexter i sar., 1977*). Neka novija istraživanja takođe pokazuju da MSC humane kostne srži održavaju i umnožavaju ćelije koje započinju dugotrajnu kulturu (eng. *long-term culture-initiating cells, LTC-IC*), *in vitro* ekvivalent najprimitivnijim hematopoetskim progenitorima (*Majumdar i sar., 1998; Petakov i sar., 1998; Gottschling i sar., 2007*), kao i da podržavaju megakariocitnu diferencijaciju (*Cheng i sar., 2000*) i razvoj B limfocita (*Ichii i sar., 2008*). Slično je pokazano i za mišje osteoblaste (*Zhu i sar., 2007*).

Dugo se tragalo za pravim identitetom ćelija koje su sposobne da formiraju hematopoetsku nišu. Mnoga istraživanja su ukazivala na osteoblaste, endotelne i perivaskularne ćelije, uzimajući u obzir zajedničke funkcionalne, fenotipske i topografske karakteristike (*Pontikoglou i sar., 2011*). Muguruma i saradnici su dokazali

da *ex vivo* umnožene MSC, nakon intramedularne transplantacije, nastanjuju stromu kostne srži (Muguruma i sar., 2006). Nakon usađivanja, ove MSC poprimaju morfologiju i fenotip praktično svih ćelijskih komponenti hematopoetske niše (pericita, miofibroblasta, retikularnih ćelija, osteoblasta, osteocita i endotelnih ćelija). Ove MSC rekonstituišu hematopoetsku mikrosredinu potpomažući usađivanje primitivnih humanih hematopoetskih ćelija i poboljšavajući njihovu funkciju direktnom interakcijom preko N-kadherina ili produkcijom CXCL-12 hemokina. Jedan od osnovnih načina na koji MSC podržavaju hematopoezu je obezbeđivanje signala za preživljavanje, proliferaciju i diferencijaciju kako HSC, tako i hematopoetskih progenitora, koji se ostvaruju direktnim ćelijskim kontaktom (N-kadherin, VCAM-1, VLA-4), produkcijom citokina (CXCL-12, Flt-3-ligand, trombopoetin, leukemijski inhibitorni faktor, TGF- β , interleukin (IL)-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, faktor stimulacije rasta granulocitno-makrofagnih kolonija (GM-CSF) i faktor stimulacije rasta makrofagnih kolonija (M-CSF)), kao i putem adhezivnih molekula (VCAM-1) i proteina vanćelijskog matriksa (laminin, fibronektin, kolagen i proteoglikani) (Majumdar i sar., 2000; Dazzi i sar., 2006).

Méndez-Ferrer i saradnici su serijom eksperimenata *in vitro* i *in vivo*, koristeći ćelije kostne srži koje ispoljavaju zeleni fluorescentni protein (GFP) pod kontrolom regulatornih elemenata promotera za nestin, dokazali da ćelijsku komponentu hematopoetske niše predstavljaju nestin⁺ MSC (Méndez-Ferrer i sar., 2010). Ove ćelije su prostorno povezane sa HSC i ispoljavaju visoke nivoe gena zaduženih za održavanje hematopoeze (Cxcl12, c-kit ligand, angiopoetin-1, Vcam-1, osteopontin), a njihovim uklanjanjem se značajno smanjuje broj HSC u kostnoj srži. Takođe je pokazano da se obeležene transplantirane HSC nastanjuju u neposrednoj blizini nestin⁺ MSC letalno ozračenog domaćina.

1.1.7. MSC i regulacija imunskog odgovora

Osim regenerativne uloge, MSC poseduju i izuzetnu imunomodulatornu sposobnost. Brojna istraživanja ukazuju na njihove izražene imunosupresivne karakteristike i uticaj na proliferaciju i funkciju najvažnijih učesnika u imunskom

odgovoru, uključujući T i B limfocite, prirodnoubilačke (NK) ćelije, regulatorne T limfocite (Treg) i dendritične ćelije (DC), kako *in vitro*, tako i *in vivo* (Uccelli *i sar.*, 2006; Shi *i sar.*, 2011). Svojim imunomodulatornim osobinama učestvuju u održavanju periferne tolerancije, u kontroli autoimunosti (Rasmusson, 2006) i fetalno-materinskoj toleranciji (Barry *i sar.*, 2005). U *in vitro* uslovima, MSC suprimiraju aktivaciju i proliferaciju T limfocita indukovanu mitogenima, poliklonskim aktivatorima i poznatim antigenima (Bartholomew *i sar.*, 2002; Di Nicola *i sar.*, 2002). One dovode do zastoja u G0/G1 fazi ćelijskog ciklusa T limfocita, odn. uvode ih u anergiju (Glennie *i sar.*, 2005) ili indukuju njihovu apoptozu (Akiyama *i sar.*, 2012). Osim direktne supresije T limfocita, MSC dovode do umnožavanja CD4⁺ CD25⁺ Treg (Aggarwal *i Pittenger*, 2005) i do indukcije CD8⁺ Treg (Djouad *i sar.*, 2003). Pored toga, MSC dovode do pomeranja balansa pomoćničkih (Th) limfocita sa Th1 na Th2, odn. sa Th17 na Treg (Fiorina *i sar.*, 2009; Ghannam *i sar.*, 2010; Carrión *i sar.*, 2011). MSC suprimiraju diferencijaciju, maturaciju, migraciju i antigensku prezentaciju DC, održavajući ih u nezrelom stanju, putem produkcije M-CSF i IL-10 (Beyth *i sar.*, 2005; Nauta *i sar.*, 2006^a; English *i sar.*, 2008; Dokić *i sar.*, 2013). Preko prostaglandina E₂ (PGE₂), MSC suprimiraju proliferaciju, diferencijaciju i produkciju antitela od strane B limfocita (Corcione *i sar.*, 2006). Takođe, MSC zaustavljaju proliferaciju i produkciju citokina od strane NK ćelija (Sotiropoulou *i sar.*, 2006^a). U *in vivo* uslovima, pokazano je da su MSC dovele do odlaganja T limfocitima posredovanog odbacivanja alo-transplantata kože primata i alo-transplantata kostne srži miša (Bartholomew *i sar.*, 2002; Nauta *i sar.*, 2006^b). MSC su takođe pokazale anti-inflamatorni efekat u modelima bolesti kalem protiv domaćina (eng. *graft versus host disease*, GvHD) i eksperimentalnog autoimunog encefalomijelitisa (Zappia *i sar.*, 2005; Polchert *i sar.*, 2008). Osim toga, MSC su pokazale zaštitnu ulogu u modelu ishemijsko-reperfuzione povrede bubrega pacova i modelu transplantacije srca kod pacova (Fändrich *i sar.*, 2002; Tögel *i sar.*, 2005). Takođe, pokazano je da MSC uzrokuju alternativnu aktivaciju makrofaga indukujući njihov antiinflamatorni, M2, fenotip (Maggini *i sar.*, 2010). Pored toga, MSC su pokazale sposobnost aktivacije komplementa, preko čijih komponenti aktiviraju efektorske ćelije u smislu indukcije njihove imunosupresivne aktivnosti (Moll *i sar.*, 2011). Ovakav modulatorni potencijal čini MSC pogodnim kandidatima za imunosupresivnu terapiju (Salem *i Thiernemann*, 2010; Dazzi *i sar.*, 2011).

MSC svoje imunomodulatorne efekte ostvaruju preko različitih solubilnih i membranskih molekula, uključujući NO, indolamin 2, 3-deoksigenazu (IDO), PGE₂, humani leukocitni antigen G (HLA-G) (Meisel i sar., 2004; Aggarwal i Pittenger, 2005; Sato i sar., 2007; Selmani i sar., 2008), TGF- β , faktor rasta hepatocita (HGF) (Di Nicola i sar., 2002), hem-oksigenaza-1 (HO-1) (Chabannes i sar., 2007), faktorom nekroze tumora α stimulisani gen/protein-6 (TSG-6) (Lee i sar., 2009), galektini (Sioud, 2011) i dr. (Slika 1.2). Ključni mehanizmi imunosupresije se razlikuju kod različitih vrsta. Tako je pokazano da je imunosupresivni efekat humanih i majmunskih MSC posredovan u najvećoj meri preko IDO, dok pod istim eksperimentalnim uslovima mišje MSC u tu svrhu koriste NO (Ren i sar., 2008; Ren i sar., 2009). Osim toga i različiti proinflamatorni citokini utiču na to koji će mehanizam biti aktiviran u MSC, pa se smatra da od toga zavisi i efikasnost imunosupresije (English i sar., 2007).

Imunosupresivni potencijal, međutim, nije konstitutivna osobina MSC i zavisi od niza faktora, kao što su njihova relativna koncentracija (Le Blanc i sar., 2003), stepen aktivacije T limfocita (Carrión i sar., 2011), citokinski i hemokinski milje (English i sar., 2007; Krampera i sar., 2011; Li i sar., 2012) i stimulacija različitih Toll-u sličnih receptora (TLR) (DelaRosa i Lombardo, 2010; Waterman i sar., 2010). Prema Kramperi i saradnicima, MSC stižu svoj imunosupresivni potencijal tek nakon izlaganja inflamatornoj mikrosredini (Krampera i sar., 2011). Proces koji vodi do funkcionalnog sazrevanja MSC u smislu imunokompetentnosti Krampera naziva „licenciranje“ i obuhvata tri koraka:

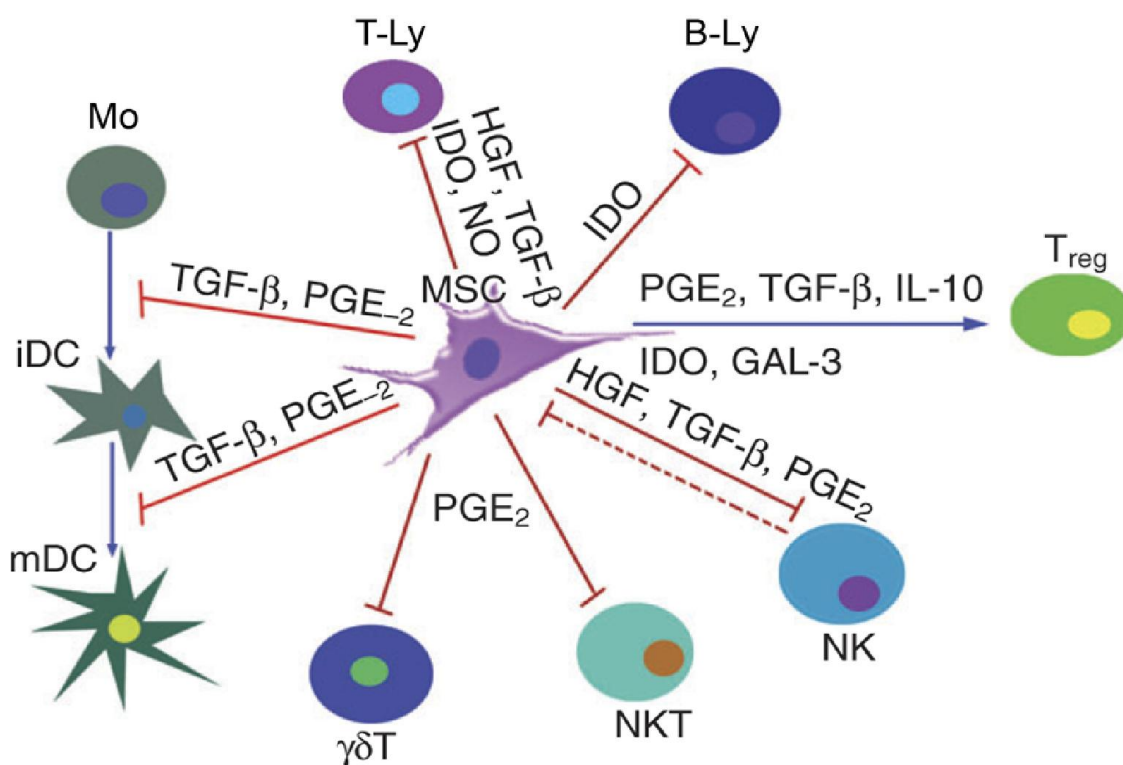
1. Aktivacija MSC od strane inflamatornih citokina, poput interferona- γ (IFN- γ), faktora nekroze tumora- α (TNF- α) i IL-1 α/β , produkovanih u ranoj fazi adaptivnog imunskog odgovora kao posledica obrade i prezentacije antigena i aktivacije efektorskih ćelija. Mnoga istraživanja pokazuju da je za imunosupresivnu aktivnost MSC neophodno prisustvo proinflamatornih medijatora, poput IFN- γ , produkovanih od strane aktiviranih T limfocita (Krampera i sar., 2006; English, 2007; Oh i sar., 2007).

2. Kombinacija pozitivnih i negativnih signala, odnosno signala koji mogu da pospeše ili da onemoguće njihove imunosupresivne mehanizme. Na primer, aktivacija različitih TLR od strane infektivnih agenasa ili endogenih signala opasnosti na različite

načine može da utiče na stimulaciju, odn. inhibiciju imunosupresivnog efekta MSC (Romieu-Mourez *i sar.*, 2009; DelaRosa *i Lombardo*, 2010; Waterman *i sar.*, 2010).

3. Adekvatno vreme uključenja MSC u aktivacione procese efektorskih ćelija. Mnoga *in vitro* istraživanja, ali i iskustva u primeni MSC u terapijske svrhe, ukazuju da imunosupresivni efekat, odnosno uspeh ili neuspeh terapije zavisi od faze imunskog odgovora u kojoj se MSC uključuju (Tisato *i sar.*, 2007; Carrión *i sar.*, 2011; Dokić *i sar.*, 2013).

Imajući sve ovo u vidu, neophodno je dobro voditi računa o mikrosredini ciljnih tkiva i karakterističnim citokinskim profilima bolesti prilikom odlučivanja koji pacijenti bi mogli biti kandidati za potencijalnu primenu MSC u terapijske svrhe.



Slika 1.2. Uticaj MSC na ćelije imunskog sistema. Mezenhimske matične ćelije (MSC), putem različitih solubilnih i membranskih faktora interaguju sa mnogim ćelijama uključenim u imunski odgovor, uključujući T limfocite (T-Ly), B limfocite (B-Ly), regulatorne T (Treg) limfocite, $\gamma\delta$ T limfocite, prirodnoubilačke (NK) i NKT limfocite, kao i na diferencijaciju monocita (Mo) u nezrele dendritične ćelije (iDC) i njihovu maturaciju u zrele DC (mDC). HGF – faktor rasta hepatocita; GAL-3 – galektin-3; IDO – indolamin deoksigenaza; PGE₂ – prostaglandin E₂; TGF- β – transformišući faktor rasta- β . Preuzeto iz Shi *i sar.*, 2011.

1.2. INTERLEUKIN-17

Interleukin-17 (IL-17) je osnivački član nove receptor-ligand familije citokina koja do danas broji 6 srodnih citokina i 5 receptorskih subjedinica. Sve je počelo 1993. godine kada su Rouvier i saradnici objavili da su klonirali novi gen iz biblioteke komplementarnih DNK hibridoma dobijenog fuzijom mišjeg citotoksičnog T limfocita i limfocita pacovskog T-ćelijskog limfoma (*Rouvier i sar., 1993*). Kako je prvobitno pretpostavljeno da se radi o genu poreklom iz mišjeg citotoksičnog T limfocita, nazvan je CTLA-8 (od eng. *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 8*). Kasnije je ustanovljeno da se zapravo radi o genu poreklom iz pacovskog T limfocita (*Yao i sar., 1995^a; Kennedy i sar., 1996*). Pored toga, 57% homologije ovog gena sa sekvencom genoma T limfotropnog virusa *Herpesvirus saimiri*, ORF13, kao i prisustvo ponovaka bogatih adeninom i uracilom (AU) na 3' netranslatiranom regionu informacione RNK (iRNK) ovog gena, upućivalo je da se radi o imunološki aktivnom molekulu (*Rouvier i sar., 1993*). Daljom karakterizacijom ovog molekula i identifikacijom novog receptora koji vezuje CTLA-8 i njegov virusni homolog, HVS13, Yao i saradnici predlažu sledeće termine: IL-17, odnosno vIL-17 za virusni homolog i IL-17R za njihov receptor (*Yao i sar., 1995^a*). Iste i sledeće godine, nezavisno, biva kloniran humani IL-17 iz biblioteke komplementarnih DNK klona CD4⁺ T limfocita i aktiviranih mononuklearnih ćelija periferne krvi (*Yao i sar., 1995^b; Fossiez i sar., 1996*). Sekvenciranjem genoma čoveka i drugih kičmenjaka i metodama bioinformatike otkriveno je još 5 srodnih citokina, koji su zajedno sa prvootkrivenim označeni slovima abecede prema redosledu otkrivanja kao IL-17A do IL-17F (*Aggarwal i Gurney, 2002; Moseley i sar., 2003*). IL-17A i IL-17F pokazuju najveću homologiju u okviru grupe i najviše su izučavani. Humani IL-17A se sekretuje nakon isecanja signalnog peptida od 23 aminokiseline, u vidu N-glikoziliranih ili neglikoziliranih polipeptida koji se kovalentno vezuju u homodimer preko cisteinskih ostataka. Molekulska masa ovog homodimera iznosi od 30 do 38 kDa (*Yao i sar., 1995^b; Fossiez i sar., 1996*). IL-17A i IL-17F takođe mogu da grade i heterodimere *in vitro* (*Wright i sar., 2007*).

Receptor za IL-17 (IL-17R), otkriven 1995. godine, takođe je osnivački član jedinstvene familije citokinskih receptora koja se sastoji od 5 receptorskih subjedinica (IL-17RA do IL-17RE), sa jedinstvenom strukturom i signalizacijom koja ih razlikuje od drugih citokinskih receptora (*Yao i sar., 1995^a; Yao i sar., 1997; Moseley i sar., 2003; Gaffen, 2009*). IL-17RA predstavlja jednostruki glikozilirani transmembranski protein molekulske mase oko 130 kDa i gradi heteromerne komplekse, pre svega sa IL-17RC, ali i sa IL-17RB i IL-17RD. IL-17A i IL-17F, kao homodimeri i heterodimeri, vezuju se za IL-17RA/IL-17RC kompleks. Kako je IL-17RA neophodan za prenos signala i nalazi se u više IL-17R kompleksa, može se pretpostaviti da je on zajednička signalna subjedinica za ovu familiju citokinskih receptora, slično zajedničkim subjedinicama u drugim citokinskim familijama (gp130, βc , γc) (*Gaffen, 2009*).

1.2.1. Produkcija IL-17

Dugo vremena nakon otkrića IL-17 istraživači nisu mogli da se usaglase koji podtip T limfocita produkuje ovaj citokin. Važeća paradigma u to vreme bila je dihotomija pomoćničkih T limfocita, na osnovu citokinskog profila koje sintetišu, na Th1 i Th2 podtip (*Mosmann i sar., 1986*). Tek 2000. godine Infante-Duarte sa saradnicima objavljuje da T limfociti koji u prisustvu *Boreliae burgdorferi* produkuju IL-17 i TNF- α ne pripadaju ni Th1 ni Th2, već zasebnom podtipu Th limfocita (*Infante-Duarte i sar., 2000*). Analizom ekspresije gena, kasnije je potvrđeno da se zaista radi o jedinstvenoj populaciji pomoćničkih T limfocita, označenoj kao Th17, koja pored IL-17A produkuje još i IL-17F, IL-6 i TNF- α (*Harrington i sar., 2005; Langrish i sar., 2005; Park i sar., 2005*). Otkriće Th17 ćelija objasnilo je mnoge nedoslednosti u Th1/Th2 modelu nastanka bolesti posredovanih T limfocitima (*Steinman, 2007*). Danas se zna da između različitih podtipova T limfocita postoje složeni međusobni odnosi, uključujući međusobnu supresiju, ali i kooperaciju, ispoljavanje dvostrukih markerskih citokina (IL-17⁺ IFN- γ ⁺) i prelaska jednog tipa u drugi (plastičnost) (*Zhu i Paul, 2010*).

Pored Th17 limfocita postoje i drugi izvori IL-17, pre svega među ćelijama urođene imunosti koje deluju brzo, odmah na početku infekcije. To su $\gamma\delta$ T limfociti,

NK ćelije, NKT ćelije, ćelije induktori limfoidnog tkiva (LTi), makrofagi, granulociti i dr. (Cua i Tato, 2010; Reynolds i sar., 2010).

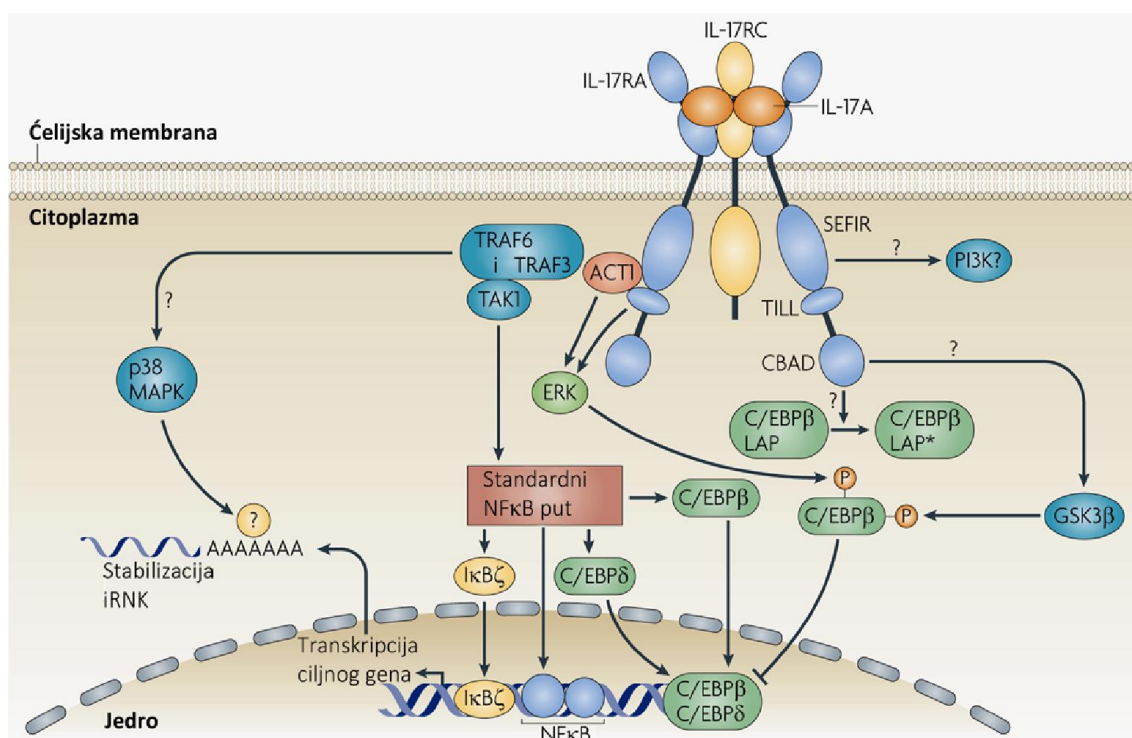
Nakon otkrića Th17 limfocita, usledila su brojna istraživanja o faktorima koji utiču na diferencijaciju ove linije i regulaciju produkcije IL-17. Prvo je pokazano da IL-23, novootkriveni citokin, srodan IL-12, sa kojim deli zajedničku podjedinicu p40, kao i IL-12R β 1 podjedinicu receptora, stimuliše produkciju IL-17 od strane memorijskih T limfocita (Aggarwal i sar., 2003). Kasnija istraživanja su pokazala da je IL-23 bitan za preživljavanje i stabilnost ovih ćelija, dok su za indukciju diferencijacije Th17 limfocita ključni IL-6 i TGF- β (Bettelli i sar., 2006; Veldhoen i sar., 2006). Ovi citokini aktiviraju transkripcione faktore, od kojih su ključni γ t receptor siroče, srodan receptoru retinoične kiseline (ROR γ t) i prenosnik signala i aktivator transkripcije 3 (STAT3). Osim ova tri citokina, pozitivnu ulogu u regulaciji produkcije IL-17 imaju i IL-1 i IL-21, dok su negativni regulatori IL-2, IL-4, IFN- γ , IL-25, IL-27 (O'Shea i sar., 2009).

1.2.2. Signalizacija preko IL-17R

Receptor za IL-17 je ubikvitarno rasprostranjen i njegova ispoljenost je pokazana u gotovo svim ispitivanim ćelijama (**Slika 1.3**). Zajednički konzervirani skrukturni motivi ovih receptora su vanćelijski domen sličan fibronektinu tipa III, i citoplazmatski, SEF/IL-17R (SEFIR) domen. SEFIR domen je homolog TIR (Toll/IL-1 receptor) domenu Toll i IL-1 familije receptora, ali je jedinstven za IL-17R familiju. Shodno tome, ovaj domen ne vezuje adaptorne molekule koji sadrže TIR-vezujuće domene, poput MyD88, TRIF i IRAK. Specifično za IL-17RA lanac je C-terminalni region SEFIR domena, nazvan TIR-like loop (TILL) zbog sličnosti sa delom TIR domena. Za ovaj domen se vezuje aktivator 1 (Act1) nuklearnog faktora κ B (NF κ B), adaptorni protein koji ima SEFIR- i TRAF-vezujući domen. IL-17R indukuje brzu fosforilaciju Act1, koji zatim regrutuje TRAF6 (od eng. *TNF receptor-associated factor 6*) i druge posrednike, dovodeći na kraju do aktivacije transkripcionog faktora NF κ B i članova familije transkripcionih faktora koji se vezuju za CCAAT sekvencu pojačivača gena (eng. *CCAAT enhancer-binding protein, C/EBP*). Osim ovog puta, IL-17 aktivira i

druge nishodne signalne puteve, poput sva tri tipa mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK): ekstracelularnim signalom aktivirana kinaza 1 i 2 (ERK1/2), c-Jun N-terminalna kinaza (JNK) i p38. Pojedina istraživanja takođe ukazuju i na mogućnost učešća fosfatidilinozitol-3 kinaza (PI3K), kao i Janus kinaza (Jak) i STAT puta prenosa signala (Novatchkova i sar., 2003; Rahman i sar., 2006; Gaffen, 2009).

Osim ovih pozitivnih signalnih puteva, IL-17 takođe može da pokrene i inhibitorne puteve prenosa signala i tako kontroliše sopstvenu aktivnost. Naime, na distalnom kraju citoplazmatskog domena IL-17RA se nalazi C/EBP β aktivacioni domen (C-BAD) koji preko TRAF3 i 3 β -kinaze glikogen sintaze (GSK3 β) posreduje u supresivnoj signalizaciji (Shen i sar., 2009; Zhu i sar., 2010).



Slika 1.3 IL-17R i signalni putevi. IL-17R kompleks je sastavljen od IL-17RA i IL-17RC subjedinice. Obe subjedinice imaju SEF/IL-17R (SEFIR) domene preko kojih vezuju adaptorni molekul Act1 koji dalje pokreće nishodne signalne procese, uključujući MAP kinaze, NF- κ B i C/EBP transkripcione faktore. Pored SEFIR domena, IL-17RA subjedinica sadrži i petlju sličnu Toll/IL-1R – TIR-like loop (TILL) i C/EBP β aktivacioni domen (C-BAD). I κ B ζ – NF- κ B inhibitor- ζ ; IRF3 – interferon regulatorni faktor 3; PI3K, fosfoinozitol 3-kinaza; TRAF – faktor povezan sa TNF receptorom. Preuzeto iz Gaffen i sar., 2009.

Koji će signalni put biti aktiviran zavisi od tipa ćelija i od mikrosredine u kojoj se nalaze. Jedna od osnovnih karakteristika IL-17 je njegova umerena aktivnost. Često svoje efekte ispoljava samo u kombinaciji sa drugim faktorima. Tako, na primer TNF- α , IFN- γ i IL-1 često imaju aditivno i sinergističko dejstvo u kombinaciji sa IL-17 (*Fossiez i sar., 1996; Fossiez i sar., 1998; Chabaud i sar., 2001; Katz i sar., 2001*), dok IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β i PGE₂ ispoljavaju antagonističko dejstvo sa ovim citokinom (*Jovanovic i sar., 1998; Chabaud i sar., 2001*). Ova modulišuća uloga IL-17 u aktivnosti drugih faktora dala mu je epitet „citokina za fino podešavanje“ (*Katz i sar., 2001*). Moguće je da ovim mehanizmom IL-17 lokalizuje i amplifikuje efekat proinflamatornih medijatora na mestu lezije.

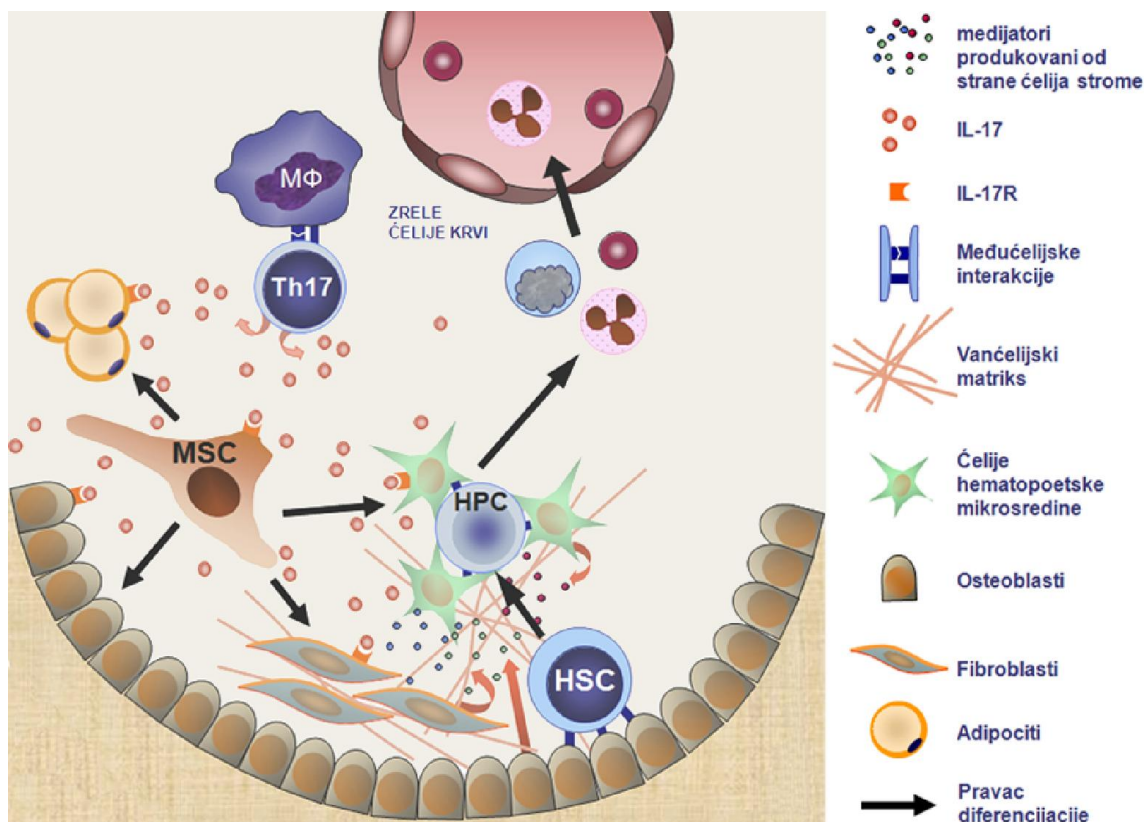
1.2.3. Biološki efekti IL-17

Zahvaljujući širokoj tkivnoj distribuciji svog receptora, IL-17 ima izuzetno plejotropno dejstvo. On je pretežno proinflamatorni citokin, jer ima pozitivan uticaj na produkciju i funkciju različitih inflamatornih medijatora, a ima i značajnu ulogu u mnogim autoimunskim i inflamatornim bolestima. IL-17 deluje prvenstveno na stromalne, epitelne i endotelne ćelije indukujući u njima ekspresiju gena za antimikrobne proteine (β -defenzin, S100, lipokalin 2), citokine (IL-6, IL-1 β , TNF- α), hemokine (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8, CXCL10, CCL2, CCL20), faktore rasta (faktor stimulacije rasta granulocitnih kolonija (G-CSF), GM-CSF, faktor rasta matičnih ćelija (SCF)), enzime uključene u remodelovanje tkiva (receptor aktivator NF κ B (RANK), osteoprotegerin, matriks-metaloproteinaze (MMP)1, MMP3, MMP9, MMP13) i dr. (*Xu i Cao, 2010*). Pored toga, delovanjem na ciklooksigenazu 2 i inducibilnu NO sintazu, IL-17 stimuliše produkciju PGE₂ i NO (*LeGrand i sar., 2001; Trajkovic i sar., 2001*).

IL-17 ima najznačajniju ulogu u prvoj liniji odbrane organizma od patogena, pre svega bakterija i gljivica, ali i virusa. Strateška raspoređenost ćelija koje proizvode IL-17 na epitelnim barijerama omogućava brzi odgovor na invaziju patogenih mikroorganizama (*Marks i Craft, 2009*). Antimikrobni proteini, poput β -defenzina i

S100 proteina, indukovani su od strane IL-17 u epitelnim ćelijama pluća, creva i kože (Kao i sar., 2004; Liang i sar., 2006). CXC i CC hemokini, čiju produkciju stimulise IL-17, regrutuju granulocite i monocite, a G-CSF i GM-CSF stimulise njihovu produkciju i mobilizaciju (Ye i sar., 2001). Receptor za hemokin CCL20, CCR6, ispoljen je na DC i T limfocitima, uključujući i Th17 limfocite, tako da se produkcijom ovog hemokina ostvaruje pozitivna povratna sprega. IL-17 stimulise *in vitro* produkciju mnogobrojnih inflamatornih molekula (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12, MMP3, PGE₂ i antagonista IL-1 receptora (IL-1Ra)) u humanim makrofagima (Jovanović i sar., 1998). Na mišjim DC IL-17 povećava ekspresiju MHC molekula II klase, CD11c, CD40, CD80 i CD86, podstiče maturaciju i povećava njihovu alostimulatornu aktivnost *in vitro* (Antonysamy i sar., 1999).

Miševi deficijentni u IL-17RA su podložni bolestima uslovljenim neadekvatnom aktivnošću neutrofila (Lindén i sar., 2005), dok prekomerna ekspresija IL-17 u plućima dovodi do infiltracije neutrofilima, posredovane hemotaksom i granulopoezom (Schwarzenberger i sar., 2000). Odbrana miševa od bakterije *Klebsiella pneumoniae* direktno je uslovljena funkcionalnim receptorom za IL-17, a povećani broj bakterija u plućima, diseminacija u jetru i smrtnost životinja povezana je sa odloženom regrutacijom neutrofila zbog smanjene ekspresije G-CSF i makrofagnog inflamatornog proteina-2 (MIP-2) u plućima miševa (Ye i sar., 2001). Deficit u IL-17 i/ili IL-17R uzrokuje povećanu sklonost miševa ka mukokutanoj i sistemsnoj kandidijazi. Sklonost mukokutanoj kandidijazi, ali i stafilokoknoj infekciji potvrđena je i u nekim „eksperimentima prirode“, tačnije urođenim humanim monogenkim bolestima, u kojima je pogođen IL-17. U hiper IgE sindromu (HIES), u kojem postoji dominantno negativan gubitak gena za STAT3 i sledstvene deficijencije Th17 limfocita, dolazi, između ostalog, do pojave mukokutane kandidijaze, stafilokonih infekcija, ekcema, apscesa i dr. (Ma i sar., 2008) U retkim slučajevima defekta u genu za IL-17RA ili IL-17F, takođe se javljaju mukokutane kandidijaze i stafilokokne infekcije (Puel i sar., 2011).



Slika 1.4 Uloga IL-17 i MSC u regulaciji hematopoeze u kostnoj srži. IL-17 je deo mreže citokina uključenih u regulaciju hematopoeze. Ovaj citokin utiče na diferencijaciju, umnožavanje i mobilizaciju hematopoetskih i mezenhimskih matičnih ćelija preko svojih receptora ispoljenih na ćelijama strome kostne srži, modulišući ekspresiju različitih solubilnih i membranskih faktora od strane ovih ćelija. MSC imaju sposobnost diferencijacije u sve nehematopoetske ćelije kostne srži, uključujući osteoblaste, adipocite, fibroblaste, ćelije hematopoetske mikrosredine i endotelne ćelije, koje produkcijom različitih solubilnih faktora i komponenti vanćelijskog matriksa, kao i direktnom međućelijskom interakcijom učestvuju u regulaciji hematopoeze. MSC – mezenhimske matične ćelije; HSC – matična ćelija hematopoeze; HPC – hematopoetski progenitori; MΦ – makrofagi.

Osim uloge u odbrani organizma IL-17 ima i ulogu u održavanju homeostaze, posebno u metabolizmu kosti (*Shen i sar., 2008*) i hematopoezi (*Krstic i sar., 2012*). Stimulacijom produkcije hematopoetskih faktora, kao što su G-CSF, GM-CSF, SCF i IL-6, od strane ćelija strome, IL-17 povezuje imunski i hematopoetski sistem (**Slika 1.4**). Prva istraživanja uloge IL-17 u procesu hematopoeze su pokazala njegovu veoma značajnu ulogu u granulopoezi (*Fossiez i sar., 1996; Schwarzenberger i sar., 1998*). IL-17 je indukovao proliferaciju humanih CD34⁺ ćelija kostne srži *in vitro* i

njihovo sazrevanje u granulocite, ali samo u prisustvu fibroblasta, koji su pod uticajem ovog citokina produkovali hematopoetske citokine, G-CSF i IL-6 (*Fossiez i sar., 1996*). Uticaj IL-17 na granulopoezu, zavisnu od G-CSF, SCF i IL-6, potvrđen je i u *in vivo* modelima (*Schwarzenberger i sar., 1998; Schwarzenberger i sar., 2000; Schwarzenberger i sar., 2002; Jovčić i sar., 2004; Jovčić i sar., 2007*). Kasnije je pokazan uticaj IL-17 i na eritroidne progenitore, kako *in vitro*, tako i *in vivo* (*Jovčić i sar., 2001; Bugarski i sar., 2004; Jovčić i sar., 2004; Jovčić i sar., 2007; Krstić i sar., 2009^a; Krstić i sar., 2010*). U ovom slučaju, takođe, podaci ukazuju da je dejstvo IL-17 indirektno, preko indukcije sekrecije sekundarnih medijatora: IL-6, eritropoetina i NO. Efekti IL-17 na hematopoetske ćelije umnogome zavise od mikrosredine, stepena opredeljenosti i stanja organizma. Tako, IL-17 u kostnoj srži miša stimuliše rast manje zrelih progenitora eritroidne loze, BFU-E (od eng. *burst-forming unit – erythroid*), dok smanjuje broj zrelijih progenitora, CFU-E (od eng. *colony-forming unit – erythroid*). S druge strane, u slezini je obrnuta situacija (*Jovčić i sar., 2007*), što može biti posledica razlike u sekundarnim medijatorima indukovanim od strane IL-17 u ova dva organa ili posledica mobilizacije ovih progenitora iz kostne srži, budući da je nađen povećan broj CFU-E u perifernoj krvi miševa nakon višekratnog ubrizgavanja IL-17 (*Krstić i sar., 2010*). Najizraženiji efekat IL-17 ima na zrelije prethodnike mijeloidne i eritroidne loze što je u skladu sa potrebom da se brzo i u dovoljnom broju regrutuju preko potrebne zrele ćelije u slučajevima izmenjenog stanja organizma. Shodno tome, osetljivost hematopoetskih prethodnika se razlikuje i u zavisnosti od toga da li je stanje organizma konstitutivno ili izmenjeno, npr. u situacijama izmenjene hematopoeze, prilikom zračenja ili infekcije (*Jovčić i sar., 2001; Bugarski i sar., 2006*). Ovi primeri još jednom ukazuju na ulogu IL-17 u finom balansiranju funkcija različitih sistema u skladu sa potrebama organizma.

1.2.4. IL-17 i MSC

Ciljne ćelije delovanja IL-17 su najčešće stromalne ćelije. Tome u prilog ide i posebno visoka ispoljenost IL-17RA na stromalnim ćelijama kostne srži, uključujući i MSC (*Fossiez i sar., 1996; Silva i sar., 2003; Huang i sar., 2009*). Ipak, uticaj IL-17 na

funkciju samih stromalnih ćelija, a posebno MSC, nije bio mnogo izučavan. Tek nedavno je pokazano da IL-17 ima ulogu faktora rasta mišjih i humanih MSC iz kostne srži i da značajno utiče na njihov potencijal za proliferaciju i diferencijaciju (Huang i sar., 2006; Huang i sar., 2009). IL-17 stimuliše proliferaciju mišjih MSC iz kostne srži na dozno-zavisan način i povećava broj i prosečnu veličinu kolonija CFU-F iz humane i miše kostne srži.

Što se tiče uticaja IL-17 na diferencijacioni potencijal MSC, podaci su različiti i zavise od vrste domaćina i tkiva iz kojeg su izolovane. IL-17 stimuliše osteogenu (Huang i sar., 2009), a inhibira adipogenu diferencijaciju humanih MSC (Shin i sar., 2009). S druge strane, rezultati istraživanja uticaja IL-17 na diferencijacioni potencijal ćelijske linije mišjih multipotentnih mioblasta, C2C12, pokazali su da ovaj citokin dovodi do inhibicije miogene diferencijacije C2C12 i skretanja diferencijacionog puta u pravcu osteoblasta, delujući preko ERK1/2 MAP kinaznog puta (Kocić i sar., 2012). Na istim ćelijama Lee i saradnici su prethodno pokazali da IL-17 dovodi do aktivacije PPAR γ transkripcionog faktora i njihove posledične transdiferencijacije u adipocite (Lee i sar., 2011).

Ova istraživanja ukazuju da su efekti IL-17 na MSC, kao i na drugim ćelijama, mnogobrojni i raznovrsni i da umnogome zavise od eksperimentalnog modela na kojem su ispitivani. Međutim, efekti IL-17 na MSC još nisu dovoljno istraženi, a naročito su nedovoljno izučeni mehanizmi i značaj njegovog delovanja na MSC. Do sada nisu rađena istraživanja koja bi pokazala da li IL-17 utiče na imunomodulatorna svojstva MSC. Imajući u vidu da imunomodulatorna svojstva MSC zavise od citokinskog miljea (Krampera i sar., 2011), istraživanja u ovom smislu su vrlo značajna, naročito ako se ima u vidu njihova potencijalna klinička primena.

2.

***CILJEVI
ISTRAŽIVANJA***

Zahvaljujući višestrukome potencijalu u regulaciji hematopoeze, regeneraciji tkiva i imunomodulaciji, kao i relativno lakoj dostupnosti iz adultnih tkiva, intenzivirana su istraživanja kako same biologije MSC, tako i ona usmerena ka mogućnosti njihove terapijske primene. Iako je u poslednjoj deceniji došlo do značajnog i brzog napretka u razumevanju njihove prirode, raznovrsnih funkcija i mehanizama njihovog delovanja, još smo daleko od rasvetljavanja nekih osnovnih pitanja ključnih za njihovu efikasnu i bezbednu kliničku primenu. Poslednjih godina se sve više uviđa i značaj lokalne mikrosredine u usmeravanju MSC ka obavljanju svojih mnogobrojnih i neretko suprotstavljenih funkcija. Imajući u vidu ulogu IL-17 u različitim fiziološkim i patološkim procesima organizma, značajno je ispitati efekat ovog citokina na osnovne karakteristike MSC, njihovu diferencijaciju, kapacitet podržavanja hematopoeze i imunomodulatornu sposobnost. Uticaj IL-17 na diferencijaciju je već pokazan na nekim MSC humanog i mišjeg porekla (*Huang i sar., 2009; Shin i sar., 2009; Lee i sar., 2011; Kocić i sar., 2012*), ali nema podataka o njegovom uticaju na druge funkcije MSC.

Uprkos velikim teškoćama izolovanja i kultivisanja mišjih MSC, miš ostaje najpogodniji model za osnovna istraživanja ćelijskih funkcija i razvoja tkiva, kao i za razna patološka stanja i pretklinička istraživanja. Veliki broj istraživanja je rađen na mišjim MSC izolovanim iz različitih sojeva miševa, ali prema nama dostupnim podacima, do sada nisu objavljena istraživanja na MSC izolovanim iz kostne srži CBA soja miša.

U kontekstu definisanja efekata IL-17 na MSC, kao i mehanizama njegovog delovanja na MSC izolovane iz kostne srži miša postavljena je i sledeća

Radna hipoteza

IL-17 deluje na mezenhimske matične ćelije kostne srži tako što moduliše njihove funkcionalne karakteristike, uključujući proliferaciju, diferencijaciju, imunomodulatorna svojstva i kapacitet podržavanja hematopoeze.

Radi dobijanja podataka koji potvrđuju ovu hipotezu postavljeni su i sledeći

Ciljevi istraživanja

- Izolacija i karakterizacija mezenhimskih matičnih ćelija kostne srži miša.
- Ispitivanje uticaja IL-17 na preživljavanje, proliferaciju, diferencijaciju, imunomodulatorna svojstva i kapacitet održavanja hematopoeze mezenhimskih matičnih ćelija kostne srži miša.
- Ispitivanje uticaja IL-17 na aktivaciju signalnih molekula, ekspresiju gena i sintezu proteina neophodnih za specifične funkcije mezenhimskih matičnih ćelija kostne srži miša pod uticajem IL-17.
- Ispitivanje uloge NO u efektima IL-17 na mezenhimske matične ćelije kostne srži miša.

Da bi se postigli ovi ciljevi, istraživanja su se odvijala u sledećim pravcima:

Izolacija mezenhimskih matičnih ćelija iz kostne srži miševa CBA/H soja (mBM-MSC).

Karakterizacija prema kriterijumima Komiteta za mezenhimske matične ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju (*Dominici i sar., 2006*). Ispitivanje sledećih karakteristika:

- sposobnost adhezije mBM-MSC za plastiku i sposobnost stvaranja kolonija ćelija sličnih fibroblastima (CFU-F testom);
- pozitivna ekspresija mezenhimskih markera i odsustvo ekspresije hematopoetskih markera na mBM-MSC, analizirana primenom imunofluorescentne mikroskopije i metodom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimeraze (RT-PCR);
- sposobnost mBM-MSC da se diferenciraju u četiri ćelijske loze, nakon kultivacije u odgovarajućim medijumima za indukciju diferencijacije u pravcu osteoblasta, hondrocita, adipocita i miofibroblasta. Stepem diferencijacije ćelija,

određen citoheмиjskim bojenjem na aktivnost alkalne fosfataze za osteogenu diferencijaciju, safraninom za hondrogenu diferencijaciju, Oil Red O bojom za adipogenu diferencijaciju i imunofluorescentnim obeležavanjem α -aktina glatkih mišića (α -SMA) za miofibroblastnu diferencijaciju;

- imunomodulatorna svojstva mBM-MSС, određena u testu mitogenom stimulisanе proliferacije limfocita merene stepenom ugradnje Br-deoksi-uridina (BrdU);
- kapacitet podržavanja hematopoeze *in vitro* u kokulturi mBM-MSС i neadherentnih ćelija kostne srži miša, na osnovu praćenja broja ukupnih neadherentnih ćelija, analize formiranja kolonija hematopoetskih ćelija i analize morfološki prepoznatljivih hematopoetskih prekursora u različitim vremenskim intervalima.

Analiza uticaja IL-17 na karakteristike mBM-MSС:

- preživljavanje i proliferacija mBM-MSС u prisustvu IL-17;
- pozitivna ekspresija mezenhimskih markera IL-17 tretiranih mBM-MSС, određena imunofluorescentnom mikroskopijom, odn. metodom RT-PCR;
- sposobnost diferencijacije IL-17 pretretiranih mBM-MSС u različite ćelijske loze, nakon kultivacije u odgovarajućim medijumima za indukciju diferencijacije u pravcu osteoblasta i adipocita. Analiza stepena diferencijacije, određena bojenjem na aktivnost alkalne fosfataze za osteogenu diferencijaciju i Oil Red O bojom za adipogenu diferencijaciju, kao i na osnovu ekspresije odgovarajućih gena karakterističnih za određene ćelijske loze, metodom RT-PCR;
- imunomodulatorna svojstva IL-17 pretretiranih mBM-MSС, ispitana u testu mitogenom stimulisanе proliferacije limfocita merene stepenom ugradnje BrdU;
- kapacitet podržavanja hematopoeze *in vitro* u kokulturi IL-17 pretretiranih mBM-MSС i neadherentnih ćelija kostne srži miša, na osnovu praćenja broja ukupnih neadherentnih ćelija, analize formiranja kolonija hematopoetskih

ćelija i analize morfološki prepoznatljivih hematopoetskih prekursora u različitim vremenskim intervalima.

- analiza aktivacije signalnih puteva u mBM-MSC, Western blot metodom i primenom odgovarajućih farmakoloških inhibitora;
- analiza uloge NO kao medijatora u efektima IL-17 na hematopoezu i imunomodulaciju, ispitana određivanjem nivoa nitrita, određivanjem proteinske i genske ekspresije inducibilne NO sintaze (iNOS) i endotelne NO sintaze (eNOS), kao i korišćenjem neselektivnog inhibitora NO sintaza.
- analiza ulogeIDO kao medijatora u imunomodulatornim svojstvima mBM-MSC primenom specifičnog inhibitora.

3.

***MATERIJAL
I
METODE***

3.1. REAGENSI

Podaci o korišćenim reagensima i njihovom poreklu prikazani su u **Tabeli 1.**

Tabela 1. Reagensi korišćeni u eksperimentima

Naziv	Proizvođač
Rekombinantni humani bazni FGF (bFGF)	R&D Systems, V. Britanija
Rekombinantni mišji IL-17	R&D Systems, V. Britanija
Rekombinantni humani TGF- β 1	R&D Systems, V. Britanija
Zečje anti-fosfo-p38 (T180/Y182) antitelo	R&D Systems, V. Britanija
Zečje anti-p38 α antitelo	R&D Systems, V. Britanija
Zečje anti-fosfo-JNK (T183/Y185) antitelo	R&D Systems, V. Britanija
Zečje anti-pan JNK antitelo	R&D Systems, V. Britanija
Mišje anti-fosfo-tirozinsko antitelo	R&D Systems, V. Britanija
Mišje anti-iNOS antitelo	BD Bioscience, SAD
Mišje anti-eNOS antitelo	BD Bioscience, SAD
Mišje anti-Stro-1 antitelo	R&D Systems, V. Britanija
Mišje anti-fosfo-ERK1/2 (p44/42) (T202/Y204) antitelo	Cell Signaling Technology, SAD
Zečje anti-ERK1/2 (p44/42) antitelo	Cell Signaling Technology, SAD
Zečje anti-IL-17R antitelo	Santa Cruz Biotech, SAD
Mišje anti-vimentin antitelo	Santa Cruz Biotech, SAD
Mišje anti- α -SMA antitelo	Sigma-Aldrich, SAD
Mišje anti Br-deoksi-uridin antitelo	Sigma-Aldrich, SAD
Kozji anti-zečji imunoglobulin G, konjugovan peroksidazom	Santa Cruz Biotech, SAD
Kozji anti-mišji imunoglobulin G, konjugovan peroksidazom	PierceBiotechnology, SAD
MethoCult [®] GF M3434	Stem Cell Technologies, Kanada
StemSep [®] Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Enrichment Kit	Stem Cell Technologies, Kanada
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, SAD
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich, SAD
Trypsin	Serva, Nemačka
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)	Serva, Nemačka
Tween-20	Sigma-Aldrich, SAD
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	AppliChem, Nemačka
Fitohemaglutinin (PHA)	INEP, Srbija
Medijum za sepraciju limfocita (LSM 1077)	PAA Laboratories, Austrija
Fetalni goveđi serum (FBS)	PAA Laboratories, Austrija
Konjski serum	PAA Laboratories, Austrija
Penicilin i streptomycin	PAA Laboratories, Austrija

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories, Austrija
L-glutamin	PAA Laboratories, Austrija
Etilendiaminotetraacetat (EDTA)	AppliChem, Nemačka
Deksametazon	AppliChem, Nemačka
Hidrokortizon-acetat	Galenika a.d, Srbija
Mitomycin C	AppliChem, Nemačka
β -glicerofosfat dinatrijumova so, hidrat	AppliChem, Nemačka
3-izobutil-1-metilksantin (IBMX)	AppliChem, Nemačka
Insulin (Actrapid)	NovoNordisc, Danska
May-Grunwald	Alkaloid, Makedonija
Giemsa	Merck Chemicals, Nemačka
Safranin O	Merck Chemicals, Nemačka
Oil Red O	Merck Chemicals, Nemačka
askorbinska kiselina	Sigma-Aldrich, SAD
Nitro blue tetrazoliumova (NBT) so	Sigma-Aldrich, SAD
3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5 difenil-tetrazolijum bromid (MTT)	Sigma-Aldrich, SAD
N-(1-naftil)-etilendiamin-dihidrohlorid	HiMedia Laboratories, Indija
Sulfanilamid	AppliChem, Nemačka
5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat (BCIP)	Sigma-Aldrich, SAD
4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI)	Sigma-Aldrich, SAD
Kozji anti-mišji IgG konjugovan fluorescein izotioacijanatom (FITC)	Sigma-Aldrich, SAD
Mišje anti-fibronektin antitelo	Chemicon Int., SAD
Mišje anti-endoglin antitelo dobijeno iz hibridoma (mAb MJ7/18)	poklon od dr C. Bernabeu, CIB, CSIC, Madrid, Španija
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA	Fermentas, SAD
PCR Master Mix (2X)	Fermentas, SAD
Br-deoksi-uridin (BrdU)	Sigma-Aldrich, SAD
3,3',5,5'-tetrametilbenzidin dihidrohlorid hidrat (TMB)	Sigma-Aldrich, SAD
Nw-nitro-L-arginin metil estar dihidrohlorid (L-NAME, neselektivni inhibitor NO sintaza)	Sigma-Aldrich, SAD
1-metil triptofan (inhibitorIDO)	Sigma-Aldrich, SAD
PP2 (selektivni inhibitor Src familije tirozin kinaza)	Tocris, Velika Britanija
AG490 (inhibitor Jak2/3 i kinaze receptora za epidermalni faktor rasta (EGFR))	Tocris, Velika Britanija
Genistein (specifični inhibitor protein tirozin kinaza, uključujući EGFR-kinaze)	Tocris, Velika Britanija
PD98059 (inhibitor MEK1,2/ERK1,2)	Tocris, Velika Britanija
SB203580 (inhibitor p38)	Tocris, Velika Britanija
SP600125 (inhibitor JNK)	Tocris, Velika Britanija

3.2. MEDIJUMI I PUFERI

Kao standardni medijum za kultivaciju korišćena je Dulbekova modifikacija Iglovog medijuma sa 4,5 g/l glukoze (DMEM), obogaćena 10% fetalnim telećim serumom (FBS) sa dodatkom 100 U/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina.

Medijum za ekspanziju mBM-MSC se sastojao od standardnog medijuma kojem je dodat 1 ng/ml bFGF.

Medijum za osteogenu diferencijaciju se sastojao od standardnog medijuma kojem je dodat 10 nM deksametazon, 50 µM askorbinska kiselina i 10 mM β-glicerofosfat.

Medijum za adipogenu diferencijaciju se sastojao od standardnog medijuma kojem je dodat 1 µM deksametazon, 10 µg/ml insulina i 100 µg/ml IBMX.

Medijum za hondrogenu diferencijaciju se sastojao od standardnog medijuma kojem je dodat 10 nM deksametazon, 200 µM askorbinska kiselina i 5 ng/ml TGF-β1.

Fosfatom puferovan fiziološki rastvor (PBS) je pravljen razblaživanjem 10 puta koncentrovanog komercijalnog rastvora u vodi za injekcije u odnosu 1:9.

Trisom puferovan fiziološki rastvor (TBS), pH 7,5, se sastojao od 50 mM Tris pufera i 100 mM NaCl u redestilovanoj vodi.

Pufer za liziranje eritrocita, pH 7,2-7,4, se sastojao od 155 mM NH₄Cl, 0,1 mM Na₂EDTA i 10 mM NaHCO₃ u PBS-u.

Medijum za dugotrajnu kulturu kostne srži (eng. *long term bone marrow culture*, LTBMC) se sastojao od RPMI-1640 medijuma obogaćenog 10% fetalnim telećim serumom i 10% konjskim serumom, uz dodatak 1 µM hidrokortizona, 100 U/ml penicilina i 100 µg/ml streptomicina.

3.3. ŽIVOTINJE

Miševi inbrednog soja CBA/H su uzgajani u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu. Za potrebe izolovanja mBM-MSC iz kostne srži i ćelija iz slezine, korišćeni su mužjaci miševa starosti od 8 do 10 nedelja. Eksperimentalni protokol je odobren od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Instituta za medicinska istraživanja i Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.4. ĆELIJE I ĆELIJSKE KULTURE

3.4.1. Izolacija i kultivacija mBM-MSC

Miševi su žrtvovani cervikalnom dislokacijom. Njihovi femuri i tibije su izvađeni i pažljivo očišćeni od zaostalog mekog tkiva oko kosti. Kostna srž je izdvojena ponavljanim ispiranjem šupljine kosti DMEM medijumom i sakupljena suspenzija ćelija je pripremljena u standardnom medijumu. Ćelije su zasađene u koncentraciji od $0,5 \times 10^6$ do 1×10^6 ćelija/cm² u flaskove za tkivne kulture u medijumu za ekspanziju. Ova primarna ćelijska suspenzija kostne srži je inkubirana na 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂ i relativnom vlažnošću 100% (standardni uslovi kultivacije). Medijum je menjan svaka 2-3 dana. Mišje BM-MSC su izdvojene na osnovu sposobnosti adhezije za plastiku posude za tkivne kulture, dok su neadherentne, hematopoetske ćelije, odstranjene prilikom promene medijuma. Nakon 2 do 3 nedelje kultivacije, odnosno kada su mBM-MSC dostigle oko 80% konfluentnosti, ćelije su odlepljene pomoću 0,25% tripsina i 1 mM EDTA, a zatim su ponovo posadene u koncentraciji od $1,5 \times 10^4$ do 3×10^4 ćelija/cm² u medijumu za ekspanziju. Sve naredne pasaže mBM-MSC su kultivisane na isti način i sakupljane pri konfluentnosti od oko 80% (supkonfluentnost).

3.4.2. Izolacija hematopoetskih ćelija kostne srži

Kao hematopoetske ćelije u sistemu dugotrajne kulture kostne srži (LTBMC) korišćene su ćelije izdvojene iz neadherentne frakcije mononuklearnih ćelija kostne srži miša. Mononuklearne ćelije kostne srži su izolovane iz suspenzije ukupnih ćelija kostne srži primenom gustinskog gradijenta LSM 1077. Suspenzija ukupnih ćelija kostne srži u DMEM medijumu, izolovana na prethodno opisan način, naneta je na 2 ml LSM 1077 i centrifugirana 30 minuta pri relativnoj centrifugalnoj sili od $400 \times g$ na sobnoj temperaturi bez kočnica. Gornji sloj medijuma je uklanjan i mononuklearne ćelije iz interfaznog sloja su pažljivo sakupljane, resuspendovane u DMEM medijumu i isprane od gradijenta centrifugiranjem 10 minuta na $800 \times g$, a zatim još 2 puta centrifugiranjem po 10 minuta na $400 \times g$. Na kraju su ćelije resuspendovane u standardnom medijumu za kultivaciju i postavljene u flask za ćelijske kulture radi adhezije stromalnih ćelija. Nakon 24 h inkubacije u standardnim uslovima kultivacije, hematopoetske ćelije su sakupljane kao neadherentna frakcija i dalje postavljane u kokulturu sa mBM-MSC prema opisanom protokolu.

3.4.3. Izolacija ćelija slezine

Slezine su izvađene iz žrtvovanih miševa i ćelije su izolovane pasiranjem tkiva slezine kroz metalnu mrežicu, uz ispiranje DMEM medijumom i kasnijim prošpricavanjem suspenzije kroz 21 G iglu. Nakon toga ćelije su istaložene centrifugiranjem 10 minuta na $400 \times g$, a zatim resuspendovane u puferu za lizu eritrocita i inkubirane do 5 minuta na sobnoj temperaturi uz mešanje. Nakon liziranja eritrocita, slezinske ćelije su istaložene centrifugiranjem 5 minuta na $200 \times g$, a zatim isprane još jednom PBS-om, centrifugiranjem 10 minuta na $400 \times g$, i resuspendovane u standardnom medijumu za kultivaciju.

3.4.4. Izolacija humanih mononuklearnih ćelija periferne krvi

Humane mononuklearne ćelije (PBMC) su izolovane iz pune krvi uzete venepunkcijom od zdravih dobrovoljnih davalaca, uz potpisan informisani pristanak. Puna krv je razblažena u odnosu 1:1 sa RPMI-1640 medijumom, nakon čega je naneta na 15 ml LSM 1077 gradijenta i centrifugirana 30 minuta na $400 \times g$ na sobnoj temperaturi bez kočnica. Gornji sloj plazme je uklanjan i PBMC iz interfaznog sloja su pažljivo sakupljane, resuspendovane u RPMI-1640 medijumu i isprane od gradijenta centrifugiranjem 10 minuta na $800 \times g$, a zatim još 2 puta po 10 minuta na $400 \times g$. Na kraju su ćelije resuspendovane u standardnom medijumu za kultivaciju.

3.5. PROLIFERACIJA

Stepen proliferacije ćelija analiziran je MTT testom. Mišje BM-MSC su zasejavane u medijumu bez FBS u koncentraciji od 5×10^3 ćelija po otvoru ploče sa 96 otvora i inkubirane 24 h u standardnim uslovima kultivacije. Narednog dana, medijum je zamenjen standardnim medijumom sa ili bez faktora u odgovarajućoj koncentraciji (5 ng/ml ili 50 ng/ml IL-17 i/ili 1 ng/ml bFGF) i kultivacija je nastavljena pod istim uslovima. Nakon odgovarajućeg perioda inkubacije (3 i 6 dana) ćelijama je dodavan MTT u koncentraciji od 0,5 mg/ml i inkubacija je nastavljena još 3 h. Metabolički aktivne ćelije prevode rastvorljivu tetrazolijumsku so u nerastvorljive kristale formazana, koji su rastvarani u izopropanolu zakišljenom 0,1 M HCl. Apsorpcija svetlosti talasne dužine 540 nm merena je na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (Labsystems Multiskan PLUS, Finska).

Radi određivanja uloge protein tirozin kinaza (PTK) i MAPK signalnih puteva u efektima IL-17 i bFGF na proliferaciju mBM-MSC, ćelije su inkubirane u standardnim uslovima kultivacije u prisustvu specifičnih inhibitora ovih puteva 30 minuta pre izlaganja faktorima (50 ng/ml IL-17 i/ili 1 ng/ml bFGF) i to: 10 μ M AG490, 10 μ M PP2, 10 μ M Genistein, 25 μ M PD98059, 5 μ M SP600125 i 10 μ M SB203580. Proliferacija je određivana MTT testom prema već opisanom postupku.

3.6. ANALIZA KLONOGENOG POTENCIJALA MSC

Za određivanje klonogenog potencijala mBM-MSK korišćen je CFU-F test. Čelije su zasejavane u koncentraciji od $2,5 \times 10^6$, 5×10^6 i 10×10^6 ćelija po otvoru površine $9,6 \text{ cm}^2$ ploče sa šest otvora, u standardnom medijumu za kultivaciju sa ili bez faktora u odgovarajućoj koncentraciji (5 ng/ml ili 50 ng/ml IL-17 i/ili 1 ng/ml bFGF), u duplikatu. Nakon osam dana inkubacije u standardnim uslovima kultivacije, ćelije su ispirane PBS-om, fiksirane ledenim metanolom u trajanju od 4 minuta i bojene Giemsa bojom u trajanju od 10 minuta. Nakon ispiranja vodom, brojane su vidljive kolonije pod invertnim mikroskopom. Kriterijum za koloniju je podrazumevao grupaciju od minimum 50 ćelija.

3.7. DIFERENCIJACIJA

3.7.1. Osteogena diferencijacija

Čelije su kultivisane u pločama sa šest otvora i inkubirane u standardnom medijumu, pri standardnim uslovima kultivacije, do postizanja supkonfluentnosti. Da bi se usmerile ka osteogenoj diferencijaciji, ćelije su zatim inkubirane u medijumu za osteogenu diferencijaciju. Inkubacija ćelija je trajala 14 dana uz zamenu medijuma na svaka 2-3 dana. Nakon toga, u cilju potvrde osteogene diferencijacije, rađen je test aktivnosti alkalne fosfataze. Čelije su fiksirane 3,5% rastvorom formaldehida u etanolu u trajanju od 30 sekundi na sobnoj temperaturi, a potom im je dodavan hromogen za alkalnu fosfatazu, BCIP/NBT. Reakcija je zaustavljena dodatkom 10 mM NaF u PBS-u. Aktivnost alkalne fosfataze u ćelijama analizirana je svetlosnim invertnim mikroskopom (Olympus, Japan).

3.7.2. Adipogena diferencijacija

Ćelije su kultivisane u pločama sa šest otvora i inkubirane u standardnom medijumu pri standardnim uslovima kultivacije do postizanja supkonfluentnosti. U cilju adipogene diferencijacije dodavan je medijum za adipogenu diferencijaciju. Ćelije su kultivisane 21 dan uz zamenu medijuma na 2-3 dana. Prisustvo unutarćelijskih lipidnih kapi, kao dokaz adipogene diferencijacije, potvrđivano je analizom na svetlosnom invertnom mikroskopu nakon bojenja ćelija Oil Red O bojom.

3.7.3. Hondrogena diferencijacija

Ćelije su kultivisane u pločama sa šest otvora i inkubirane u standardnom medijumu pri standardnim uslovima kultivacije do postizanja supkonfluentnosti. Kako bi se indukovala hondrogena diferencijacija ćelije su potom inkubirane 21 dan u medijumu za hondrogenu diferencijaciju. Svež medijum je menjan svaka 2-3 dana. Nakon inkubacije, hondrogena diferencijacija ćelija potvrđivana je na svetlosnom invertnom mikroskopu na osnovu stepena obojenosti glikozaminoglikana Safranin O bojom.

3.7.4. Diferencijacija u miofibroblaste (vaskularne glatkomišićne ćelije)

Mišje BM-MSC su zasejavane na okrugle staklene ljustice (5×10^4 ćelija po ljustici) i inkubirane u standardnom medijumu pri standardnim uslovima kultivacije preko noći. Potom je u kulture dodavano 3 ng/ml TGF- β 1 i ćelije su inkubirane još četiri dana. Da bi se potvrdila diferencijacija ćelija u miofibroblaste, ćelije su obeležavane antitelom za α -SMA, prema protokolu opisanom u nastavku.

3.8. ODREĐIVANJE EKSPRESIJE PROTEINA

3.8.1. Imunofluorescentna mikroskopija

Za imunofluorescentno obeležavanje, 1×10^4 mBM-MSC je posađeno po jednoj okrugloj staklenoj ljušpici. Čelije su kultivisane u standardnom medijumu pri standardnim uslovima kultivacije preko noći kako bi adherirale, nakon čega su isprane PBS-om i fiksirane 3,5% rastvorom formaldehida u PBS-u. Za detekciju unutarćelijskih proteina, vimentina, α -SMA i fibronektina, ćelije su permeabilizovane 0,1% rastvorom TritonX u PBS-u, u trajanju od 5 minuta. Nespecifično vezivanje proteina je blokirano inkubacijom ćelija u 3% rastvoru BSA u PBS-u u trajanju od 30 minuta. Čelije su zatim inkubirane sat vremena sa antitelima za vimentin, α -SMA, fibronektin, endoglin, Stro-1 i koktelom antitela za linijske hematopoetske markere (CD5/Ly-1, CD11b/Mac-1, CD45R/B220, Gr-1/Ly-6G, 7/4, TER-119; Stem Sep[®] Mouse Hematopoietic Progenitor Cell Enrichment Kit) i još sat vremena sa odgovarajućim sekundarnim antitelom konjugovanim fluorescein-izotiocijanatom i DAPI bojom u koncentraciji 1 μ g/ml. Čelije su na kraju isprane PBS-om i vodom i montirane pomoću DPX medijuma na mikroskopske pločice, a zatim analizirane pomoću fluorescentnog mikroskopa, Axioskop 2 plus epi-fluorescence (Carl Zeiss, Nemačka).

3.8.2. Western Blot

Za izolaciju ćelijskih proteina, mBM-MSC su kultivisane u standardnom medijumu pri standardnim uslovima kultivacije do postizanja oko supkonfluentnosti. Čelije su zatim kultivisane 24 h u medijumu bez seruma i dodatih faktora, a zatim im je medijum zamenjen standardnim medijumom sa 50 ng/ml IL-17 i/ili 1 ng/ml bFGF, odnosno kontrolnim medijumom bez faktora. Nakon 15, 30 i 60 minuta inkubacije u standardnim uslovima kultivacije, ukupni ćelijski proteini su izolovani primenom pufera

za liziranje ćelija koji se sastojao od 150 mM NaCl, 1% NP-40 i 50 mM Tris pufera, pH 7,5, u PBS-u. Neposredno pre početka liziranja ćelija, puferu za liziranje dodavani su inhibitori proteaza: 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM EACA i 10 µl/ml koktela inhibitora (Fermentas, SAD). Ćelije su lizirane u 200 µl pufera za liziranje po otvoru ploče sa šest otvora, inkubacijom na ledu uz konstantno mešanje u trajanju od 30 minuta. Nakon toga, ćelijski lizat je sakupljen i centrifugiran 15 minuta na 10000 × g, na temperaturi od 4 °C. Jedra i nerastvorljivi materijal su uklonjeni, a rastvorljivi lizati su sakupljeni i čuvani na -20 °C do upotrebe. Koncentracija proteina u svakom uzorku određivana je upotrebom komercijalnog BCA testa (Pierce, SAD).

Uzorcima proteina iz ćelijskih lizata dodavan je redukcionni pufer sledećeg sastava: 125 mM Tris, pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 200 mM DTT i 0,02% bromfenol plavo. Uzorci sa ovim puferom su kuvani u ključaloj vodi 5 minuta. Ovako pripremljeni uzorci proteina nanošeni su na 4% akrilamidni gel za nanošenje i 10% gel za razdvajanje debljine 1,5 mm, i razdvajani su tehnikom Na-dodecilsulfat-poliakrilamid gel elektroforeze (SDS-PAGE) pri konstantnoj struji od 150 mA tokom 2 h. Nakon toga, razdvojeni proteini su elektrotransferom prenošeni na Hybond ECL nitroceluloznu membranu (GE Healthcare, USA) pri konstantnoj struji od 110 mA tokom 1 h i 30 min.

Nespecifično vezivanje proteina za membranu blokirano je inkubacijom sa 3% BSA u 0,05% rastvoru Tween-20 u TBS-u (TBS/Tween) tokom 1 h. Zatim je membrana inkubirana preko noći sa primarnim antitelom (**Tabela 1**) razblaženim u TBS-u sa 1% BSA na 4 °C. Membrane su potom ispirane TBS/Tween-om, a zatim inkubirane 1 h na sobnoj temperaturi sa odgovarajućim sekundarnim antitelom konjugovanim peroksidazom. Membrane su ponovo ispirane TBS/Tween-om tri puta po 10 minuta. Na kraju su membrane ispirane TBS-om u trajanju od 5 minuta.

Proteini obeleženi antitelima su vizuelizovani na autoradiografskom filmu (Amersham Pharmacia Biotech, Švedska) nakon inkubacije membrane sa sistemom reagenasa za pojačanu hemiluminiscencu (Enhanced chemiluminescence reagent system, AppliChem). Intenzitet proteinskih traka kvantifikovan je denzitometrijski, primenom ImageMaster TotalLab Ver1.11 programa (GE Healthcare, SAD).

3.9. ODREĐIVANJE GENSKE EKSPRESIJE

3.9.1. Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimeraze

Specifična ekspresija gena u mBM-MSC analizirana je tehnikom reverzne transkripcije i lančane reakcije polimeraze (RT-PCR) u uzorku izolovane intaktne RNK, na osnovu koje je potom dobijena komplementarna DNK.

Nakon kultivacije sa ili bez odgovarajućih faktora i dostizanja supkonfluentnosti u pločama sa 6 otvora, ćelije su lizirane dodavanjem 1 ml TRIzol reagensa (Invitrogen) po otvoru, uz ponavljano propuštanje kroz pipetu. Homogenizovani uzorci prebacivani su u epruvete od 1,5 ml i inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se omogućila potpuna disocijacija nukleoproteinskog kompleksa. Potom je svakom uzorku dodavano 0,2 ml hloroforma. Epruvete su snažno mućkane 15 sekundi a potom inkubirane 2-3 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su potom centrifugirani 15 minuta na $12000 \times g$, na temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Homogenat se nakon centrifugiranja razdvajao u tri faze: donju, crvenu, fenol-hloroform fazu koja sadrži proteine, beli interfazni prsten u kojem se nalazi DNK i gornju, vodenu fazu koja sadrži RNK. Vodena faza je pažljivo sakupljena u nove epruvete. Svakom uzorku RNK je dodavano po 0,5 ml 100% izopropanola, a potom su uzorci inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirani 20 minuta na $12000 \times g$, na temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon centrifugiranja, supernatant je odlivan, a RNK talog je ispiran u 1 ml 75% etanola. Uzorak je kratko promešan i centrifugiran 5 minuta na $7500 \times g$, na temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon odlivanja supernatanta, RNK talog je sušen na vazduhu i rastvaran u vodi prečišćenoj od nukleaza. Nakon određivanja koncentracije RNK pomoću spektrofotometra, uzorci su čuvani na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do upotrebe.

Ukupna RNK korišćena je za dobijanje komplementarne DNK, na osnovu oligo dT prajmera koji omogućava reverznu transkripciju samo iRNK. Reverzna transkripcija vršena je prema uputstvu proizvođača kompleta za reverznu transkripciju (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA). Ukratko: 2 μg RNK, 1 μl oligo dT

prajmera i vode prečišćene od nukleaza do ukupne zapremine od 12,5 µl inkubirani su na 65 °C u trajanju od 5 minuta, a potom im je dodavana osnovna mešavina koja se sastojala od RevertAid reverzne transkriptaze, smese deoksinukleotida i inhibitora ribonukleaze u puferu za reverznu transkripciju. Ovakva smesa, zapremine 20 µl, inkubirana je 60 minuta na 42 °C, a zatim 10 min na 70 °C u termobloku aparata Mastercycler personal (Eppendorf, Nemačka).

PCR produkti su dobijeni amplifikacijom 1 µl uzorka komplementarne DNK upotrebom odgovarajućih prajmera i osnovne mešavine koja se sastojala od pufera za PCR sa 2 mM MgCl₂, smese deoksinukleotida (4 × 0,2 mM) i 25 U/ml Taq DNK polimeraze (PCR Master Mix) uz dodatak vode prečišćene od nukleaza do ukupne zapremine od 25 µl. Amplifikacija komplementarne DNK se odvijala po sledećem osnovnom PCR programu: 5 minuta inicijacija na temperaturi od 94 °C; zatim 30 ciklusa denaturacije (45 s) na temperaturi od 94 °C, vezivanja (30 s) na temperaturi od 52 °C (ili 50 °C ili 47 °C, u zavisnosti od prajmera – **Tabela 2**) i elongacije (90s) na temperaturi od 72 °C; i na kraju 10 minuta završna elongacija na temperaturi od 72 °C

Sekvence prajmera i temperatura za vezivanje specifičnih za svaki prajmer prikazane su u **Tabeli 2**. Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) je amplifikovana kao kontrola količine komplementarne DNK u svakom uzorku.

PCR produkti razdvajani su elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu sa 0,4 µg/ml etidijum-bromida (Invitrogen) u TAE puferu i vizuelizovani osvetljavanjem gela UV svetlošću. Intenzitet dobijenih traka kvantifikovan je denzitometrijski, primenom ImageMaster TotalLab Ver1.11 programa.

Tabela 2. Prajmeri primenjeni u eksperimentima

Gen	Sekvenca	Veličina PCR produkta	Temp. vezivanja prajmera
Fibronektin	<i>Fw: 5'-CCCAGACTTATGGTGGCAATT-3'</i> <i>Rev: 5'-AATTTCCGCCTCGAGTCTGA-3'</i>	201 bp	52 °C
Vimentin	<i>Fw: 5'- GAACGGAAAGTGGAATCCTTGC-3'</i> <i>Rev: 5'-GGTTGGCAGAGGCAGAGAAATC-3'</i>	591 bp	52 °C
Snail1	<i>Fw: 5'-GCAGCTGGCCAGGCTCTCGGTGG-3'</i> <i>Rev: 5'-GTAGCAGGGTCAGCGAGGGCCTCC-3'</i>	394 bp	52 °C
GAPDH	<i>Fw: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'</i> <i>Rev: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'</i>	452 bp	52 °C
α -SMA	<i>Fw: 5'-CTGGAGAAGAGCTACGAACTG-3'</i> <i>Rev: 5'-CTGATCCACATCTGCTGGAAG-3'</i>	368 bp	52 °C
Cbfa1	<i>Fw: 5'-CCGCACGACAACCGCACCAT-3'</i> <i>Rev: 5'-CGCTCCGGCCACAAATCTC-3'</i>	289 bp	52 °C
PPAR γ 1	<i>Fw: 5'-TTCTGACAGGACTGTGTGACAG-3'</i> <i>Rev: 5'-ATAAGGTGGAGATGCAGGTTTC-3'</i>	355 bp	47 °C
Osteokalcin	<i>Fw: 5'-TCTGCTCACTCTGCTGAC-3'</i> <i>Rev: 5'-GGAGCTGCTGTGACATCC-3'</i>	388 bp	52 °C
iNOS	<i>Fw: 5'-TGGGAATGGAGACTGTCCCAG-3'</i> <i>Rev: 5'-GGGATCTGAATGTGATGTTTG-3'</i>	306 bp	52 °C
eNOS	<i>Fw: 5'-TGGATGAGTATGATGTGGTG-3'</i> <i>Rev: 5'-GGATTTTGTAGCTCTTGTGC-3'</i>	177 bp	50 °C

3.10. ISPITIVANJE HEMATOPOEZE

3.10.1. Analiza morfološki prepoznatljivih ćelija hematopoeze

Radi analize morfološki prepoznatljivih prethodnika i zrelih ćelija eritroidne, mijeloidne i limfoidne loze, pripremani su citospin preparati suspenzije ćelija iz LTBMK kokultura. Ćelije su fiksirane za predmetna stakla centrifugiranjem 5 minuta na $200 \times g$ u posebnim nosačima za citospin preparate (Hereaus, Nemačka). Nakon sušenja, preparati su bojani May-Grunwald-Giemsa postupkom i analizirani na svetlosnom mikroskopu pod imerzijom. Određivan je broj morfološki prepoznatljivih prethodnika i zrelih ćelija mijeloidne loze koji su podeljeni na tri grupe – proliferativni granulociti (mijeloblasti, promijelociti, mijelociti), metamijelociti i zreli granulociti; ukupne ćelije eritroidne loze (proeritroblasti, bazofilni eritroblasti, polihromatofilni eritroblasti, ortohromatofilni eritroblasti); i ukupne ćelije limfoidne loze (limfoblasti, prolimfociti, limfociti).

3.10.2. Analiza broja hematopoetskih progenitora

Analiza ćelija koje formiraju kolonije (eng. *colony forming cells*, CFC) je korišćena za određivanje broja opredeljenih hematopoetskih progenitora u sistemu LTBMK kokultura, kao i za određivanje njihovog broja kao kontaminanata u primarnoj kulturi mBM-MSK.

Neadherentne ćelije iz LTBMK kokultura, kao i mBM-MSK iz primarne kulture, od prve do treće pasaže, resuspendovane su u polučvrstoj podlozi na bazi metilceluloze obogaćenoj rekombinantnim mišjim SCF u koncentraciji od 50 ng/ml, rekombinantnim mišjim IL-3 u koncentraciji od 10 ng/ml, rekombinantnim humanim IL-6 u koncentraciji 10 ng/ml i rekombinantnim humanim eritropoetinom u koncentraciji od 3 U/ml (MethoCult GF M3434). Ćelije su zasađene u duplikatima u koncentraciji od

1×10^5 ćelija/ml u petri šoljama prečnika 35 mm i inkubirane na 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% relativne vlažnosti. Kolonije, definisane kao grupacije od najmanje 50 ćelija, brojane su i analizirane nakon 7 dana inkubacije. Broj opredeljenih progenitora je procenjen na osnovu ukupnog broja svih progenitora koji daju kolonije u datom sistemu, uključujući CFU-GEMM (od eng. *colony-forming unit – granulocytic, erythrocytic, monocytic, megakariocytic*), CFU-GM (od eng. *colony-forming unit – granulocytic, monocytic*), CFU-M (od eng. *colony-forming unit – monocytic*), CFU-G (od eng. *colony-forming unit – granulocytic*) i BFU-E (od eng. *burst-forming unit – erythrocytic*).

3.10.3. Dugotrajna kultura kostne srži

Za određivanje kapaciteta mBM-MSC da podržavaju hematopoezu korišćena je kokultura mBM-MSC i neadherentnih mononuklearnih ćelija kostne srži u sistemu dugotrajne kulture kostne srži (LTBMC). Nakon petodnevne kultivacije u medijumu za ekspanziju sa ili bez dodatka 50 ng/ml IL-17 u pločama sa 6 otvora i postizanja 80% konfluentnosti, mBM-MSC su zaustavljane u proliferaciji inkubacijom sa 25 µg/ml mitomicina C u trajanju od 30 minuta. Nakon ispiranja ploča, ćelijama je dodata suspenzija neadherentnih ćelija izolovanih iz kostne srži miševa u medijumu za LTBMC u koncentraciji od 1×10^6 ćelija/ml. Na svakih 7 dana, sakupljana je polovina medijuma sa neadherentnim ćelijama (demidepopulacija) i zamenjivana svežim medijumom, pri čemu je određivan ukupan broj neadherentnih ćelija, a supernatanti kultura su čuvani na - 20 °C radi kasnijeg određivanja koncentracije NO. Istovremeno u kulturama je praćena pojava grupacija kuboidnih ćelija nalik kaldrmi (eng. *cobblestone area*) koje predstavljaju kolonije najprimitivnijih hematopoetskih prethodnika. Nakon 7 i 14 dana kokulture, određivan je i ukupan broj CFC i broj morfološki prepoznatljivih prekursora.

3.11. ISPITIVANJE IMUNOMODULATORNIH SVOJSTAVA MSC

3.11.1. Određivanje proliferacije limfocita merenjem ugradnje BrdU

Za analizu uticaja mBM-MSC na proliferaciju limfocita, mBM-MSC koje su prethodno pet dana kultivisane u medijumu za ekspanziju sa ili bez dodatka 50 ng/ml IL-17, posađene su u količini od 1×10^3 i 1×10^4 po otvoru ploče sa 96 mesta i inkubirane preko noći u standardnim uslovima kako bi adherirale. Nakon toga, proliferacija im je zaustavljena dodavanjem mitomicina C u koncentraciji od 25 $\mu\text{g/ml}$ u trajanju od 30 minuta, posle čega je ploča isprana. Na mBM-MSC su dodate slezinske ćelije, odn. humane PBMC, u količini od 1×10^5 po otvoru, kako bi odnos mBM-MSC prema responderima bio 1:100 odnosno 1:10. Za dvosmernu mešanu leukocitnu reakciju (MLR) su pomešane PBMC od dva različita donora. U odgovarajuće kokulture za mitogenom stimulisanu proliferaciju je dodat PHA u koncentraciji od 5 $\mu\text{g/ml}$. Kokultura sa slezinskim ćelijama je inkubirana 3 dana, a sa humanim PBMC 5 dana, pri čemu je u poslednjih 24 h kultivacije dodat BrdU u 0,01 mM koncentraciji. U cilju ispitivanja uloge NO iIDO kao posrednika u imunomodulatornom efektu mBM-MSC, u određene kokulture sa slezinskim ćelijama su u toku trodnevne inkubacije dodati specifični inhibitori NO sintaza iIDO – L-NAME, odn. 1-metil triptofan, u 1 μM koncentraciji.

Po završenoj inkubaciji ploče su centrifugirane 5 minuta na $400 \times g$, dobro osušene i ćelije su fiksirane apsolutnim etanolom u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon odlivanja etanola i sušenja na vazduhu, ćelije su inkubirane 30 minuta na sobnoj temperaturi sa 2 M HCl, a zatim 5 minuta sa 0,1 M Na-boratom. Ploče su zatim isprane 2 puta PBS-om i inkubirane sa 1% želatinom u 0,05% rastvoru Tween-20 u PBS-u (PBS/Tween), 1 h na sobnoj temperaturi uz mešanje, u cilju blokiranja nespecifičnog vezivanja. Ploče su zatim isprane 3 puta PBS/Tween-om nakon čega je dodato anti-BrdU antitelo (u finalnom razblaženju 1:4000) i ploče su inkubirane 2 h na sobnoj temperaturi uz mešanje ili preko noći na 4 °C. Nakon što su

ploče tri puta ispirane PBS/Tween-om, dodato je sekundarno antitelo konjugovano peroksidazom (u finalnom razblaženju 1:20000) i ploče su inkubirane 1 sat na sobnoj temperaturi, uz mešanje, nakon čega su ponovo ispirane PBS/Tween-om tri puta. Na kraju, ploče su inkubirane do 30 minuta na sobnoj temperaturi u prisustvu TMB, supstrata peroksidaze, i nakon zaustavljanja reakcije dodatkom 2 M sumporne kiseline, merena je apsorpcija svetlosti talasne dužine 450 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče.

3.12. ODREĐIVANJE PRODUKCIJE NO

Kao odraz produkcije NO određivana je koncentracija nitrita u supernatantima kultura po Grisovoj (*Griess*) metodi. Grisov reagens je pripreman mešanjem istih zapremina 0,1% rastvora naftil-etilendiamin-dihidrohlorida u destilovanoj vodi i 1% rastvora sulfanilamida u 5% H₃PO₄. Supernatanti iz kokultura mBM-MSK i hematopoetskih ćelija, odn. mBM-MSK i slezinskih ćelija, sakupljani su nakon odgovarajućeg perioda inkubacije i čuvani na - 20 °C do analize. Po 50 µl svakog uzorka supernatanta mešano je sa jednakom zapreminom Grisovog reagensa u pločama sa 96 otvora ravnog dna. Posle inkubacije od 10 minuta na sobnoj temperaturi određivana je apsorpcija svetlosti talasne dužine 540 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče. Koncentracija nitrita je određivana pomoću standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti apsorpcija očitanih za seriju standardnih rastvora poznate koncentracije NaNO₂ (Merck, Nemačka).

3.13. STATISTIČKA ANALIZA

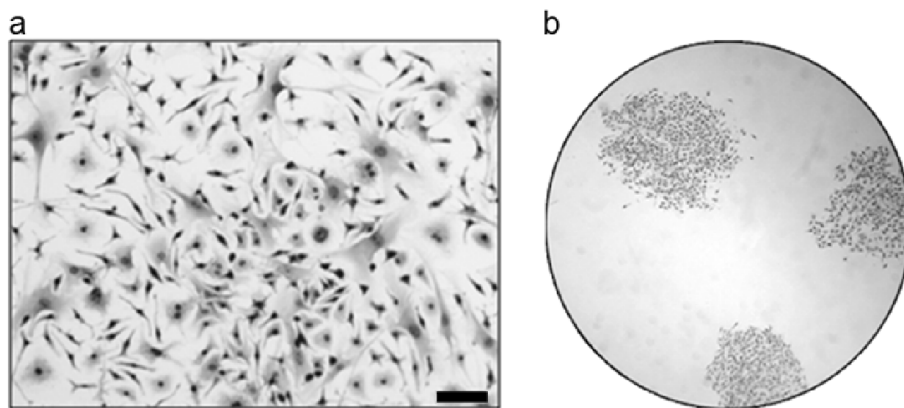
Rezultati su prikazani tabelarno ili grafički sa vrednostima aritmetičke sredine \pm standardna greška aritmetičke sredine (eng. *standard error of mean*, SEM) iz navedenog broja ponavljanih merenja. Za određivanje verovatnoće značajnosti razlike između uzoraka korišćen je Studentov t-test, u slučaju normalne raspodele, odnosno Mann Whitney test u slučaju raspodele podataka koja je različita od normalne. Normalnost raspodele je testirana Kolmogorov-Smirnovljevim testom. Statistička obrada je rađena u programima Microsoft Excel i Origin Pro 8. Verovatnoća ispravnosti nulte hipoteze od $p < 0,05$ smatrana je statistički značajnom, a verovatnoća $p < 0,01$ visoko statistički značajnom.

4.

REZULTATI

4.1. IZOLOVANJE I KULTIVACIJA mBM-MSC

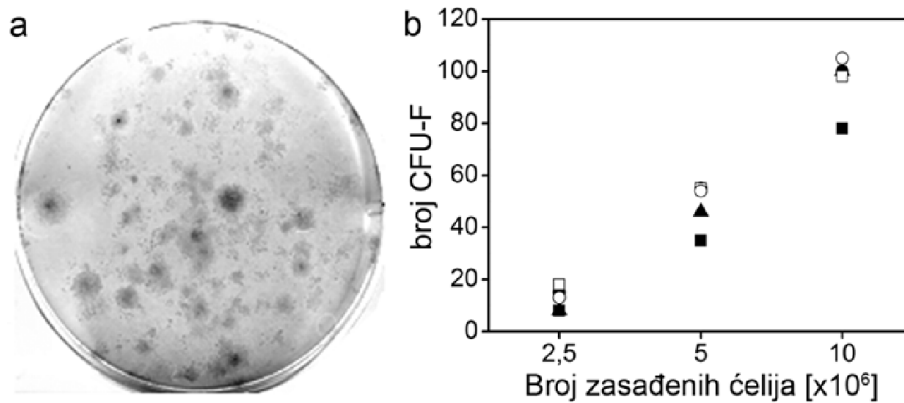
Ukupne ćelije kostne srži su zasađene u flaskove za tkivne kulture i nakon 2-3 dana, prilikom zamene medijuma, neadherentne ćelije su odstranjene zajedno sa medijumom. U prvim danima nakon zasađivanja, ćelije su pod fazno kontrastnim mikroskopom morfološki izgledale heterogeno, sa predominantno okruglim, svetlim, neadherentnim ćelijama i tamnijim, razvučenim, vretenastim i poligonalnim, adherentnim ćelijama. Nakon 7 do 10 dana kultivacije i redovnog ispiranja neadherentnih ćelija na svaka 2-3 dana, većinu populacije su činile adherentne ćelije koje su formirale pojedinačne simetrične kolonije (**Slika 4.1**). Daljom kultivacijom, ćelije su se ubrzano umnožavale i kolonije su se spajale, dostižući 80-90% pokrivenosti površine flaska (supkonfluentnost) oko 14. dana nakon zasađivanja. U narednim pasažama, duge vretenaste ćelije su rasle u vidu uniformnog jednosloja bez formiranja pojedinačnih kolonija i dostizale supkonfluentnu pokrivenost za 10 do 15 dana.



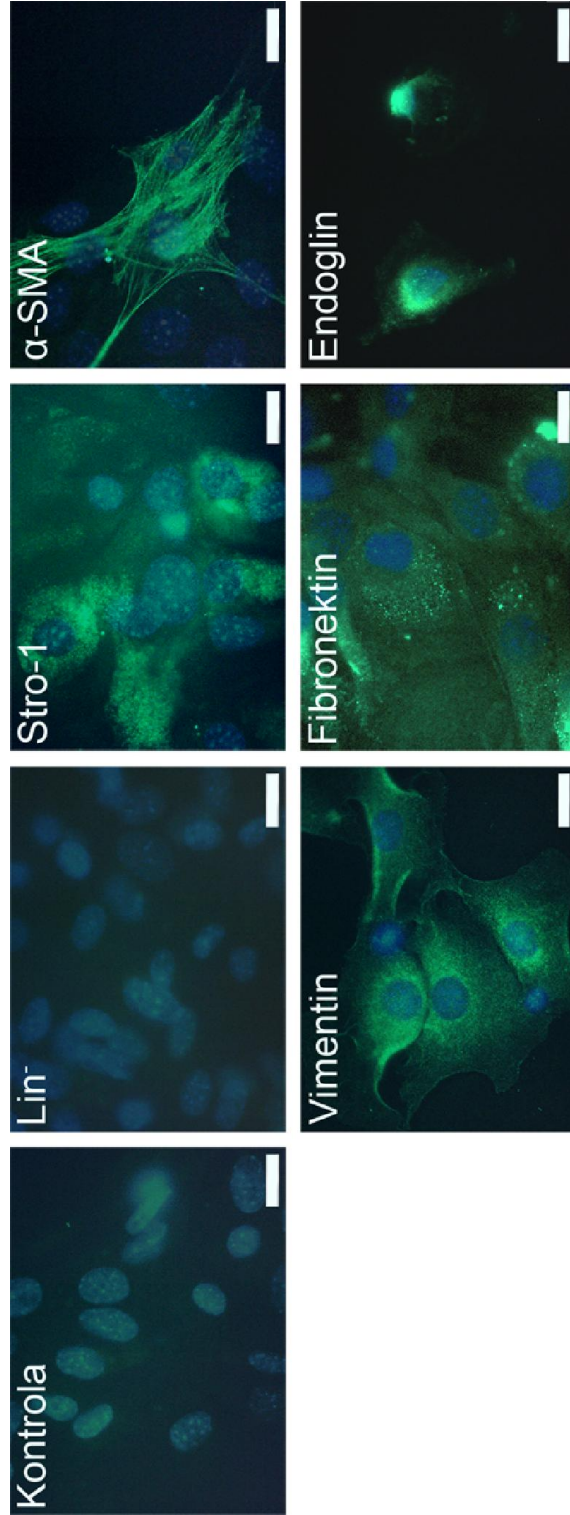
Slika 4.1. Morfološke karakteristike mBM-MSC. **a** Adherentne ćelije vretenaste i poligonalne morfologije. **b** Izdvojene kolonije poreklom od pojedinačnih mBM-MSC (CFU-F). Razmernik: 50 μ m.

4.2. UČESTALOST mBM-MSC

Radi određivanja učestalosti pojavljivanja i klonogenog potencijala mBM-MSC u populaciji ukupnih ćelija kostne srži, korišćen je standardni test formiranja kolonija ćelija sličnih fibroblastima (CFU-F) (**Slika 4.2 a**). Broj CFU-F kolonija je bio linearno zavisian od broja zasejanih ćelija, što je prikazano na **Slici 4.2 b**. Testom je utvrđeno da se procenat CFU-F u populaciji ukupnih ćelija kostne srži kretao od 0,00032% do 0,0011%, odnosno učestalost pojavljivanja ćelija sa kapacitetom formiranja kolonija ćelija sličnih fibroblastima (CFU-F) je bila u proseku $8,1 \pm 2,7$ na 1×10^6 zasađenih ukupnih ćelija kostne srži.



Slika 4.2. Test formiranja kolonija sličnih fibroblastima (CFU-F). **a** Izgled kolonija u CFU-F testu. **b** Odnos između broja zasađenih ćelija kostne srži i dobijenog broja CFU-F kolonija. Predstavljene su rezultati pet ponovljenih merenja.

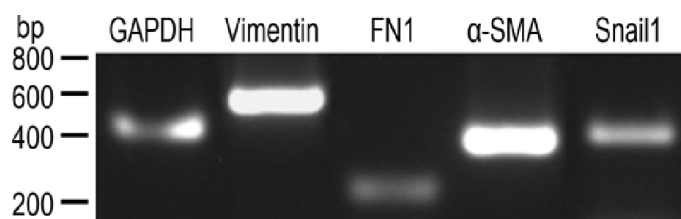


Slika 4. 3. Ispoljavanje mezenhimskih markera na mBM-MSC. Čelije su obeležene antitelom za naznačene markere i odgovarajućim sekundarnim antitelom konjugovanim FITC fluorohromom (zeleno). Negativna kontrola je, umesto sa primarnim antitelima, inkubirana samo u puferu. Koktel hematopoetskih linijskih markera (Lin) je sadržao sledeća anti-mišja antitela: CD5/Ly-1, CD11b/Mac-1, CD45R/B220, Gr-1/Ly-6G, 7/4 i TER-119. Čelijska jedra su obeležena DAPI fluorescentnom bojom (plavo). Uzorci su analizirani i fotografisani na epifluorescentnom mikroskopu. Razmernik: 25 μ m.

4.3. KARAKTERIZACIJA mBM-MSC

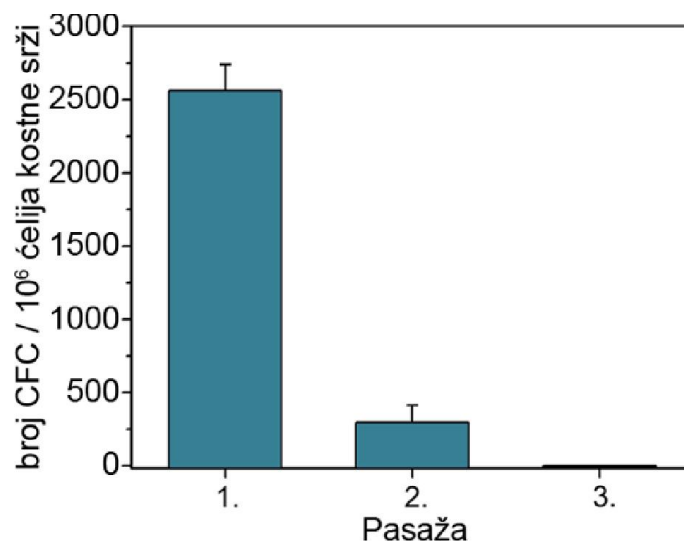
4.3.1. Imunofenotipske karakteristike mBM-MSC

Mišje BM-MSC su ispoljavale markere koji su karakteristični za mezenhimske matične ćelije: endoglin, vimentin, α -SMA, fibronektin i Stro-1 (**Slika 4.3**). Pored toga, ćelije su bile negativne za set linijskih markera mišjih hematopoetskih ćelija i to: limfoidnih (CD5, CD45R/B220), mijeloidnih (CD11b, Gr-1), eritroidnih (TER-119) ćelija i neutrofila (7/4). Radi dodatne potvrde mezenhimske prirode ovih ćelija, analizirana je ekspresija iRNK za vimentin, α -SMA, fibronektin i Snail1 metodom RT-PCR. Sva četiri gena karakteristična za mezenhimske matične ćelije su bila ispoljena u mBM-MSC (**Slika 4.4**).



Slika 4.4. Ispoljavanje gena karakterističnih za mezenhimske ćelije u mBM-MSC. Ispoljavanje gena karakterističnih za MSC – vimentin, α -SMA, fibronektin (FN1) i Snail1, određeno je primenom metode RT-PCR. GAPDH je korišćena kao kontrola količine komplementarne DNK u uzorku.

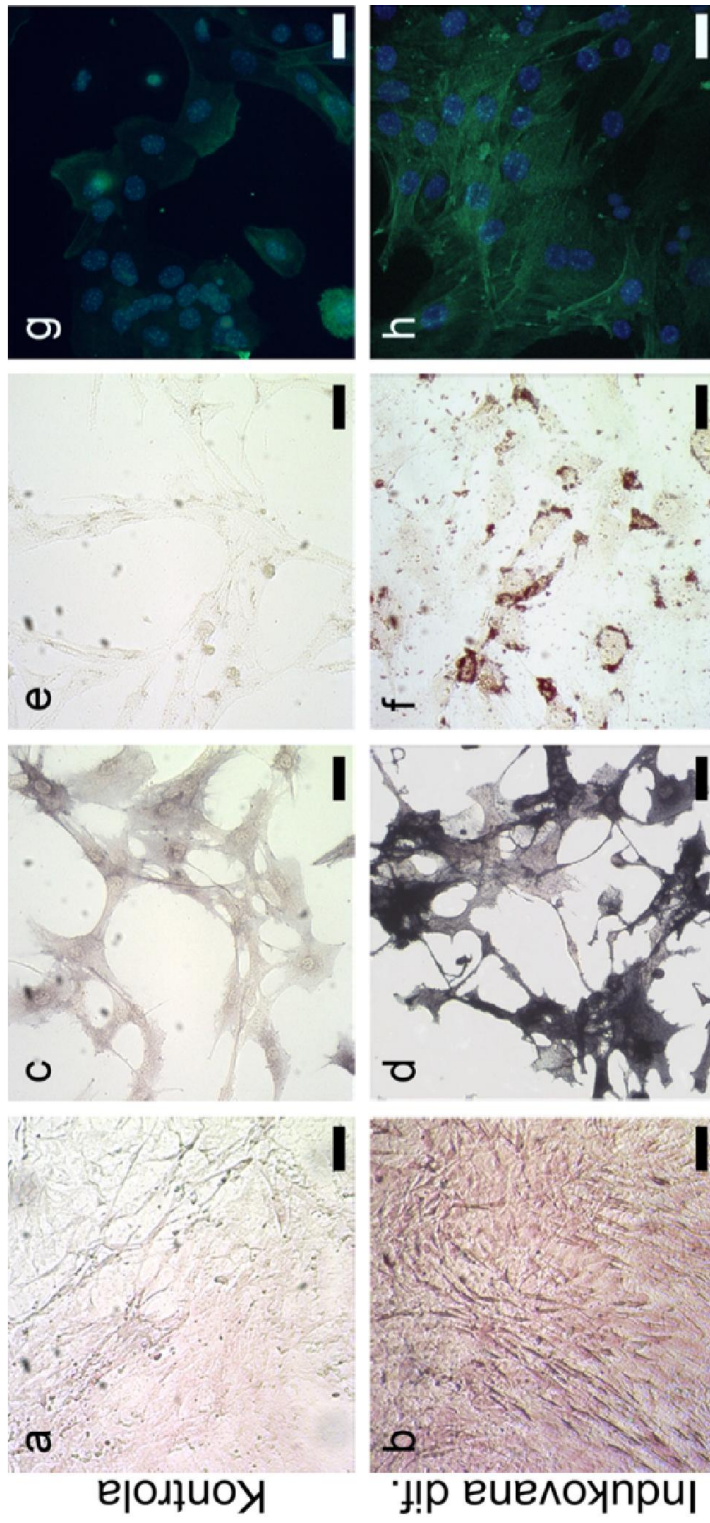
Kako bi se potvrdilo odsustvo hematopoetskih prethodnika koji mogu opstati u kulturi i nakon nekoliko pasaža, testirano je njihovo prisustvo u tri uzastopne pasaže pomoću testa formiranja kolonija hematopoetskih ćelija (CFC test) u kojem je broj opredeljenih prethodnika procenjen na osnovu ukupnog broja klonogenih progenitora, odn. ćelija koje formiraju kolonije (BFU-E, CFU-G, CFU-M, CFU-GM, CFU-GEMM). Dobijeni rezultati su pokazali da već nakon druge pasaže hematopoetski prethodnici nisu opstali u kulturama mBM-MSC (**Slika 4.5**).



Slika 4.5. Prisustvo hematopoetskih progenitora u kulturama mBM-MSC. Ćelije iz kultura mBM-MSC od 1. do 3. pasaže su postavljene u medijum na bazi metilceluloze sa odgovarajućim faktorima rasta (MethoCult GF M3434) u koncentraciji od 1×10^5 /ml. Nakon 7 dana inkubacije, određen je ukupan broj CFC (CFU-GEMM + CFU-GM + CFU-G + CFU-M + BFU-E). Rezultati predstavljaju aritmetičke sredine \pm SEM tri eksperimenta, od kojih je svaki izveden u duplikatu.

4.3.2. Diferencijacija mBM-MSC

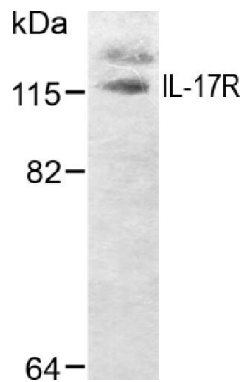
Prateći dalje kriterijume za definisanje multipotentnih mezenhimskih matičnih ćelija koje je ustanovio Komitet za mezenhimske matične ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju (*Dominici i sar., 2006*), kao funkcionalni test potvrde identiteta MSC, analiziran je i potencijal mBM-MSC za diferencijaciju u više linija. Kultivacijom mBM-MSC u specifičnim medijumima za hondrogeneru, osteogenu i adipogenu diferencijaciju, i kasnijim bojenjem odgovarajućim bojama za detekciju glikozaminoglikana, aktivnosti alkalne fosfataze, odn. deponovanih lipidnih kapi ustanovljeno je da ove ćelije poseduju sposobnost diferencijacije u ćelije hrskavice, kosti i masnog tkiva (**Slika 4.6 a-f**). Pored toga, pokazano je da mBM-MSC poseduju i sposobnost transdiferencijacije u miofibroblaste, što je potvrđeno kultivacijom ovih ćelija u prisustvu TGF- β 1 i sledstvenom pojačanom ekspresijom α -SMA molekula, proteina karakterističnog za miofibroblaste (**Slika 4.6 g i h**).



Slika 4.6. Potencijal za diferencijaciju mBM-MSC. Za testiranje potencijala za hondrogenu (a, b), osteogenu (c, d) i adipogenu (e, f) diferencijaciju, mBM-MSC su kultivisane u odgovarajućem diferencijacionom medijumu, 14 dana za osteogenu, odn. 21 dan za hondrogenu i adipogenu diferencijaciju, ili u kontrolnom medijumu. Stepen diferencijacije je određen bojenjem Safranin O na prisustvo glikozaminoglikana u hondrogenim, Oil Red O bojom na prisustvo lipidnih kapi u adipogenim, odn. na aktivnost alkalne fosfataze BCIP/NBT metodom u osteogenim kulturama. Za diferencijaciju u miofibroblaste (g, h), mBM-MSC su inkubirane 4 dana u prisustvu 3 ng/ml TGF- β 1 ili u kontrolnom medijumu, nakon čega je imunofluorescentnim bojenjem određen nivo ekspresije α -SMA. Razmernik: 100 μ m (a i b) i 50 μ m (c-h).

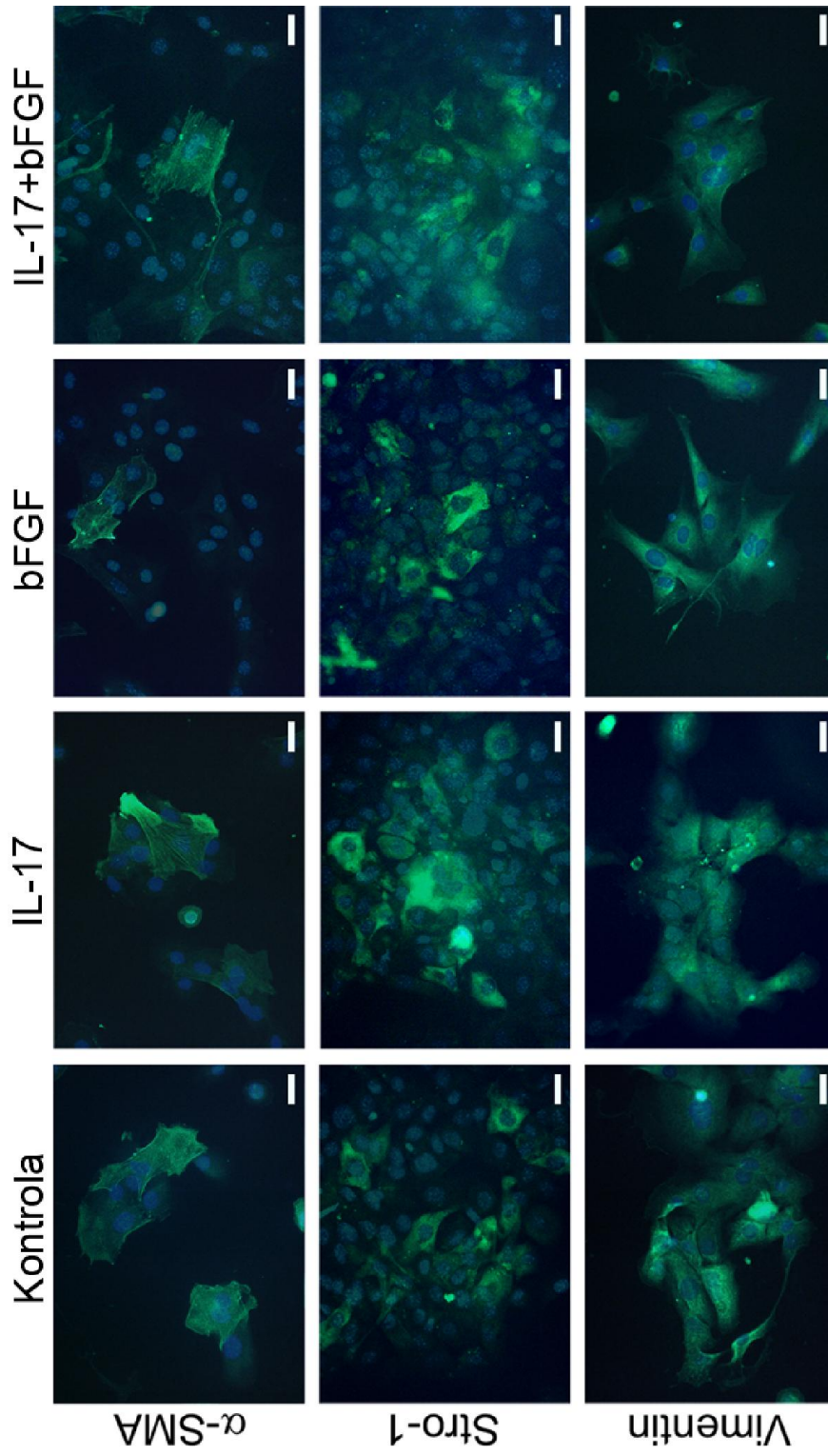
4.4. EFEKAT IL-17 NA KARAKTER mBM-MSC

Prvi korak u analizi uticaja IL-17 na mBM-MSC bio je utvrđivanje ekspresije IL-17R na ovim ćelijama. Koristeći tehniku Western blot, pokazano je da mBM-MSC ispoljavaju receptor za IL-17 (**Slika 4.7**).

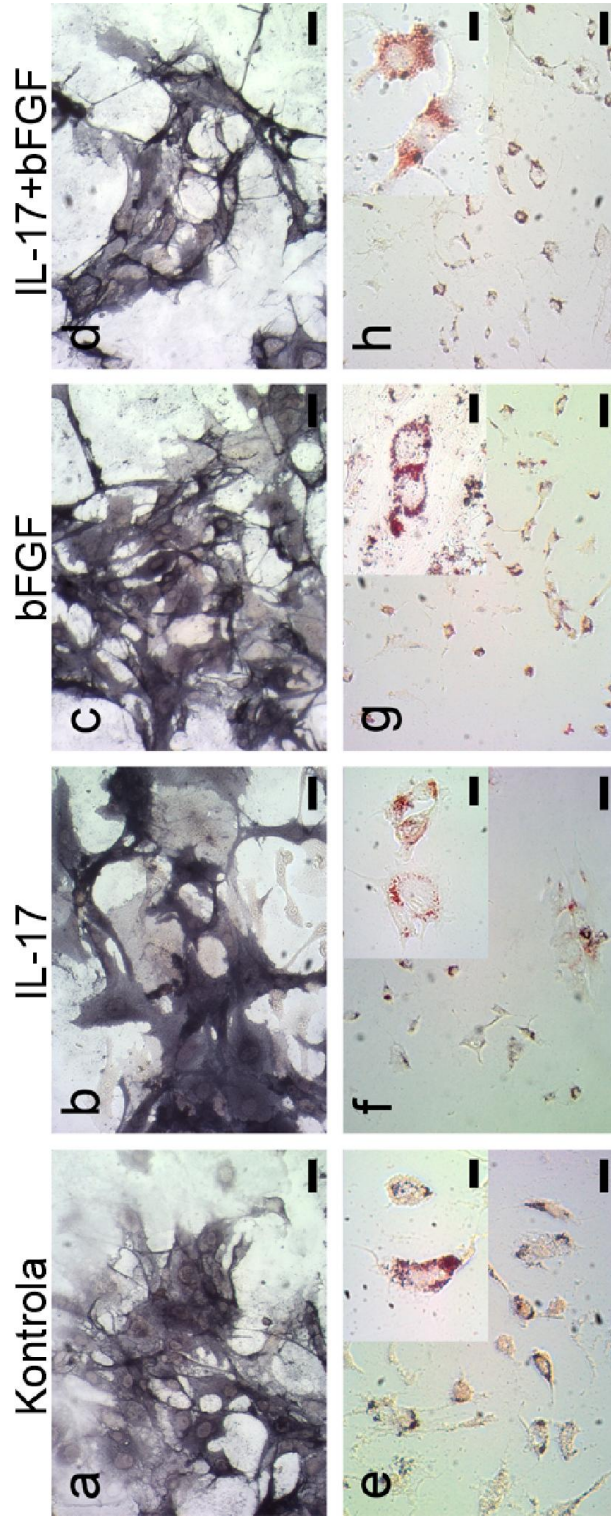


Slika 4.7. Ekspresija IL-17R na mBM-MSC. Reprezentativni imunoblot iz jednog od 3 uzorka prikazuje ispoljenost IL-17R na mBM-MSC iz 3. pasaže. Proteini iz ćelijskih lizata mBM-MSC su razdvojeni tehnikom SDS-PAGE nakon čega je izvršena imunoblot analiza korišćenjem specifičnog anti-IL-17R antitela.

Kako bi se utvrdilo da li IL-17 utiče na osnovne osobine matičnosti mBM-MSC, analizirani su efekti ovog citokina na imunofenotipske karakteristike mBM-MSC i njihov potencijal da diferenciraju u više različitih ćelijskih linija. Na isti način je ispitan i uticaj bFGF, samog ili u kombinaciji sa IL-17, imajući u vidu da se ovaj faktor nalazi u medijumu za ekspanziju mBM-MSC. Ćelije iz treće pasaže su kultivisane 5 dana u kontrolnom, standardnom medijumu (bez dodatih faktora) ili u medijumu sa dodatkom samo 50 ng/ml IL-17, samo 1 ng/ml bFGF ili sa oba ova faktora u kombinaciji. Nakon inkubacije sa ili bez faktora, mBM-MSC su imunofluorescentno obeležene na prisustvo karakterističnih mezenhimskih markera, Stro-1, vimentina i α -SMA. Ekspresija ovih markera je bila očuvana nakon kultivacije mBM-MSC sa IL-17 i/ili bFGF (**Slika 4.8**).

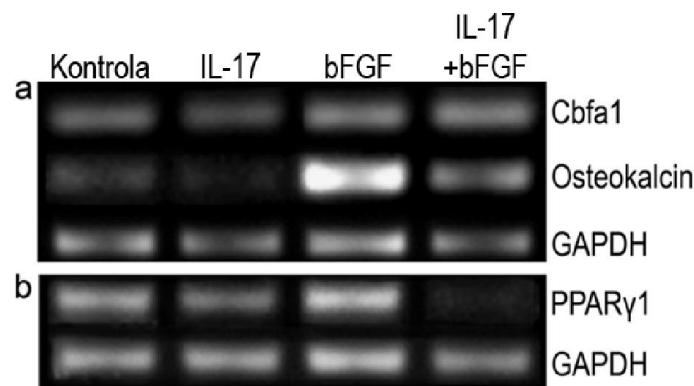


Slika 4.8. Ispoljavanje mezenhimskih markera na mBM-MSC nakon kultivacije sa IL-17 i/ili bFGF. Nakon petodnevnne kultivacije u prisustvu 50 ng/ml IL-17, 1 ng/ml bFGF ili kombinacije ova dva faktora, odn. u medijumu bez dodatih faktora (kontrola), ćelije su obeležene antitelom na vimentin, Stro-1 i α -SMA markere i odgovarajućim sekundarnim antitelom konjugovanim FITC fluorohromom (zeleno). Ćelijska jadra su obeležena DAPI fluorescentnom bojom (plavo). Uzorci su analizirani i fotografisani na epifluorescentnom mikroskopu. Razmernik: 50 μ m.



Slika 4.9. Kapacitet za višelinjsku diferencijaciju mBM-MSC nakon kultivacije sa IL-17 i/ili bFGF. Za osteogenu (a-d) i adipogenu (e-h) diferencijaciju, mBM-MSC su prethodno kultivisane 5 dana u prisustvu 50 ng/ml IL-17, 1 ng/ml bFGF ili kombinacije ova dva faktora, odn. u medijumu bez dodatnih faktora (kontrola), nakon čega su kultivisane u odgovarajućem medijumu za osteogenu ili adipogenu diferencijaciju 14, odn. 21 dan, a zatim obojeni na aktivnost ALP, odn. na prisustvo lipidnih kapi Oil Red O bojom. Razmernici: 50 μm i 10 μm (inserti).

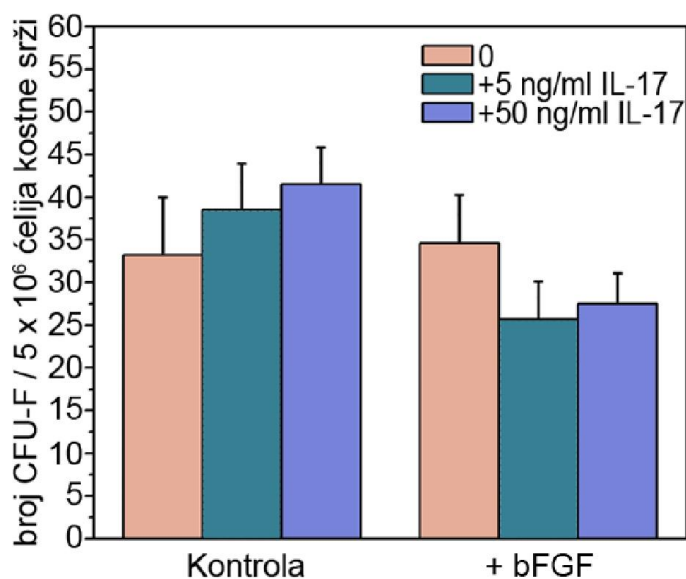
Radi ispitivanja uticaja IL-17 i/ili bFGF na diferencijaciju mBM-MSC, nakon petodnevnne inkubacije sa ili bez ovih faktora, ćelije su kultivisane 14 dana u osteogenom, odnosno 21 dan u adipogenom medijumu. Bojenjem na aktivnost alkalne fosfataze (Slika 4.9 a-d), odn. na prisustvo lipidnih kapljica (Slika 4.9 e-h) pokazano je da IL-17, sam i u kombinaciji sa bFGF, kao i sam bFGF, ne poništavaju sposobnost mBM-MSC za višelinijsku diferencijaciju. Očuvanje diferencionog potencijala je potvrđeno i analizom ekspresije gena uključenih u osteogenu (osteokalcin i Cbfa1), odn. adipogenu diferencijaciju (PPAR γ 1). Nivo ekspresije Cbfa1 je bio približno isti u svim eksperimentalnim uslovima, dok je osteokalcin bio jače ispoljen nakon pretretmana ćelija bFGF i kombinacijom IL-17 i bFGF (Slika 4.10 a). Ekspresija PPAR γ 1 iRNK je bila smanjena nakon kultivacije mBM-MSC u prisustvu kombinacije oba ispitivana faktora (Slika 4.10 b). Ipak, ovim analizama nije utvrđena značajna promena u sposobnosti diferencijacije mBM-MSC u osteogenu i adipogenu liniju pod uticajem IL-17 i bFGF.



Slika 4.10. Kapacitet za višelinijsku diferencijaciju mBM-MSC nakon kultivacije sa IL-17 i/ili bFGF. Pošto su prethodno kultivisane 5 dana u prisustvu 50 ng/ml IL-17, 1 ng/ml bFGF ili kombinacije ova dva faktora, odn. u medijumu bez dodatih faktora (kontrola), mBM-MSC su indukovane u pravcu osteogene (a) ili adipogene (b) diferencijacije kultivacijom u odgovarajućem medijumu za diferencijaciju 14, odn. 21 dan, nakon čega im je izolovana iRNK. Ispoljavanje gena povezanih sa osteogenom (Osteokalcin i Cbfa1) i adipogenom (PPAR γ 1) diferencijacijom određeno je primenom metode RT-PCR. GAPDH je korišćena kao kontrola količine komplementarne DNK u uzorku.

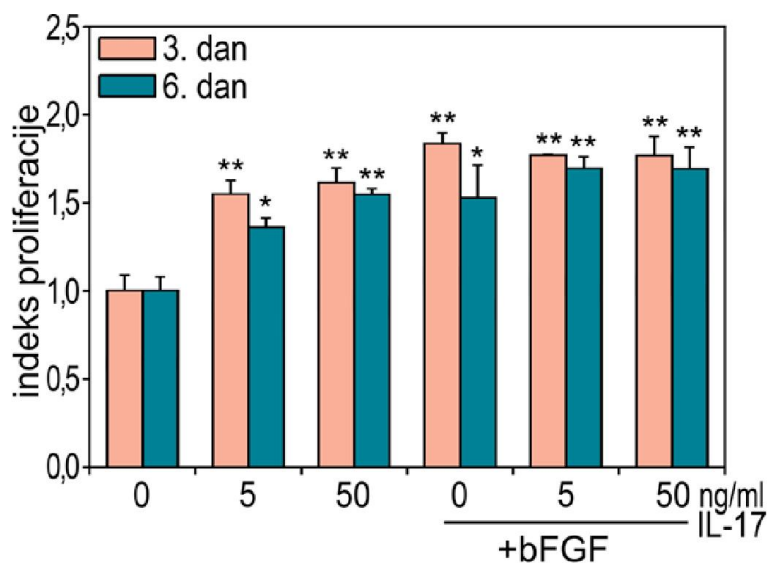
4.5. UTICAJ IL-17 NA KLONOGENI POTENCIJAL I PROLIFERACIJU mBM-MSC

U sledećem koraku ispitivan je uticaj IL-17 i bFGF na klonogeni potencijal mBM-MSC, odnosno na formiranje CFU-F kolonija. Čelije kostne srži miša su kultivisane 8 dana u medijumu bez dodatih faktora ili u medijumu sa dodatkom 1 ng/ml bFGF i/ili 5 ng/ml, odn. 50 ng/ml IL-17, pojedinačno ili u kombinaciji. Sam IL-17 je doveo do dozno zavisnog povećanja učestalosti CFU-F, iako bez statističke značajnosti, dok sam bFGF nije imao nikakav uticaj na formiranje CFU-F kolonija u odnosu na kontrolnu kulturu. Kultivacija mBM-MSC u medijumu sa bFGF u kombinaciji sa IL-17, u obe koncentracije, dovela je do smanjenja učestalosti CFU-F kolonija u odnosu na kontrolni medijum (Slika 4.11).



Slika 4.11. Uticaj IL-17 i bFGF na klonogeni potencijal mBM-MSC. Efekat IL-17 (5 ng/ml ili 50 ng/ml) i/ili bFGF (1 ng/ml) na broj CFU-F kolonija iz kostne srži miša. Rezultati predstavljaju aritmetičke sredine \pm SEM tri eksperimenta, od kojih je svaki izveden u duplikatu.

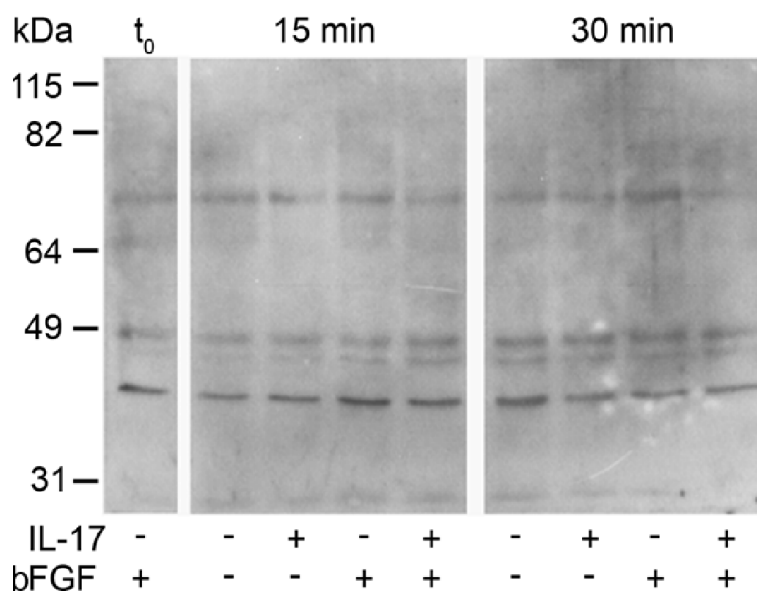
Pri analizi uticaja IL-17 na proliferaciju mBM-MSC, ćelije iz treće pasaže su prethodno 24 h kultivisane u medijumu bez FBS i faktora, da bi u daljem toku eksperimenta bila nastavljena kultivacija u standardnom medijumu za kultivaciju, bez faktora, ili sa dodatkom bFGF (1 ng/ml) i/ili IL-17 (5 ng/ml ili 50 ng/ml). Uticaj IL-17 i bFGF na proliferaciju mBM-MSC je određen merenjem metaboličke aktivnosti ćelija MTT testom u dve vremenske tačke (3 i 6 dana). Rezultati su predstavljeni indeksom proliferacije, koji predstavlja odnos optičke gustine testiranog uzorka i kontrolnih ćelija (gajenih u medijumu bez faktora) za odgovarajuću vremensku tačku. Očekivano, bFGF je doveo do značajnog povećanja proliferacije mBM-MSC određivane 3. i 6. dana kultivacije (Slika 4.12). U istom vremenskom periodu, i sam IL-17 je doveo do značajnog i dozno zavisnog povećanja proliferacije mBM-MSC. S druge strane, kultivisanje ćelija u prisustvu oba faktora nije uzrokovalo aditivan efekat na njihov proliferativni kapacitet (Slika 4.12).



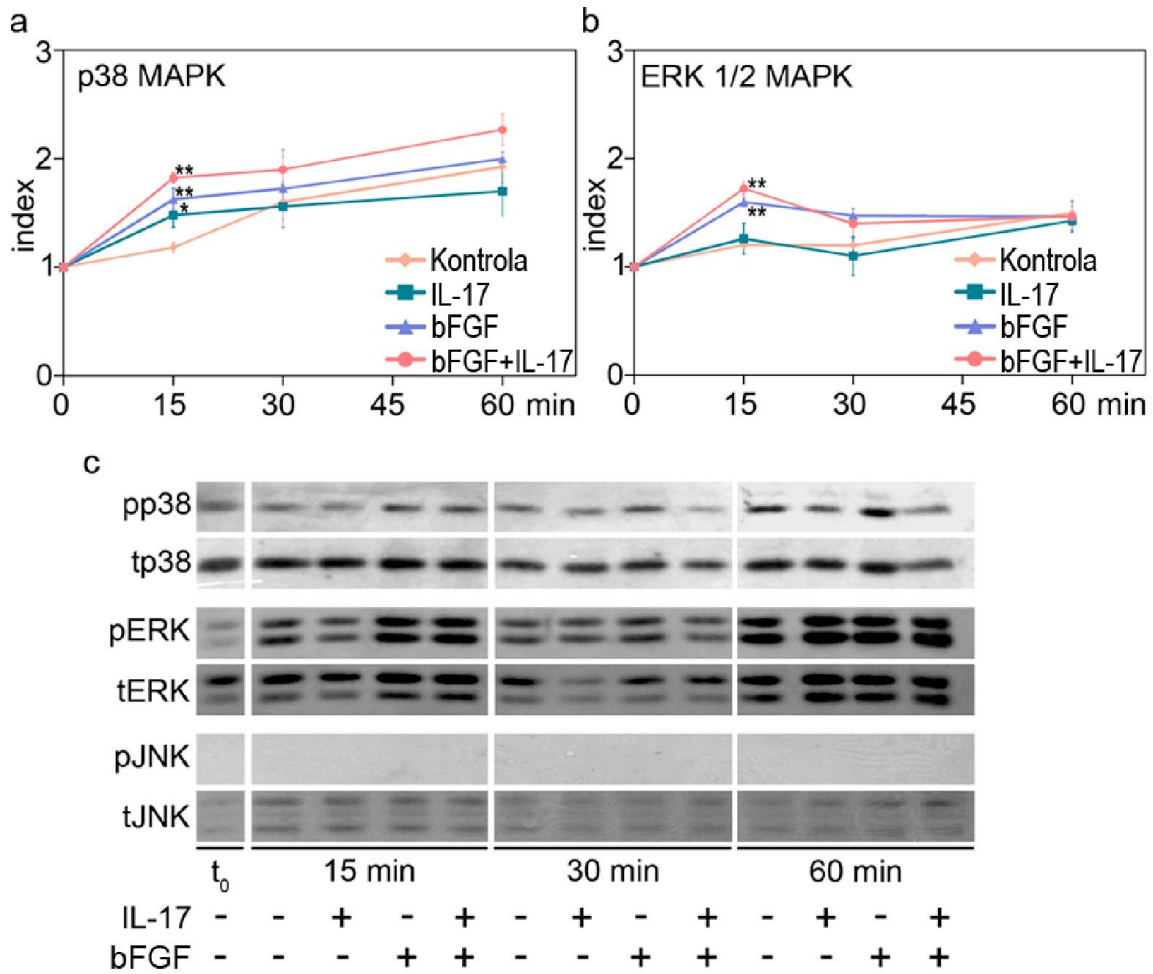
Slika 4.12. Uticaj IL-17 i bFGF na proliferaciju mBM-MSC. Efekat IL-17 (5 ng/ml ili 50 ng/ml) i/ili bFGF (1 ng/ml) na proliferaciju mBM-MSC određenu MTT testom. Indeks proliferacije predstavlja odnos vrednosti optičkih gustina eksperimentalnog uzorka i odgovarajuće kontrole (ćelije kultivisane u medijumu bez faktora). Rezultati predstavljaju aritmetičke sredine \pm SEM tri eksperimenta, od kojih je svaki izveden u duplikatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.6. SIGNALNI PUTEVI UKLJUČENI U DELOVANJE IL-17

Da bismo utvrdili koji signalni putevi su uključeni u delovanje IL-17 i/ili bFGF na mBM-MSC, ispitivali smo da li ovi faktori aktiviraju protein tirozin kinaze (PTK) i mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK). Čelije koje su prethodno 24 h kultivisane u medijumu bez FBS i faktora, inkubirane su u prisustvu 50 ng/ml IL-17 i/ili 1 ng/ml bFGF tokom različitih vremenskih perioda (15, 30 i 60 min.), nakon čega su ćelije lizirane i podvrgnute Western blot analizi na prisustvo različitih fosforilisanih komponenti signalnih puteva. Densitometrijska kvantifikacija je pokazala da je ukupan nivo fosfotirozina detektovan u kontrolnim mBM-MSC ostao nepromenjen nakon kultivacije ćelija u prisustvu IL-17 i/ili bFGF (**Slika 4.13**). S druge strane, analiza ekspresije MAPK signalnih puteva pokazala je da mBM-MSC konstitutivno ekspimiraju p38 i ERK1/2 kinaze, dok je ekspresija JNK kinaze bila na granici osetljivosti metode (**Slika 4.14 c**). Prisustvo bFGF u kulturama je dovelo do povećanja kako nivoa fosforilisanog p38 (**Slika 4.14 a**), tako i nivoa fosforilisanog ERK1/2 (**Slika 4.14 b**), dok je IL-17 indukovao povećanje fosforilacije p38 MAPK samo nakon 15 min. stimulacije (**Slika 4.14 a**). S druge strane, istovremeno prisustvo bFGF i IL-17 u kulturama mBM-MSC nije dovelo do dodatnog povećanja fosforilacije ERK1/2 u odnosu na delovanje samog bFGF (**Slika 4.14 b**). Međutim, istovremena stimulacija mBM-MSC sa IL-17 i bFGF uzrokovala je značajan porast nivoa fosforilacije p38 MAPK u odnosu na delovanje svakog od ovih faktora pojedinačno, a efekat stimulacije je bio nepromenjen do kraja ispitivanog perioda od 60 minuta (**Slika 4.14 a**).

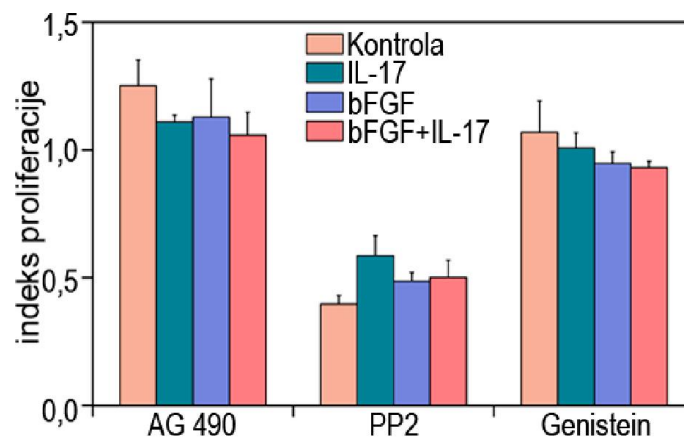


Slika 4.13. Efekat IL-17 i/ili bFGF na ukupne nivoe fosfotirozina u mBM-MSC. Imunoblot analiza je izvedena na ćelijskim lizatima mBM-MSC pre (t_0) i nakon 15 i 30 min. inkubacije u medijumu sa ili bez 50 ng/ml IL-17 i/ili 1 ng/ml bFGF. Proteini iz ćelijskih lizata su razdvojeni tehnikom SDS-PAGE nakon čega je izvršena imunoblot analiza korišćenjem specifičnog anti-fosfotirozinskog antitela. Prikazani su imunoblotovi iz jednog reprezentativnog od ukupno 3 eksperimenta.



Slika 4.14. Efekti IL-17 i bFGF na fosforilaciju MAPK u mBM-MSC. Imunoblot analiza je izvedena na ćelijskim lizatima mBM-MSC pre (t_0) i nakon 15, 30 i 60 min. inkubacije u medijumu sa ili bez 50 ng/ml IL-17 i/ili 1 ng/ml bFGF. Proteini iz ćelijskih lizata su razdvojeni tehnikom SDS-PAGE nakon čega je izvršena imunoblot analiza korišćenjem antitela specifičnih za ukupne ili fosforilisane p38, ERK1/2 i JNK MAPK. Promena fosforilacije p38 (**a**) i ERK MAPK (**b**) u vremenu, prikazana je na grafikonima kao aritmetička sredina \pm SEM odnosa intenziteta traka fosforilisanog i ukupnog proteina, normalizovanog na kontrolne vrednosti (t_0) iz tri eksperimenata. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Prikazani su i imunoblotovi iz jednog reprezentativnog od ukupno 3 eksperimenata (**c**).

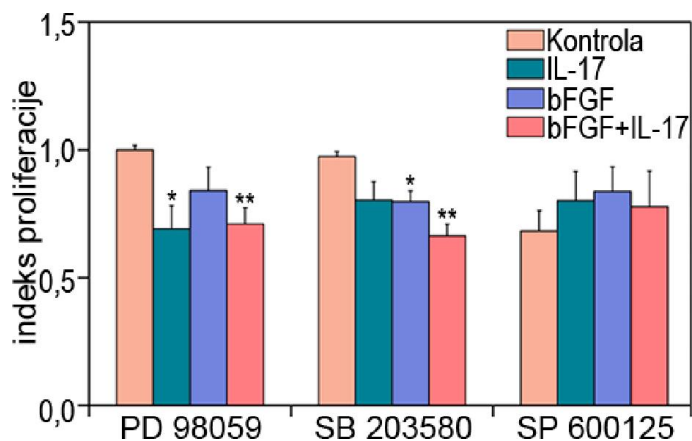
Kako bi se ispitao učešće MAPK i PTK u efektima IL-17 i bFGF na proliferaciju mBM-MSC, ćelije su 30 minuta pre kultivacije sa 50 ng/ml IL-17 i/ili 1 ng/ml bFGF preinkubirane sa specifičnim farmakološkim inhibitorima ovih signalnih puteva. Tri inhibitora PTK su korišćena u ove svrhe: Genistein, fitoestrogen koji inhibira receptorske tirozin kinaze, posebno EGFR-kinaze; zatim AG 490, trifostin koji selektivno inhibira Jak2 i Jak3 PTK; i PP2, selektivni inhibitor Src familije tirozin kinaza. Ni jedan od ova tri PTK inhibitora, uprkos svojim različitim specifičnostima, nije uticao na proliferaciju mBM-MSC indukovanu bilo kojim od faktora, pojedinačno ili u kombinaciji (Slika 4.15).



Slika 4.15. Uticaj specifičnih inhibitora PTK na efekte IL-17 i bFGF na rast mBM-MSC. Ćelije su inkubirane u prisustvu specifičnih inhibitora PTK (AG 490, PP2 i genistein) 30 min. pre inkubacije sa ili bez 50 ng/ml IL-17 i/ili 1 ng/ml bFGF i nakon 3 dana merena je proliferacija MTT testom. Indeks proliferacije predstavlja odnos vrednosti optičkih gustina eksperimentalnog uzorka i odgovarajuće kontrole (ćelije kultivisane u medijumu bez faktora). Rezultati su predstavljeni aritmetičkim sredinama \pm SEM tri eksperimenta, od kojih je svaki izveden u duplikatu.

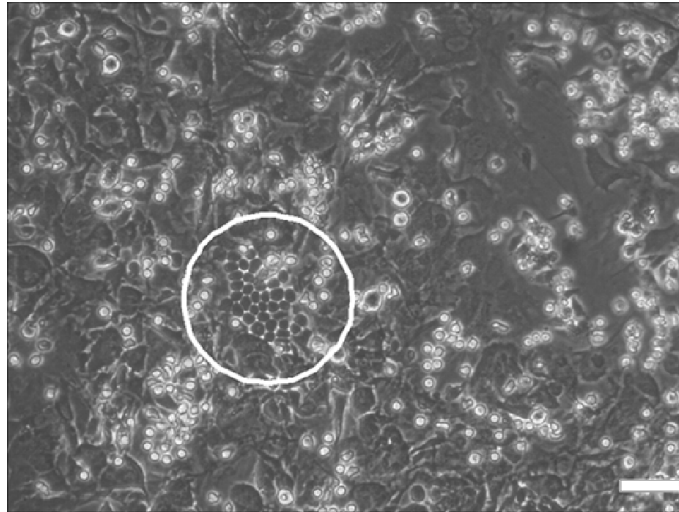
Za blokiranje delovanja MAPK korišćeni su sledeći reagensi: SB 203580 selektivni inhibitor p38, PD 98059 selektivni inhibitor MEK1/2-ERK1/2 i SP 600125 selektivni inhibitor JNK. Tretman mBM-MSC inhibitorom JNK (SP 600125) nije imao uticaja na proliferaciju ovih ćelija indukovanu IL-17 i/ili bFGF, što se moglo i očekivati budući da nije detektovana konstitutivna ekspresija ovog člana familije MAPK (Slika 4.16). Nasuprot tome, primena specifičnih inhibitora p38 i ERK1/2 kinaza, uzrokovala

je smanjenje proliferativnog kapaciteta mBM-MSC indukovano ispitivanim faktorima, ukazujući da su u delovanje IL-17 i bFGF na proliferaciju mBM-MSC uključena ova dva signalna puta (**Slika 4.16**).



Slika 4.16. Uticaj specifičnih inhibitora MAPK na efekte IL-17 i bFGF na rast mBM-MSC. Čelije su inkubirane u prisustvu specifičnih inhibitora MAPK (PD 98059, SB 203580 i SP 600125) 30 min. pre inkubacije sa ili bez 50 ng/ml IL-17 i/ili 1 ng/ml bFGF i nakon 3 dana merena je proliferacija MTT testom. Indeks proliferacije predstavlja odnos vrednosti optičkih gustina eksperimentalnog uzorka i odgovarajuće kontrole (ćelije kultivisane u medijumu bez faktora). Rezultati su predstavljeni aritmetičkim sredinama \pm SEM tri eksperimenta, od kojih je svaki izveden u duplikatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

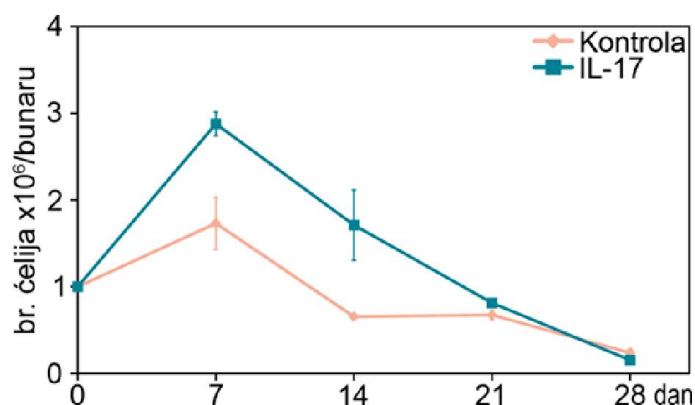
4.7. UTICAJ IL-17 NA SPOSOBNOST MSC DA PODRŽAVAJU HEMATOPOEZU



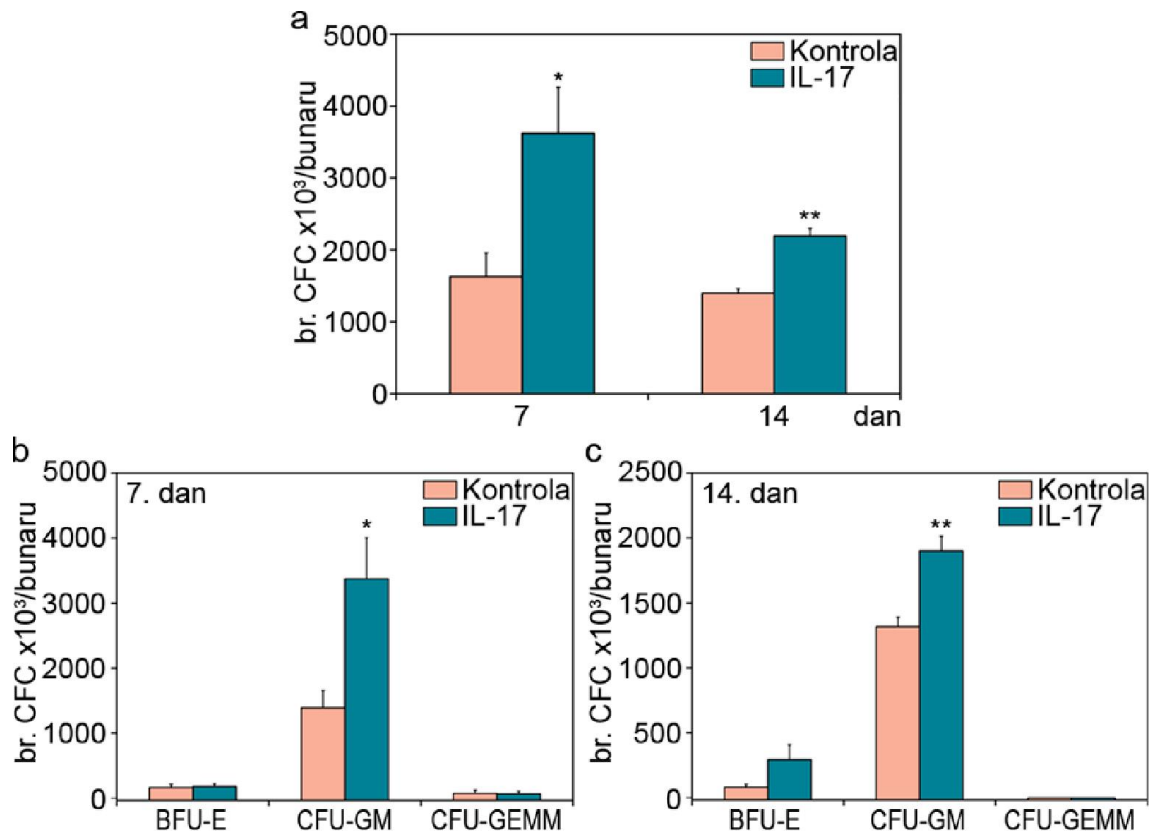
Slika 4.17. Izgled kokulture mBM-MSC i neadherentnih mononuklearnih ćelija kostne srži miša u sistemu LTBM nakon 7 dana. Vide se tipične kolonije ćelija nalik kaldrmi (*cobblestone area*). Razmernik: 50 μm .

Sposobnost održavanja hematopoeze je svakako jedna od najvažnijih funkcija MSC kostne srži, a uticaj IL-17 na hematopoezu je posredovan upravo preko faktora koje proizvode stromalne ćelije. Da bi se utvrdilo kakav je efekat ovog citokina na mBM-MSC u smislu njihove potpore hematopoezi, mBM-MSC koje su prethodno pet dana kultivisane u medijumu za ekspanziju sa ili bez 50 ng/ml IL-17, tretirane su mitomicinom C kako bi se zaustavila njihova proliferacija. Nakon ispiranja, mBM-MSC su kokultivisane sa neadherentnom frakcijom mononuklearnih ćelija kostne srži miša u medijumu za dugotrajnu kulturu kostne srži (LTBM). Nakon 7 dana u obe ispitivane grupe bilo je primetno formiranje grupacija ćelija sličnih kaldrmi (eng. *cobblestone area*), koje predstavljaju najranije hematopoetske prethodnike u *in vitro* uslovima (Slika 4.17). Ove formacije su bile prisutne i nakon 3 nedelje kokulture. Uticaj IL-17 na sposobnost mBM-MSC da podržavaju hematopoezu smo određivali i analizom ukupnog

broja neadherentnih ćelija u kulturi nakon 7, 14, 21 i 28 dana, kao i broja CFC i broja morfološki prepoznatljivih prekursora u kokulturama sa mBM-MSC koje su prethodno kultivisane sa ili bez IL-17. Rezultati su pokazali da pretretman mBM-MSC ovim citokinom ima uticaja na sva tri parametra. Naime, u kokulturi hematopoetskih ćelija sa mBM-MSC pretretiranim IL-17, nakon 7 i 14 dana inkubacije, uočen je izraženiji porast apsolutnog broja neadherentnih ćelija u odnosu na kokulturu sa kontrolnim mBM-MSC, mada bez statističke značajnosti. Nakon 21 dana kultivacije, broj ćelija u obe kulture bio je približno jednak. Takođe, nakon ovog termina uočen je konstantan pad broja ćelija u kokulturama (Slika 4.18).



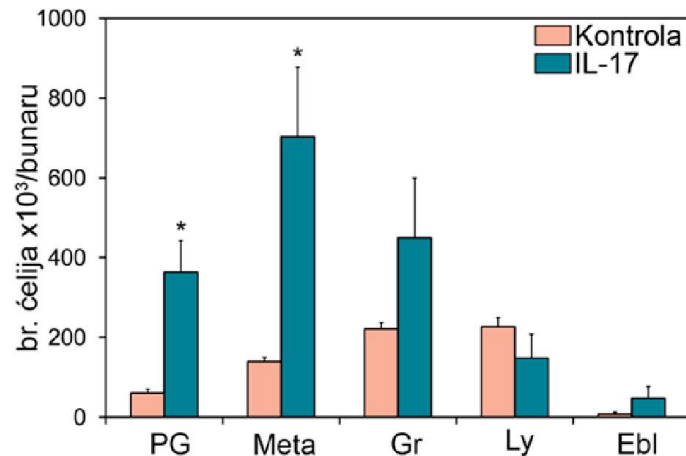
Slika 4.18. Uticaj IL-17 na sposobnost mBM-MSC da podržavaju hematopoezu u sistemu LTBMK – efekat na ukupne ćelije. Pet dana pre dodavanja hematopoetske frakcije ćelija kostne srži mBM-MSC su kultivisane u medijumu za ekspanziju sa ili bez dodatka 50 ng/ml IL-17, nakon čega je kultivacija nastavljena pod jednakim uslovima za obe populacije mBM-MSC u medijumu za LTBMK. Nakon 7, 14, 21 i 28 dana kultivacije, određivan je apsolutni broj ćelija u suspenziji LTBMK koji je prikazan na grafiku kao aritmetička sredina ± SEM iz reprezentativnog eksperimenta izvedenog u duplikatu.



Slika 4.19. Uticaj IL-17 na sposobnost mBM-MSC da podržavaju hematopoezu u sistemu LTBM – efekat na CFC. Pet dana pre dodavanja hematopoetske frakcije ćelija kostne srži mBM-MSC su kultivisane u medijumu za ekspanziju sa ili bez dodatka 50 ng/ml IL-17, nakon čega je kultivacija nastavljena pod jednakim uslovima za obe populacije mBM-MSC u medijumu za LTBM. Broj CFC u suspenziji LTBM je određivan nakon 7 i 14 dana i prikazan grafički kao aritmetička sredina ± SEM apsolutnog broja ukupnih CFC (**a**) i apsolutnog broja BFU-E, CFU-GM i CFU-GEMM (**b** i **c**) iz reprezentativnog eksperimenta izvedenog u duplikatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

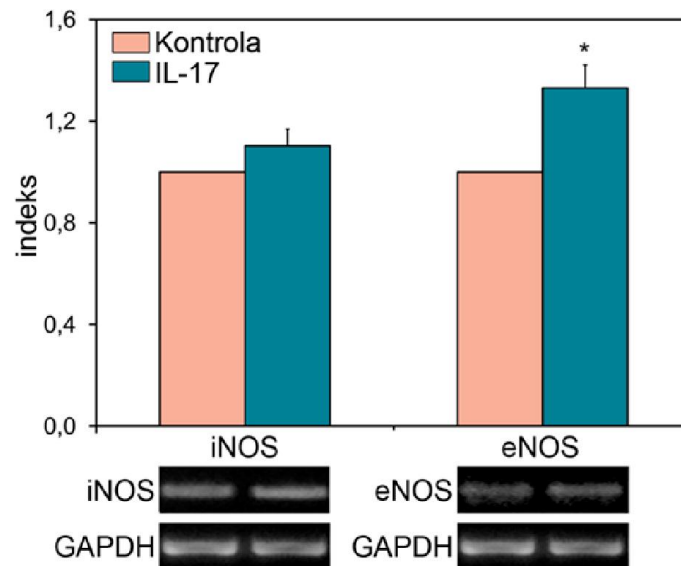
Određivanje apsolutnog broja CFC kolonija je pokazalo da, u odnosu na kokulturu sa kontrolnim mBM-MSC, mBM-MSC pretretirane IL-17 uzrokuju značajno povećanje apsolutnog broja ukupnih CFC kolonija (**Slika 4.19 a**), kao i CFU-GM progenitora (**Slika 4.19 b i c**), i to kako sedmog, tako i 14. dana kultivacije. Određivanjem morfološki prepoznatljivih prethodnika bele i crvene loze nakon 14 dana kultivacije, u kokulturama ćelija sa IL-17 pretretiranim mBM-MSC je utvrđeno značajno povećanje apsolutnog broja nezrelijih prethodnika mijeloidne loze – proliferativnih granulocita (mijeloblasta, promijelocita i mijelocita) i metamijelocita u odnosu na kontrolne

kokulture ćelija. Uočeno povećanje zrelih granulocita, kao i prethodnika limfoidne i eritroidne loze nije bilo statistički značajno (Slika 4.20).



Slika 4.20. Uticaj IL-17 na sposobnost mBM-MSC da podržavaju hematopoezu u sistemu LT BMC – efekat na morfološki prepoznatljive prethodnike. Pet dana pre dodavanja hematopoetske frakcije ćelija kostne srži mBM-MSC su kultivisane u medijumu za ekspanziju sa ili bez dodatka 50 ng/ml IL-17, nakon čega je kultivacija nastavljena pod jednakim uslovima za obe populacije mBM-MSC u medijumu za LT BMC. Morfološki prepoznatljivi prethodnici u suspenziji LT BMC su analizirani 14. dana i njihov apsolutni broj je prikazan grafički kao aritmetička sredina \pm SEM iz reprezentativnog eksperimenta izvedenog u duplikatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$. PG – proliferativni granulociti; Meta – metamijelociti; Gr – zreli granulociti; Ly – limfociti i limfocitni prethodnici; Ebl – eritroblasti.

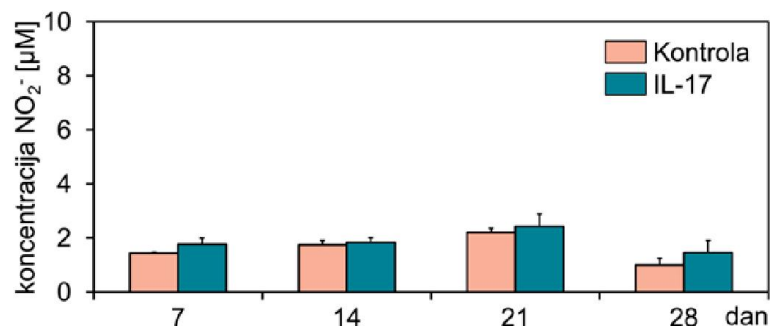
4.8. UTICAJ IL-17 NA EKSPRESIJU NOS I PRODUKCIJU NO



Slika 4.21. Uticaj IL-17 na indukciju gena za NOS u mBM-MSC. Čelije su inkubirane 6 h u medijumu za ekspanziju sa ili bez dodatka 50 ng/ml IL-17, nakon čega je iz mBM-MSC izolovana iRNK i određena ekspresija gena za iNOS i eNOS primenom metode RT-PCR. GAPDH je korišćena kao kontrola količine komplementarne DNK u uzorku. Prikazane vrednosti predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM odnosa intenziteta traka ispitivanog gena i GAPDH u odgovarajućim eksperimentalnim uslovima, normalizovanih prema kontrolnim uslovima kultivacije (bez IL-17) iz dva eksperimenta izvedena u duplikatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$.

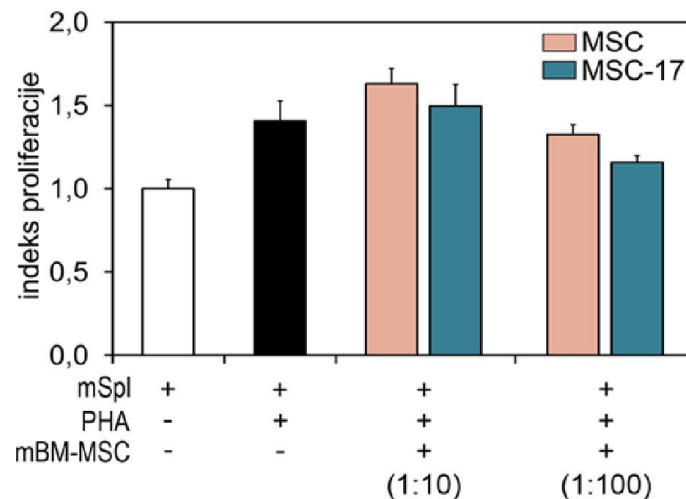
Jedan od mogućih medijatora preko kojih IL-17 ostvaruje svoje dejstvo na ćelije hematopoeze je NO, za koji smo u našim prethodnim radovima *in vitro* i *in vivo* pokazali da ima ulogu u regulaciji hematopoeze (Bugarski i sar., 2004, Krstić i sar., 2009^a). Stoga je u daljem radu ispitivan uticaj IL-17 na ekspresiju proteina i iRNK za dve izoforme NO sintaze, konstitutivnu (eNOS) i inducibilnu (iNOS), u mBM-MSC. Kao i u našim prethodnim ispitivanjima (Krstić i sar., 2009^a), nivo eNOS i iNOS proteina u mBM-MSC bio je ispod praga osetljivosti Western blot analize (rezultati nisu

prikazani). Međutim, primenom metode RT-PCR detektovana je ekspresija gena za obe izoforme NOS u mBM-MSC. Iako je nivo ekspresije gena za eNOS i iNOS bio nizak u kontrolnim, nestimulisanim ćelijama, nakon 6 h kultivacije sa IL-17, je pokazano povećanje ekspresije iRNK za obe ispitivane izoforme NOS u IL-17 tretiranim mBM-MSC, pri čemu je IL-17 indukovano povećanje nivoa eNOS bilo statistički značajno (Slika 4.21). Takođe, ispitan je i nivo produkcije NO u supernatantima kokultura u sistemu LT BMC nakon 7, 14, 21 i 28 dana. Rezultati određivanja koncentracije oslobođenih nitrita Grisovom reakcijom su pokazali nizak nivo nitrita, kako u LT BMC kokulturama sa IL-17 pretretiranim mBM-MSC, tako i u kontrolnim, i to u svim analiziranim terminima (Slika 4.22).



Slika 4.22. Uticaj IL-17 na produkciju NO u sistemu LT BMC. Pet dana pre dodavanja hematopoetske frakcije ćelija kostne srži mBM-MSC su kultivisane u medijumu za ekspanziju sa ili bez dodatka 50 ng/ml IL-17, nakon čega je kultivacija nastavljena pod jednakim uslovima za obe populacije mBM-MSC u medijumu za LT BMC. Nakon 7, 14, 21 i 28 dana kultivacije, određivana je koncentracija nitrita u supernatantima kultura Grisovom metodom i rezultati su prikazani grafički kao aritmetička sredina \pm SEM iz reprezentativnog eksperimenta izvedenog u duplikatu.

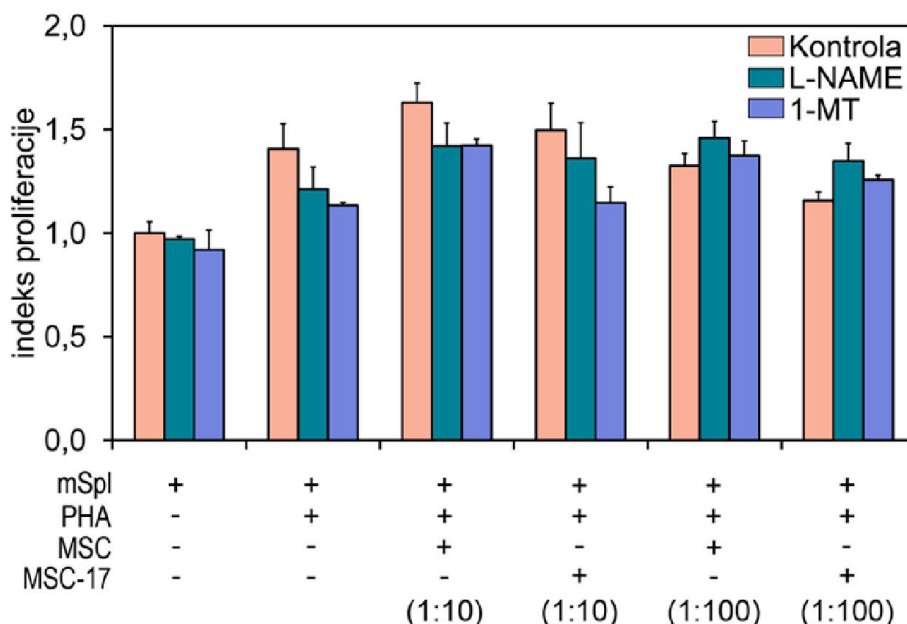
4.9. IMUNOMODULATORNA SPOSOBNOST mBM-MSC



Slika 4.23. Imunomodulatorna sposobnost mBM-MSC u kulturi mitogenom stimulisanih singenih ćelija slezine. Mišje BM-MSC koje su prethodno 5 dana kultivisane u medijumu za ekspanziju sa (MSC-17) ili bez (MSC) 50 ng/ml IL-17, kokultivisane su pod jednakim uslovima zajedno sa ćelijama slezine CBA miša (mSpl) stimulisanim PHA, u odnosu 1:10 ili 1:100 (MSC:mSpl). Proliferacija je merena metodom ugradnje BrdU i predstavljena odnosom vrednosti proliferacija eksperimentalnog uzorka i samih nestimulisanih limfocita (indeks proliferacije). Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine \pm SEM iz jednog reprezentativnog od ukupno dva eksperimenta izvedena u triplikatu.

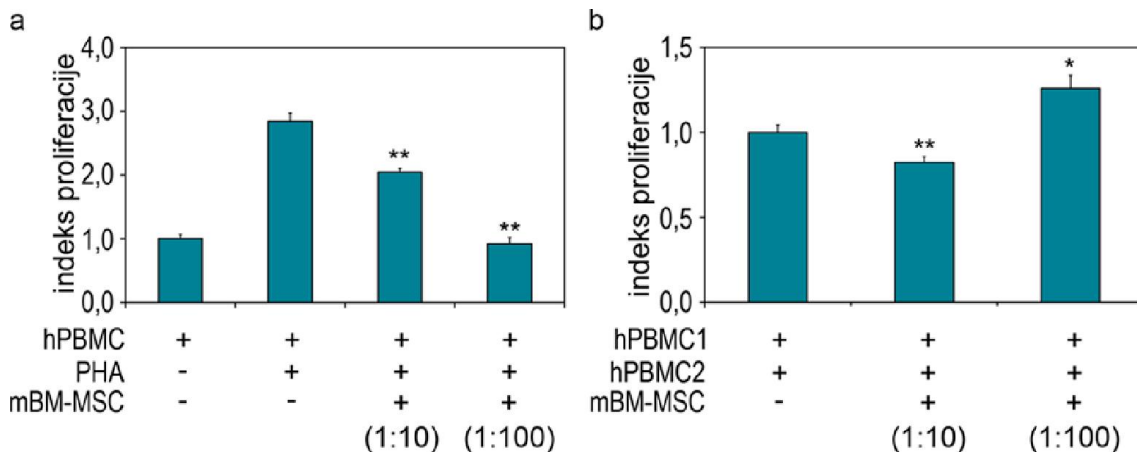
Imunomodulatorni potencijal MSC je jedna od važnih osobina ovih ćelija, koja se ispituje kao osnova za njihovu buduću kliničku primenu. Međutim, dosadašnja saznanja su pokazala da imunomodulatorna sposobnost ovih ćelija zavisi od različitih faktora, i može se ispoljiti kako u vidu inhibicije, tako i stimulacije proliferativnog odgovora limfocita na mitogene stimulse. Stoga je naredni zadatak istraživanja bio da se ispita uticaj mBM-MSC na proliferaciju mitogenom stimulisanih mišjih slezinskih ćelija, kao i uticaj IL-17 na ovu funkciju mBM-MSC. Nakon što su prethodno kultivisane pet dana u medijumu za ekspanziju sa ili bez dodatka 50 ng/ml IL-17, mBM-MSC su postavljene u različitom odnosu (1:10 i 1:100) u kokulturu sa ćelijama slezine miša. Rezultati su

pokazali da prisustvo mBM-MSC u ovom sistemu nije dovelo do inhibicije proliferacije slezinskih ćelija. Takođe, prethodna kultivacija sa IL-17 nije uticala na ovu sposobnost mBM-MSC (**Slika 4.23**). Saglasno sa ovim nalazima, bili su i rezultati da dodatak specifičnih inhibitora, kako L-NAME, neselektivnog inhibitora NO sintaza, tako i 1-metiltryptofana, inhibitora IDO, enzima koji su uključeni u imunosupresivno delovanje MSC, nisu imali efekta na sposobnost mBM-MSC da moduliše proliferativni odgovor ćelija slezine miša na poliklonski aktivator (**Slika 4.24**). Pored toga, koncentracija NO u supernatantima kokultura mBM-MSC sa mitogenom stimulisanim limfocitima bila je na granici ili ispod nivoa osetljivosti merenja Grisovom metodom (podaci nisu prikazani).



Slika 4.24. Uticaj inhibitora NOS i IDO na imunomodulatornu sposobnost mBM-MSC. Mišje BM-MSC koje su prethodno 5 dana kultivisane u medijumu za ekspanziju sa (MSC-17) ili bez (MSC) dodatih 50 ng/ml IL-17, kokultivisane su pod jednakim uslovima zajedno sa ćelijama slezine CBA miša (mSpl) stimulisanim PHA, u odnosu 1:10 ili 1:100 (MSC:mSpl). U određene kulture je dodavan L-NAME, neselektivni inhibitor NOS, ili 1-metiltryptofan (1-MT), inhibitor IDO. Proliferacija je merena metodom ugradnje BrdU i predstavljena odnosom vrednosti proliferacija eksperimentalnog uzorka i samih nestimuliranih limfocita (indeks proliferacije). Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine ± SEM iz jednog reprezentativnog od ukupno dva eksperimenta izvedena u triplicatu.

U cilju dalje analize imunomodulatorne sposobnosti mišjih BM-MSC određivan je i uticaj mBM-MSC na mitogenom i aloantigenom stimulisanu proliferaciju humanih limfocita. U testu mitogenom stimulisane proliferacije humanih PBMC rezultati su pokazali da mBM-MSC inhibiraju proliferaciju PBMC u odgovoru na PHA (Slika 4.25 a). S druge strane, efekat mBM-MSC na proliferaciju PBMC u dvosmernoj MLR, iako opet zavisen od ćelijske koncentracije primenjene u testu, bio je dvojak. Naime, mBM-MSC su dovele do smanjenja proliferacije humanih ćelija kad su primenjene u višoj koncentraciji (odn. u odnosu 1:10 MSC/PBMC), dok su u nižoj koncentraciji (u odnosu 1:100 MSC/PBMC) uzrokovale stimulaciju proliferacije PBMC (Slika 4.25 b).



Slika 4.25. Imunomodulatorna sposobnost mBM-MSC u kulturama sa humanim PBMC. Mišje BM-MSC su kokultivisane zajedno sa PHA stimulisanim PBMC (**a**) ili u MLR sa PBMC dva nesrodna davaoca (**b**) u odnosu 1:10 ili 1:100 (MSC:PBMC). Proliferacija je merena metodom ugradnje BrdU i predstavljena odnosom vrednosti proliferacija eksperimentalnog uzorka i samih nestimulisanih limfocita (indeks proliferacije). Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine \pm SEM iz dva eksperimenta izvedena u triplicatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

5.

DISKUSIJA

Upotreba životinjskih modela je neophodna u osnovnim istraživanjima radi boljeg i celovitijeg uvida u osnovne fiziološke procese. Takođe, to su i neophodni modeli u istraživanjima humanih bolesti, u razvoju novih terapijskih strategija, kao i za ispitivanje efikasnosti i toksičnosti novih terapijskih modaliteta u pretkliničkim istraživanjima. Miš je idealna vrsta za eksperimentalna istraživanja u mnogim oblastima nauke iz više razloga. Prvo, njihova genetika i drugi aspekti mišje fiziologije su dobro poznati i mogu se povući mnoge paralele između miševa i ljudi. Dostupnost metoda manipulacije njihovim genomom pruža mogućnost stvaranja transgenih sojeva radi ispitivanja specifičnih bioloških problema. S druge strane, tehnike uzgajanja laboratorijskih životinja omogućavaju stvaranje genetski homogenih ili heterogenih miševa. Takođe, već uspostavljeni eksperimentalni mišji modeli humanih bolesti predstavljaju neprocenjivo sredstvo za testiranje i razvoj novih terapijskih modaliteta. Na kraju, jedna od bitnih prednosti korišćenja miševa kao životinjskih modela jeste i taj što su troškovi njihovog održavanja relativno niski.

Miš može biti pogodan eksperimentalni model i za izučavanje biologije MSC, kako za korišćenje u studijama biokompatibilnosti, tako i kao model za tkivno inženjerstvo. Izolacija i karakterizacija mišjih MSC predstavlja polaznu osnovu za korišćenje mišjih modela u cilju istraživanja različitih terapijskih strategija zasnovanih na MSC. Međutim, izolacija i prečišćavanje MSC, posebno iz kostne srži, kod miševa predstavlja mnogo veći izazov nego kod drugih vrsta. Kao prvo, kostna srž miša sadrži mnogo manji broj MSC u odnosu na druge vrste. Friedenstein i saradnici (*Friedenstein i sar., 1976*) navode učestalost u rasponu od 3 do 45 CFU-F na milion ćelija kostne srži, dok se nalazi Phinney i saradnika (*Phinney i sar., 1999*), u zavisnosti od ispitivanog soja miša, kreću od 0,3 kod C57Bl/6 miša do 3 kod BALB/c miša na milion ćelija kostne srži. Naši rezultati pokazuju prosečnu učestalost od 8,1 CFU-F na 10^6 ukupnih ćelija kostne srži. Ovako mali prinos mišjih BM-MSC neki autori objašnjavaju njihovom anatomskom lokalizacijom uz samu kost, što otežava dobijanje dovoljnog broja ovih ćelija uobičajenim ispiranjem šupljine kosti (*Sun i sar., 2003*). Drugi problem predstavlja prisustvo velikog broja drugih ćelija, pored MSC, unutar CFU-F kolonija, uključujući fibroblaste, makrofage, endotelne ćelije, kao i hematopoetske prethodnike (*Xu i sar., 1983; Phinney i sar., 1999*). Pored svega toga, mišje BM-MSC pokazuju

velike međusojne razlike u prinosu, proliferativnom kapacitetu, potencijalu za diferencijaciju, ekspresiji površinskih markera, kao i u optimalnim uslovima kultivacije (Phinney i sar., 1999; Peister i sar., 2004; Eslaminejad i sar., 2006). Naša prethodna istraživanja takođe pokazuju sojno specifične razlike u učestalosti CFU-F između pet različitih sojeva miševa kod kojih vrednosti variraju u proseku od 1,34 na 10^6 ćelija kostne srži C57/Bl miševa do 6,64 na 10^6 ćelija kostne srži CBA soja (Mojsilović i sar., 2011). Nepostojanje jedinstvenog protokola za izolaciju i kultivaciju mišjih BM-MSC dodatno doprinosi razlikama u dobijenim rezultatima različitih laboratorija. Prema nama dostupnim podacima, do sada nema objavljenih podataka o izolaciji i karakterizaciji BM-MSC iz CBA soja miša.

U istraživanjima obuhvaćenim ovim radom, izolovali smo i okarakterisali mišje BM-MSC na osnovu njihove učestalosti u kostnoj srži, morfoloških i imunofenotipskih karakteristika, kinetike rasta, sposobnosti diferencijacije, imunomodulatornih karakteristika i sposobnosti održavanja hematopoeze. Koristeći opisanu metodologiju, nakon nekoliko pasaža, dobili smo populaciju mBM-MSC koja je zadovoljavala kriterijume Komiteta za MSC Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju, budući da su ove ćelije rasle kao adherentne ćelije na plastičnoj podlozi, ispoljavale su karakteristične mezenhimske markere, nisu bile kontaminirane ćelijama hematopoetskih linija i pokazivale su višelinijski potencijal za diferencijaciju (Dominici i sar., 2006)

Morfološke osobine su odgovarale osobinama MSC izolovanim iz humane i mišje kostne srži, budući da su adherirale za plastiku i rasle formirajući diskretne kolonije. Primarna kultura se sastojala iz morfološki heterogenih adherentnih ćelija, ali su ćelije vretenastog oblika vremenom postale predominantne. Imunofenotipska karakterizacija je pokazala da su ove ćelije ispoljavale ćelijske markere karakteristične za mezenhimske ćelije i da nisu ispoljavale markere hematopoetskih linija. Pored fenotipske analize, odsustvo hematopoetskih ćelija u značajnoj meri je potvrđeno i testom formiranja kolonija hematopoetskih ćelija na metilceluloznoj podlozi (CFC test). Što se tiče ostalih adherentnih ćelija iz kostne srži koje nisu MSC, kao što su ćelije granulocitno-monocitne loze koje mogu biti prisutne u MSC frakciji mišje kostne srži (Phinney i sar., 1999), negativna reakcija sa antitelima na mijeloidne i neutrofilne epitope na hematopoetskim ćelijama (CD11b, Gr-1, 7/4) dovodi do zaključka da je broj ovih ćelija sličnih fibroblastima smanjen tokom pasažiranja. Osim toga, prilikom pasažiranja ćelija,

posebno tokom ranih (1. i 2.) pasaža, primetno je da veliki broj ćelija ostaje zalepljen za podlogu nakon kratkotrajnog (do 5 min.) tretmana tripsinom i EDTA. Prethodne studije su pokazale da su MSC osetljivije na tripsin (*Digirolamo i sar., 1999*), dok monociti i makrofagi ostaju čvrsto prilepljeni za podlogu nakon tripsinizacije (*Sun i sar., 2003*). Pored toga, takve ćelije koje ne reaguju na tripsin ne pokazuju mezenhimske karakteristike (*Nadri i sar., 2007*). Sve ovo ukazuje da smo, koristeći opisani metod, dobili prečišćenu populaciju ćelija sličnih fibroblastima koje imaju visok potencijal za proliferaciju i diferencijaciju u mezenhimske linije.

Naredni deo istraživanja je imao za cilj da ispita efekte IL-17 i/ili bFGF na rast mBM-MSC, kao i da razjasni koji su signalni putevi u njih uključeni. Za ova dva medijatora je prethodno pokazano da su važni faktori rasta stromalnih ćelija (*Bianchi i sar., 2003; Huang i sar., 2006*). Rezultati dobijeni ovim istraživanjem su potvrdili ova zapažanja i ukazali na to da IL-17 i bFGF ne utiču na mezenhimski karakter mišjih BM-MSC *in vitro*. Kao što se i očekivalo, a u skladu sa prethodno opisanim ispoljavanjem receptora za IL-17 na različitim stromalnim ćelijama, uključujući MSC iz humane kostne srži (*Silva i sar., 2003; Huang i sar., 2009*), i u ovom radu je pokazano da mišje BM-MSC ispoljavaju ovaj receptor. Što se tiče efekta IL-17 na mBM-MSC, rezultati su pokazali da ovaj citokin povećava učestalost CFU-F i proliferaciju mišjih BM-MSC na dozno zavisani način. Prethodno je pokazano da IL-17 indukuje proliferaciju različitih ćelija, kao što su endometrijalne stromalne ćelije i epitelne ćelije disajnih puteva (*Inoue i sar., 2006; Hirata i sar., 2008*). Rezultati ovog istraživanja su u skladu sa objavljenim podacima koji pokazuju da IL-17 značajno stimuliše *in vitro* formiranje CFU-F kolonija stromalnih ćelija humane kostne srži (*Huang i sar., 2006*), kao i njihovu proliferaciju, što je kasnije pokazano da zavisi od stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (*Huang i sar., 2009*). Istovremeno, stimulatorni efekat IL-17 na CFU-F kod miševa je primećen samo *in vivo* i zahtevao je prethodno oštećenje hematopoetskog sistema indukovano mijeloablativnim dozama zračenja (*Huang i sar., 2006*). Na osnovu toga se pretpostavilo da su za ovaj efekat IL-17 na mišje stromalne ćelije *in vivo* potrebni jedan ili više dodatnih kofaktora, a kao kandidati su predloženi neki od sinergističkih citokina, kao što su predstavnici familije fibroblastnog faktora rasta. Ovi rezultati su i nas naveli da u daljem radu ispitujemo kombinovani efekat IL-17 i bFGF na rast MSC. Naši rezultati u *in vitro* uslovima su pokazali da sam bFGF

nije značajno uticao na formiranje CFU-F kolonija, ali je doveo do povećane proliferacije mBM-MSC, što je saglasno već pokazanoj ulozi bFGF kao faktora rasta humanih MSC (Sotiropoulou i sar., 2006^b; Levy i sar., 2008). IL-17, primenjen sam u kulturama, uzrokovao je značajno, mada ne i statistički, dozno zavisno povećanje broja CFU-F kolonija. Takođe, IL-17 je stimulisao i proliferaciju mBM-MSC. Međutim, u eksperimentalnim uslovima primenjenim u našim istraživanjima zajedničko delovanje IL-17 i bFGF nije dovelo do aditivnog stimulativnog efekta na proliferaciju mBM-MSC, dok se broj CFU-F kolonija čak i neznatno smanjio u odnosu na kontrolu. Bazni FGF je citokin koji se često dodaje medijumima za kulture kako bi stimulisao proliferaciju različitih tipova ćelija uključujući i MSC iz kostne srži. Dobro je poznato da bFGF povećava potencijal proliferacije i životni vek humanih MSC tokom ekspanzije *in vitro* (Bianchi i sar., 2003), uz očuvanje njihovog višelinijskog potencijala diferencijacije (Solchaga i sar., 2005; Sotiropoulou i sar., 2006^b). Naši rezultati koji pokazuju da bFGF indukovana proliferacija nije imala uticaja na potencijal za diferencijaciju mBM-MSC u pravcu osteogene i adipogene linije u skladu su sa sličnim nalazima drugih autora da bFGF ne utiče na osteogeni potencijal humanih MSC (Bianchi i sar., 2003; Levy i sar., 2008). Naši rezultati takođe pokazuju da ni IL-17 nije uticao na potencijal za diferencijaciju mBM-MSC u pravcu osteoblasta i adipocita. Što se tiče literaturnih podataka o uticaju ovog citokina na diferencijaciju MSC, rezultati se dosta razlikuju u zavisnosti od primenjenog modela, ukazujući i potvrđujući brojne nalaze da njegovi efekti umnogome zavise od specifične mikrosredine i/ili specifičnih potreba organizma. Naime, pokazano je da IL-17 pojačava osteogenu diferencijaciju humanih MSC (Huang i sar., 2009), dok, s druge strane, inhibira adipogenezu humanih MSC, ali pojačava adipogenu diferencijaciju mišjih MSC (Shih i sar., 2009; Lee i sar., 2011). Naša grupa je takođe istraživala uticaj IL-17 na sposobnost višelinijske diferencijacije mišje multipotentne ćelijske linije C2C12 (Kocić i sar., 2012). Ove ćelije predstavljaju mioblastne progenitore, poreklom od nediferencirane mezenhimske ćelije, koje imaju sposobnost da se diferenciraju *in vitro* u pravcu miogene i osteogene linije. Rezultati su pokazali da IL-17 menja diferencijacionu opredeljenost ovih ćelija tako što inhibira miogenu, a indukuje osteogenu diferencijaciju C2C12 ćelija i to preko aktivacije ERK1/2 MAPK. Ovi nalazi samo počinju da otkrivaju nove uloge IL-17 u ćelijskoj diferencijaciji i dalja istraživanja bi trebalo detaljnije da se posvete ovoj temi.

Sledeći korak u ispitivanju efekta IL-17 i bFGF na mBM-MSC je bio ispitivanje signalnih puteva za koje se zna da imaju važnu ulogu u proliferaciji BM-MSC, a koje pokreću ova dva faktora. Iako su protein tirozin kinaze dobro poznate kao važni medijatori ćelijske proliferacije, njihovo učešće u aktivnosti IL-17 i bFGF na proliferaciju mBM-MSC nije pokazano u našem modelu, imajući u vidu da su nivoi ukupnih fosfotirozina ostali nepromenjeni nakon kultivacije u prisustvu IL-17 i/ili bFGF. To je potvrđeno i ispitivanjima uticaja specifičnih farmakoloških inhibitora ovih signalnih molekula, budući da inhibitori EGFR-kinaze, Jak2 i Jak3 PTK, kao i selektivni inhibitor Src familije tirozin kinaza, nisu uticali na proliferaciju mBM-MSC indukovanu kako IL-17, tako i bFGF.

Među ostalim signalnim molekulima, MAPK signalna kaskada, posredovana ERK, JNK i p38 kinazama, je najveći signalni put regulisan faktorima rasta i stresom, koji sledstveno pokreće dugoročne ćelijske odgovore, uključujući preživljavanje i proliferaciju. Dosadašnja istraživanja signalizacije IL-17 su pokazala da se brojni efekti ovog citokina na različite tipove ćelija ostvaruju preko aktivacije sva tri tipa MAPK, ali na način specifičan za svaki pojedinačni ćelijski tip (*Miljkovic i Trajkovic, 2004; Gaffen, 2009*). Naši rezultati pokazuju važnu ulogu p38 i ERK MAPK signalnih puteva i u proliferativnoj aktivnosti IL-17 na mBM-MSC. Iako je IL-17 pokazao stimulatorni efekat samo na fosforilaciju p38 kinaze, farmakološka inhibicija p38 MAPK (pomoću SB 203580), ali i MEK1/2-ERK1/2 signalnih molekula (pomoću PD 98059), značajno su smanjili IL-17-zavisnu proliferaciju mBM-MSC. Ovi nalazi upućuju da je potrebno uraditi dodatne eksperimente kako bi detaljno ispitali ulogu ERK u proliferativnom delovanju IL-17 na mBM-MSC, analizom fosforilacije ERK u kraćim, odnosno dužim vremenskim periodima nakon stimulacije IL-17. Budući da učešće ERK MAPK može biti rezultat kooperativnog delovanja IL-17 sa drugim biološki aktivnim molekulima, produkovanim i od strane samih mBM-MSC, sinergizam u signalnoj transdukciji sa faktorima koji deluju parakrino takođe bi trebalo da bude ispitan. Ipak, dobijeni rezultati su u saglasnosti sa našim prethodnim nalazima da IL-17 pojačava fosforilaciju p38 MAPK u ukupnim ćelijama kostne srži (*Krstić i sar., 2009^a*), kao i sa nalazima drugih autora da je IL-17 indukovana proliferacija humanih BM-MSC regulisana aktivacijom MEK-ERK puta (*Huang i sar., 2009*). Što se tiče bFGF indukovanih signalnih puteva, analize su pokazale da ovaj faktor pojačava fosforilaciju kako p38, tako i ERK1/2

MAPK u mBM-MSC, kao i da aktivacija ovih signalnih molekula predstavlja važan signalni događaj u bFGF indukovanoj proliferaciji mBM-MSC. Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim nalazima koji ukazuju da je ERK MAPK važan signalni put u proliferaciji humanih BM-MSC indukovanoj od strane bFGF, s obzirom na to da je isključivanje ERK2 molekula dovoljno da značajno smanji proliferaciju humanih BM-MSC, dovodeći do zastoja u G0/G1 fazi ćelijskog ciklusa (*Cárcamo-Orive i sar., 2008; Levy i sar., 2008*). Iako je pokazano da je proliferacija različitih ćelijskih tipova, uključujući i fibroblaste, koja je stimulirana od strane bFGF, zavisna od aktivacije p38 MAPK (*Maher, 1999; Garcia-Maya i sar., 2006*), učešće ove MAPK u proliferativnom delovanju bFGF kod mišjih BM-MSC je prvi put pokazano u ovoj studiji. Slično tome je aktivacija p38 MAPK signalnog puta prethodno pokazana kod proliferacije pacovskih BM-MSC posredovane TNF- α (*Zhou i sar., 2006*).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su p38 i ERK MAP kinaze uključene u regulaciju proliferacije mBM-MSC, kao i da oba ispitivana faktora, IL-17 i bFGF, koriste ove MAPK signalne puteve u delovanju na proliferaciju mišjih BM-MSC. Takođe, dobijeni rezultati ukazuju da je signalizacija pokrenuta ovim faktorima dovela do povećane aktivacije zajedničkog signalnog molekula, p38 MAPK, koji je dodatno povećan u intenzitetu i trajanju kad se mBM-MSC istovremeno tretiraju sa IL-17 i bFGF. Iako regulatorni faktori koji pokreću iste signalne puteve uobičajeno deluju sinergistički, u slučajevima kada se signalni putevi koje indukuju različiti citokini međusobno preklapaju ili sustiču na zajedničkim nishodnim efektornim molekulima, može se očekivati i slaba sinergistička kooperacija između dva faktora ili čak njeno odsustvo. Shodno tome, može se pretpostaviti da slični mehanizmi prenosa signala igraju ulogu i u uočenom nedostatku združenog dejstva IL-17 i bFGF kako na rast CFU-F kolonija, tako i na proliferaciju mBM-MSC. Sličan nedostatak sinergizma između IL-17 i IL-1, uočen pri aktivaciji iNOS, je takođe objašnjen na ovaj način, na osnovu činjenice da ova dva citokina dele istu signalnu komponentu, TRAF6, u aktivaciji JNK/NF κ B puta (*Miljkovic i Trajkovic, 2004*).

Stvaranje povoljnih uslova mikrosredine za održavanje hematopoeze, putem sekrecije odgovarajućih solubilnih molekula, komponenti matriksa i/ili međućelijskim interakcijama, jedna je od glavnih uloga stromalnih ćelija kostne srži (*Dazzi i sar., 2006; Pontikoglou i sar., 2011*). Dexter je sa svojim saradnicima 70-ih godina prošlog

veka uspostavio sistem za dugotrajnu kultivaciju hematopoetskih ćelija kojim je uspješno održavao aktivnu hematopoezu u *in vitro* uslovima preko 6 meseci, kultivirajući hematopoetske ćelije zajedno sa slojem adherentnih stromalnih ćelija kostne srži (Dexter i sar., 1977). Ovaj metod dugotrajne kulture kostne srži (LTBMC) je kasnije široko prihvaćen i koristi se za ispitivanje bioloških karakteristika hematopoetskih ćelija *in vitro* (Petakov i sar., 1998; van Os i sar., 2008), kao i za ispitivanje kvaliteta stromalnih ćelija (Epperly i sar., 2005; Weisel i sar., 2006; Tujapukrkar i sar., 2012). Naime, stromalne ćelije se razlikuju u sposobnosti podržavanja hematopoeze i mali je procenat onih koji mogu da održe dovoljan broj primitivnih matičnih ćelija hematopoeze sposobnih za dugotrajno obnavljanje hematopoeze ozračenog miša (Wineman i sar., 1996), što predstavlja ultimativni test za detekciju najprimitivnijih hematopoetskih matičnih ćelija (eng. *marrow repopulating ability*, MRA). Da bi se sprečio preterani rast stromalnih ćelija, uobičajeno je da se stromalni sloj ozrači, mada za neke stromalne ćelijske linije to nije neophodno (van Os i sar., 2008). Mi smo u tu svrhu tretirali supkonfluentni sloj mBM-MSC mitomicinom C, prema ustaljenom protokolu naše laboratorije. Nakon postavljanja hematopoetskih ćelija, primitivne ćelije migriraju kroz stromalni sloj, nastanjujući nišu ispod stromalnih ćelija. Ove ćelije proliferišu u različitim vremenskim periodima, zavisno od stepena njihove primitivnosti, i već nakon sedam dana se pojavljuju kolonije zbijenih ćelija koje su tamne pod fazno-kontrastnim mikroskopom, dajući izgled kaldrme. Ćelije koje daju ove kolonije (CAFC) odgovaraju najranijim hematopoetskim prethodnicima u *in vivo* sistemima detekcije – CFU-S i MRA (Ploemacher i sar., 1989; Petakov i sar., 1998). Prisustvo ovih kolonija sedmog dana kokulture ukazuje na uspješno uspostavljanje LTBMC sistema sa našim mBM-MSC.

O uticaju IL-17 na hematopoezu se zna od samog početka njegovog izučavanja, kao i to da njegov efekat zahteva prisustvo akcesornih ćelija. Fossiez i saradnici su pokazali da IL-17 u prisustvu fibroblasta indukuje proliferaciju humanih CD34⁺ ćelija kostne srži *in vitro*, kao i njihovo sazrevanje u granulocite (Fossiez i sar., 1996). Naša grupa je pokazala povećanje broja CFU-GM i BFU-E, a smanjenje CFU-E progenitora kod zdravih miševa nakon *in vitro* tretmana ukupnih ćelija kostne srži različitim dozama IL-17 (Jovčić i sar., 2001). U *in vivo* modelu, u kojem je genskim transferom komplementarne DNK mišjeg IL-17 prekomerno eksprimiran ovaj citokin, indukovana

je izražena stimulacija granulopoeze u slezini i kostnoj srži, sa povećanjem ukupnih leukocita, granulocita i njihovih prethodnika (uključujući i CFU-GM i CFU-GEMM), pri čemu je značajniji porast bio u slezini (*Schwarzenberger i sar., 1998*). Slično tome, u našem *in vivo* sistemu, nakon višestrukog intravenskog ubrizgavanja, IL-17 je doveo do značajnog povećanja ukupnih granulocita i CFU-GEMM progenitora u slezini i kostnoj srži i CFU-GM progenitora u slezini (*Krstić i sar., 2010*). U kokulturi humanih CD34⁺ ćelija sa MSC izolovanim iz humane kostne srži, nakon 5 dana kultivacije u prisustvu različitih koncentracija IL-17 (od 5 ng/ml do 100 ng/ml) došlo je do povećanja procenta BFU-E i CFU-GM kao i apsolutnog broja ukupnih CFC u odnosu na kokulture bez IL-17 (*Krstić i sar., 2009^b*). U našem istraživanju, koristeći *in vitro* sistem LTBMSC sa mBM-MSC koje su prethodno tretirane IL-17, želeli smo da isključimo direktan efekat IL-17 na hematopoetske ćelije i da ispitamo da li su potencijalni efekti na hematopoezu posledica uticaja ovog citokina na same MSC. Rezultati su pokazali da je u kokulturama sa IL-17 pretretiranim mBM-MSC, nakon 7 i 14 dana, ukupan broj hematopoetskih ćelija bio veći, kao i apsolutni broj CFU-GM i ukupnih CFC progenitora, ali i zrelijih prethodnika granulocitne loze, u odnosu na kokulture sa kontrolnim mBM-MSC. Ovi rezultati ukazuju da IL-17 čine mBM-MSC boljom potporom hematopoezi, pre svega granulopoezi, u poređenju sa mBM-MSC koje nisu prethodno tretirane ovim citokinom.

Azot monoksid je jedan od važnijih posrednika preko kojih IL-17 ostvaruje svoje efekte (*Miljkovic i Trajkovic, 2004*). Naše prethodne studije ukazuju na ulogu NO u efektima IL-17 na ćelije hematopoeze (*Bugarški i sar., 2004; Krstić i sar., 2009^a*). Osim toga, pokazano je da je NO efektorni molekul preko koga drugi proinflamatorni citokini utiču na imunomodulatorna svojstva MSC miša (*Ren i sar., 2008; Li i sar., 2012*). Zato je jedan od zadataka ovog istraživanja bio da se ispita uticaj IL-17 na ekspresiju iRNK dve izoforme NO sintaze, inducibilnu (iNOS) i endotelnu (eNOS), kao i na produkciju NO od strane mBM-MSC. Ekspresija iRNK obe ispitivane forme NOS je detektovana RT-PCR tehnikom. Niska količina NO detektovana je Grisovom reakcijom samo u dugotrajnim kokulturama sa ćelijama hematopoeze, dok je u kratkotrajnim kokulturama sa mitogenom stimulisanim limfocitima bila na granici senzitivnosti tehnike. IL-17 je dodatno stimulisao ekspresiju eNOS iRNK od strane mBM-MSC, dok ekspresija iRNK inducibilne forme NOS nije bila značajno izmenjena dejstvom ovog citokina, kao ni

produkcija NO u kokulturama sa hematopoetskim ćelijama. Slični rezultati su dobijeni i u našim ranijim istraživanjima u kojima je pokazano da IL-17 stimuliše ekspresiju iRNK za eNOS u ukupnim ćelijama kostne srži, dok u frakciji mononuklearnih ćelija dovodi do izraženijeg povećanja ekspresije iRNK za iNOS (Krstić i sar., 2009^a). Ti rezultati su u saglasnosti sa istraživanjima različitih autora koja pokazuju prevashodno ispoljavanje eNOS u stromalnim ćelijama kostne srži, a iNOS u mononuklearnim ćelijama i makrofagima (Angulo i sar., 1995; Helfrich i sar., 1997; Li i sar., 2002; Krasnov i sar., 2008). Iako je prisustvo eNOS pokazano u MSC humane adultne kostne srži (Helfrich i sar., 1997), kao i njeno ispoljavanje tokom osteogene diferencijacije MSC humane kostne srži kultivisanim na trodimenzionalnoj svilenoj podlozi (Damoulis i sar., 2007), ali i tokom diferencijacije mišjih multipotentnih progenitora u pravcu endotelnih ćelija *in vitro* (Liu i sar., 2007), uloga ove izoforme kao posrednika u efektima IL-17 na hematopoezu preko BM-MSC se mogla samo pretpostaviti. Naši rezultati koji pokazuju povećanje ekspresije iRNK za eNOS u mišjim BM-MSC pod uticajem IL-17 svakako idu u prilog toj pretpostavci, mada bi detaljnija ispitivanja uloge ovog enzima, uključujući i njegovu inaktivaciju upotrebom selektivnog inhibitora i/ili transgenog soja, bila neophodna radi definitivne potvrde.

Imunoregulatorna uloga MSC je jedna od značajnih karakteristika ovih ćelija koja pruža veliki broj mogućnosti za kliničku primenu. Uloga MSC u imunskom odgovoru se najčešće opisuje kao supresivna, ali može biti i stimulatorna u zavisnosti od različitih faktora mikrosredine, pre svega prisustva proinflamatornih citokina, hemokina i različitih TLR agonista (Waterman i sar., 2010; Krampera, 2011; Li i sar., 2012; English, 2013). Aktivacija od strane proinflamatornih citokina (IFN- γ , TNF- α , IL-1 α/β) ključan je korak u „licenciranju“ MSC da ispolje svoju imunoregulatornu ulogu (Krampera, 2011). Tako je, na primer, pokazano da kada proinflamatorni citokini nisu u stanju da izazovu dovoljnu produkciju NO od strane mišjih MSC, one dovode do stimulacije imenskog odgovora (Ren i sar., 2008; Li i sar., 2012). MSC kojima je suprimiran iNOS, bilo farmakološki ili genetički, stimulišu proliferaciju T limfocita *in vitro*, pojačavaju reakciju kasnog tipa preosetljivosti *in vivo* i inhibiraju rast melanoma. U nedostatku NO hemokini produkovani od strane MSC su ti koji doprinose njihovoj imunostimulatornoj aktivnosti. U CCR5^{-/-} i CXCR3^{-/-} miševima nije se ispoljio imunostimulatorni efekat iNOS-deficijentnih MSC. Naime, tokom MSC posredovane

imunosupresije u inflamaciji, hemokini privlače imunokompetentne ćelije u svoju okolinu, gde je visoka koncentracija NO koja je u stanju da suprimira efektorske ćelije. U nedostatku NO isti hemokini doprinose imunostimulatornoj aktivnosti MSC. Na sličan način je postignut imunostimulatorni potencijal i u humanim MSC, samo suprimiranjem gena zaIDO (*Li i sar., 2012*). Osim toga, različiti citokini i TLR ligandi mogu na različite načine da utiču na imunomodulatornu sposobnost MSC. English i saradnici su pokazali da dva proinflamatorna citokina, TNF- α i IFN- γ , različito utiču na mehanizme kojima mišje BM-MSCIspoljavaju svoje supresorno dejstvo na MLR i mitogenom stimulisanu proliferaciju limfocita (*English i sar., 2007*). Dok je sam IFN- γ doveo do povećanja ekspresije PD-L1 i IDO, oba citokina u kombinaciji su bila potrebna da bi povećali ekspresiju HGF, a sinergistički su delovala na povećanje ekspresije ciklooksigenaze-2. S druge strane, aktivacija TLR4 na MSC dovodi do ispoljavanja proinflamatornog fenotipa sa produkcijom IL-6, IL-8 i TGF- β (tzv. MSC1), dok aktivacija TLR3 dovodi do produkcije IL-10, IDO i PGE₂ od strane ovih antiinflamatornih MSC2 (*Waterman i sar., 2010*). Međutim, istovremena aktivacija TLR4 i TNFR1 odgovarajućim ligandima, LPS i TNF- α , dovodi do produkcije PGE₂ i alternativne aktivacije makrofaga koji produkuju IL-10 i ublažavaju posledice sepe u mišjem modelu ove bolesti (*Németh i sar., 2009*). Da odgovor MSC na TLR ligande može da bude različit, čak i kada se koriste MSC izolovane iz različitih tkiva istog davaoca, pokazali su Tomić i saradnici, koristeći MSC zubne pulpe (DP-MSCI) i zubnog folikula (DF-MSCI) (*Tomic i sar., 2011*). Oni su ustanovili da tretman TLR3 agonistom dovodi do povećanja imunosupresivne aktivnosti oba tipa MSC, dok TLR4 agonista povećava supresivni kapacitet DF-MSCI, ali i poništava imunosupresivni efekat DP-MSCI, inhibirajući produkciju TGF- β i ekspresiju IDO.

Iako je imunosupresivni efekat MSC pokazan u mišjim *in vitro* i *in vivo* modelima (*Sun i sar., 2003; Zappia i sar., 2005; English i sar., 2007; Ren i sar., 2008; Ren i sar., 2009; Carrión i sar., 2011; MacDonald i sar., 2011; Tuljapurkar i sar., 2012*), u našem sistemu, kada su korišćene ćelije CBA visokosrodnih miševa, nismo detektovali značajan uticaj mBM-MSCI na proliferaciju PHA stimulisanih mišjih slezinskih ćelija. Ista situacija je bila i u slučaju mBM-MSCI koje su kultivisane u prisustvu IL-17. Razumljivo, ni prisustvo inhibitora uobičajenih medijatora imunosupresivnog efekta MSC, NO i IDO, u ovim uslovima nije dalo nikakve rezultate. Razlog odsustva

imunomodulatornog uticaja mBM-MSC na mitogenom stimulisane singene ćelije slezine svakako treba podrobnije istražiti.

Imajući u vidu da smo u sličnim eksperimentima sa MSC izolovanim iz humanih tkiva (masnog tkiva, zubne pulpe, periferne krvi i Vartonove pihtije) pokazali njihovu supresivnu aktivnost na PBMC (*Trivanović i sar., 2013*), u cilju dalje provere imunomodulatorne sposobnosti mBM-MSC, određivan je i njihov efekat na humane limfocite. U navedenim uslovima, mBM-MSC su značajno suprimirale proliferaciju humanih PBMC u dvosmernoj MLR pri odnosu MSC i limfocita 1:10, kao i PHA stimulanu proliferaciju ovih ćelija pri odnosu 1:10 i 1:100, dok je proliferacija u MLR pri odnosu 1:100 bila veća u poređenju sa MLR bez mBM-MSC. Uticaj broja MSC na njihovu imunosupresivnu aktivnost je već od ranije poznata. Di Nicola i saradnici su 2002. godine pokazali da se inhibitorni efekat humanih BM-MSC na proliferaciju limfocita, stimulanu alogenim stimulusom ili poliklonским aktivatorima, povećava sa povećanjem doze MSC u kokulturi (*Di Nicola i sar., 2002*). Oni su, međutim, koristili relativno veliki broj MSC u odnosu na limfocite, počev od 1:5, pa čak do 10:1 u korist MSC. Le Blanc i sar. su potvrdili ovaj dozno zavisni efekat, ali su pokazali i da se u prisustvu malog broja MSC (1:100 do 1:10000 u odnosu na limfocite) imunosupresivni efekat humanih BM-MSC gubi ili čak dolazi do stimulacije proliferativnog odgovora respondera u MLR (*Le Blanc i sar., 2003*). Pored toga, Najar i saradnici su na modelu sa humanim MSC takođe pokazali značaj odnosa MSC prema T limfocitima za njihov imunosupresivni efekat (*Najar i sar., 2009*). Optimalan odnos MSC i ćelija respondera je varijabilan i zavisi od niza faktora kao što su eksperimentalni model i tkivno poreklo MSC, njihova prečišćenost, uslovi kultivacije i dr. (*Bifari i sar., 2010*). U našem modelu, optimalna supresija PHA stimulisane proliferacije PBMC je bila pri odnosu mBM-MSC prema PBMC 1:100. U istraživanjima naše grupe na MSC izolovanim iz različitih humanih tkiva, supresorni uticaj je pokazan pri različitim odnosima MSC prema PBMC u zavisnosti od tkiva iz kojeg su izolovane (*Trivanović i sar., 2013*).

Za sada možemo samo da spekuliramo o mogućim uzrocima različitog odgovora ćelija slezine miša u odnosu na humane PBMC. Različiti mehanizmi supresije mišjih i humanih limfocita, različita osetljivost mišjih slezinskih ćelija u odnosu na humane PBMC prema inhibitornim medijatorima produkovanim od strane mBM-MSC, veća heterogenost ćelija slezine u odnosu na PBMC ili različiti aktivacioni status ova dva tipa

respondera, samo su neka od mogućih objašnjenja. Indikativan je i relativno slab proliferativni odgovor samih ćelija slezine CBA miševa na stimulaciju PHA u kontrolnoj kulturi, čije uzroke treba istražiti u daljem radu. Kao što je već navedeno, imunomodulatorni efekat MSC zavisi od mnogih faktora, kao što su prisustvo inflamatornih citokina i hemokina (*Krampera i sar., 2006; Ren i sar., 2008*), različiti TLR agonisti (*DelaRosa i Lombardo, 2010; Waterman i sar., 2010*), stepen aktivacije limfocita (*Carrión i sar., 2011*), mitogen koji je korišćen za stimulaciju (*Le Blank i sar., 2003*) i dr. U mišjem sistemu, NO igra glavnu ulogu u supresiji proliferacije limfocita od strane MSC (*Sato i sar., 2007; Ren i sar., 2009; Li i sar., 2012*). Produkcija NO od strane MSC, s druge strane, zavisna je od prisustva aktiviranih T limfocita, tačnije proinflamatornih medijatora, na prvom mestu IFN- γ (*Krampera i sar., 2006; Oh i sar., 2007*). Na to ukazuju nalazi relativno visoke koncentracije NO u supernatantima kokultura MSC i aktiviranih T limfocita ($> 20 \mu\text{M}$), povratak nivoa proliferacije T limfocita na kontrolne vrednosti u prisustvu specifičnih inhibitora NOS, indukcija iNOS u MSC u prisustvu aktiviranih T limfocita i pod uticajem proinflamatornih medijatora i značajno smanjena imunosupresivna sposobnost MSC kod iNOS^{-/-} miševa (*Ozawa i sar., 2008; Ren i sar., 2009*). Imajući ovo u vidu, i pored pokazane genske ekspresije iNOS i eNOS u mBM-MSK, niske koncentracije NO, na granici detektabilnosti primenjenog testa, idu u prilog izostanku supresije ćelija slezine od strane mBM-MSK zapaženom u našim eksperimentima.

Sumirajući rezultate ovog istraživanja, može se reći da smo izolovali, umnožili i okarakterisali mišje mezenhimske matične ćelije kostne srži. Analizirali smo njihov proliferativni odgovor na dva regulatorna molekula, IL-17 i bFGF, i utvrdili signalne puteve preko kojih deluju. Pokazali smo da ove mBM-MSK imaju sposobnost održavanja hematopoeze u dugotrajnim kulturama i da IL-17 doprinosi toj sposobnosti, najverovatnije preko stimulacije produkcije NO indukcijom eNOS. Takođe smo pokazali da mBM-MSK mogu da suprimiraju proliferativni odgovor humanih PBMC na mitogen ili aloantigen, ali ne i proliferaciju singenih slezinskih ćelija. Dobijeni podaci ističu kompleksnost biologije MSC i njihove interakcije sa faktorima iz okoline, kao i specifičnost mišjih u odnosu na humane sisteme, otvarajući put za dalja istraživanja u cilju pronalaženja najboljih modaliteta potencijalne primene ovih ćelija u terapijske svrhe.

6.

ZAKLJUČCI

U skladu sa postavljenim ciljevima, a na osnovu dobijenih rezultata istraživanja, mogu se izvući sledeći zaključci:

- Mezenhimske matične ćelije su uspešno izolovane iz kostne srži miša CBA soja i okarakterisane na osnovu njihove učestalosti, klonogenog potencijala, morfoloških karakteristika, adhezivnosti, imunofenotipskih karakteristika, kinetike rasta, sposobnosti diferencijacije, sposobnosti podržavanja hematopoeze i imunomodulatornih karakteristika.
- Izolovane mBM-MSC imaju morfološke osobine koje odgovaraju adherentnim ćelijama i rastu formirajući diskretne kolonije (CFU-F) čija je učestalost u skladu sa literaturnim podacima za učestalost CFU-F u kostnoj srži miša.
- Izolovane mBM-MSC ispoljavaju markere karakteristične za mezenhimske ćelije.
- Prisustvo hematopoetskih ćelija isključeno je višestrukim pasažiranjem, odsustvom ispoljenosti hematopoetskih linijskih markera i odsustvom hematopoetskih progenitora u kulturama mBM-MSC.
- U odgovarajućim *in vitro* uslovima, mBM-MSC se diferenciraju u pravcu hondroblasta, osteoblasta, adipocita i miofibroblasta.
- Sposobnost mBM-MSC da podrže hematopoezu *in vitro* u sistemu dugotrajne kulture kostne srži se ogleda u formiranju kolonija sličnih kaldrmi, karakterističnih za rane hematopoetske prethodnike.
- Imunomodulatorni efekat mBM-MSC se ogleda u supresiji mitogenom stimulisane proliferacije humanih PBMC i alogantigenom stimulisane proliferacije u mešanoj kulturi humanih PBMC u prisustvu većeg broja mBM-MSC. Imunomodulatorni efekat mBM-MSC izostaje u kokulturi sa mitogenom stimulisanim singenim ćelijama slezine.

- U sklopu analize uticaja IL-17 na mBM-MSC došlo se do sledećih zaključaka:
 - Izolovane mBM-MSC eksprimiraju receptor za IL-17.
 - IL-17, sam i u kombinaciji sa bFGF, ne utiče na promenu ključnih karakteristika mBM-MSC, kao što su ispoljavanje karakterističnih mezenhimskih markera i kapacitet za višelinijnsku diferencijaciju (osteogenu i adipogenu).
 - IL-17, sam i u kombinaciji sa bFGF stimuliše proliferaciju mBM-MSC na dozno zavistan način. Kombinacija ova dva faktora, međutim, nema aditivni efekat na proliferaciju mBM-MSC.
 - IL-17 pozitivno utiče na sposobnost održavanja hematopoeze mBM-MSC, što se manifestuje povećanjem ukupnog broja ćelija 7. i 14. dana kokulture hematopoetskih ćelija i IL-17 tretiranih mBM-MSC u odnosu na kokulturu sa netretiranim mBM-MSC, kao i povećanjem broja opredeljenih progenitora i morfološki prepoznatljivih prekursora granulocitne loze.
 - IL-17 ne utiče na imunomodulatornu sposobnost mBM-MSC u kokulturi sa mitogenom stimulisanim ćelijama slezine miša.
- Ispitivanjem mehanizama delovanja IL-17 na mBM-MSC došlo se do sledećih zaključaka:
 - Efekat IL-17 na proliferaciju mBM-MSC u značajnoj meri se ostvaruje aktivacijom p38 i ERK MAPK signalnih puteva. JNK MAPK i PTK signalizacija nemaju značajnu ulogu u efektima IL-17 na proliferaciju mBM-MSC.
 - IL-17 povećava konstitutivnu ekspresiju eNOS gena u mBM-MSC, dok nema uticaja na stepen ekspresije iNOS gena. Nivo produkcije NO od strane mBM-MSC je na donjoj granici detektabilnosti i IL-17 nema uticaja na njegovu produkciju.

7.

L I T E R A T U R A

- Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol.* 2002;71:1-8.
- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem.* 2003;278:1910-4.
- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005;105:1815-22.
- Akiyama K, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, Cai T, Chen W, Sun L, Shi S. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell.* 2012;10:544-55.
- Angulo I, Rodríguez R, García B, Medina M, Navarro J, Subiza JL. Involvement of nitric oxide in bone marrow-derived natural suppressor activity. Its dependence on IFN-gamma. *J Immunol.* 1995;155:15-26.
- Antonysamy MA, Fanslow WC, Fu F, Li W, Qian S, Troutt AB, Thomson AW. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. *J Immunol.* 1999;162:577-84.
- Anjos-Afonso F, Bonnet D. Prospective identification and isolation of murine bone marrow derived multipotent mesenchymal progenitor cells. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011;24:13-24.
- Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, Miller RH. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia.* 2009;57:1192-203.
- Barry FP, Murphy JM, English K, Mahon BP. Immunogenicity of adult mesenchymal stem cells: lessons from the fetal allograft. *Stem Cells Dev.* 2005;14:252-65.
- Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol.* 2002;30:42-8.

- Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963;197:452-4.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441:235-8.
- Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 2005;105:2214-9.
- Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res*. 2003;287:98-105.
- Bifari F, Pacelli L, Krampera M. Immunological properties of embryonic and adult stem cells. *World J Stem Cells*. 2010;2:50-60.
- Bugarski D, Krstić A, Vlaski M, Petakov M, Jovčić G, Stojanović N, Milenković P. Interleukine-17-induced inhibitory effect on late stage murine erythroid bone marrow progenitors. *Eur Cytokine Netw*. 2004;15:247-54.
- Bugarski D, Jovčić G, Katić-Radivojević S, Petakov M, Krstić A, Stojanović N, Milenković P. Hematopoietic changes and altered reactivity to IL-17 in *Syphacia obvelata*-infected mice. *Parasitol Int*. 2006;55:91-7.
- Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port*. 2007;32:103-10.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9:641-50.
- Cárcamo-Orive I, Tejados N, Delgado J, Gaztelumendi A, Otaegui D, Lang V, Trigueros C. ERK2 protein regulates the proliferation of human mesenchymal stem cells without affecting their mobilization and differentiation potential. *Exp Cell Res*. 2008;314:1777-88.

- Carrión F, Nova E, Luz P, Apablaza F, Figueroa F. Opposing effect of mesenchymal stem cells on Th1 and Th17 cell polarization according to the state of CD4+ T cell activation. *Immunol Lett.* 2011;135:10-6.
- Cesselli D, Beltrami AP, Rigo S, Bergamin N, D'Aurizio F, Verardo R, Piazza S, Klaric E, Fanin R, Toffoletto B, Marzinotto S, Mariuzzi L, Finato N, Pandolfi M, Leri A, Schneider C, Beltrami CA, Anversa P. Multipotent progenitor cells are present in human peripheral blood. *Circ Res.* 2009;104:1225-34.
- Chabannes D, Hill M, Merieau E, Rossignol J, Brion R, Soulillou JP, Anegon I, Cuturi MC. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood.* 2007;110:3691-4.
- Chabaud M, Page G, Miossec P. Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on macrophage inflammatory protein-3alpha production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines. *J Immunol.* 2001;167:6015-20.
- Charbord P, Livne E, Gross G, Häupl T, Neves NM, Marie P, Bianco P, Jorgensen C. Human bone marrow mesenchymal stem cells: a systematic reappraisal via the genostem experience. *Stem Cell Rev.* 2011;7:32-42.
- Cheng L, Qasba P, Vanguri P, Thiede MA. Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *J Cell Physiol.* 2000;184:58-69.
- Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006;107:367-72.
- Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA Jr, Orellana MD, Freitas MC, Neder L, Santos AR, Peres LC, Jamur MC, Zago MA. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol.* 2008;36:642-54.
- Cua DJ, Tato CM. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:479-89.

- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119:2204-13.
- Damoulis PD, Drakos DE, Gagari E, Kaplan DL. Osteogenic differentiation of human mesenchymal bone marrow cells in silk scaffolds is regulated by nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1117:367-76.
- Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev.* 2006;20:161-71.
- Dazzi F, Krampera M. Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011;24:49-57.
- Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* 2000;28:875-84.
- DelaRosa O, Lombardo E. Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. *Mediators Inflamm.* 2010;2010:865601.
- Delorme B, Ringe J, Gallay N, Le Vern Y, Kerboeuf D, Jorgensen C, Rosset P, Sensebé L, Layrolle P, Häupl T, Charbord P. Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. *Blood.* 2008;111:2631-5.
- Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol.* 1977;91:335-44.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002;99:3838-43.
- Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol.* 1999;107:275-81.

- Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 2003;102:3837-44.
- Dokić J, Tomić S, Marković M, Milosavljević P, Colić M. Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2013;43:1862-72.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-7.
- English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*. 2007;110:91-100.
- English K, Barry FP, Mahon BP. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunol Lett*. 2008;115:50-8.
- English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol*. 2013;91:19-26.
- Epperly MW, Cao S, Goff J, Shields D, Zhou S, Glowacki J, Greenberger JS. Increased longevity of hematopoiesis in continuous bone marrow cultures and adipocytogenesis in marrow stromal cells derived from Smad3(-/-) mice. *Exp Hematol*. 2005;33:353-62.
- Eslaminejad MB, Nikmahzar A, Taghiyar L, Nadri S, Massumi M. Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Dev Growth Differ*. 2006;48:361-70.
- Fändrich F, Lin X, Chai GX, Schulze M, Ganten D, Bader M, Holle J, Huang DS, Parwaresch R, Zavazava N, Binas B. Preimplantation-stage stem cells induce long-term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning. *Nat Med*. 2002;8:171-8.

- Fossiez F, Djossou O, Chomarar P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*. 1996;183:2593-603.
- Fossiez F, Banchereau J, Murray R, Van Kooten C, Garrone P, Lebecque S. Interleukin-17. *Int Rev Immunol*. 1998;16:541-51.
- Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974^a;2:83-92.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974^b;17:331-40.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976;4:267-74.
- Gaffen SL. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine*. 2008;43:402-7.
- Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:556-67.
- Garcia-Maya M, Anderson AA, Kendal CE, Kenny AV, Edwards-Ingram LC, Holladay A, Saffell JL. Ligand concentration is a driver of divergent signaling and pleiotropic cellular responses to FGF. *J Cell Physiol*. 2006;206:386-93.
- Ghannam S, Pène J, Moquet-Torcy G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol*. 2010;185:302-12.
- Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005;105:2821-7.

- Goodwin M, Sueblinvong V, Eisenhauer P, Ziats NP, LeClair L, Poynter ME, Steele C, Rincon M, Weiss DJ. Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells inhibit Th2-mediated allergic airways inflammation in mice. *Stem Cells*. 2011;29:1137-48.
- Gottschling S, Saffrich R, Seckinger A, Krause U, Horsch K, Miesala K, Ho AD. Human mesenchymal stromal cells regulate initial self-renewing divisions of hematopoietic progenitor cells by a beta1-integrin-dependent mechanism. *Stem Cells*. 2007;25:798-806.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:13625-30.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005;6:1123-32.
- Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011;9:12.
- Helfrich MH, Evans DE, Grabowski PS, Pollock JS, Ohshima H, Ralston SH. Expression of nitric oxide synthase isoforms in bone and bone cell cultures. *J Bone Miner Res*. 1997;12:1108-15.
- Hirata T, Osuga Y, Hamasaki K, Yoshino O, Ito M, Hasegawa A, Takemura Y, Hirota Y, Nose E, Morimoto C, Harada M, Koga K, Tajima T, Saito S, Yano T, Taketani Y. Interleukin (IL)-17A stimulates IL-8 secretion, cyclooxygenase-2 expression, and cell proliferation of endometriotic stromal cells. *Endocrinology*. 2008;149:1260-7.
- Huang W, La Russa V, Alzoubi A, Schwarzenberger P. Interleukin-17A: a T-cell-derived growth factor for murine and human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006;24:1512-8.
- Huang H, Kim HJ, Chang EJ, Lee ZH, Hwang SJ, Kim HM, Lee Y, Kim HH. IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling. *Cell Death Differ*. 2009;16:1332-43.

- Hung TY, Lin HC, Chan YJ, Yuan K. Isolating stromal stem cells from periodontal granulation tissues. *Clin Oral Investig*. 2012;16:1171-80.
- Ichii M, Oritani K, Yokota T, Nishida M, Takahashi I, Shirogane T, Ezoe S, Saitoh N, Tanigawa R, Kincade PW, Kanakura Y. Regulation of human B lymphopoiesis by the transforming growth factor-beta superfamily in a newly established coculture system using human mesenchymal stem cells as a supportive microenvironment. *Exp Hematol*. 2008;36:587-97.
- Infante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol*. 2000;165:6107-15.
- Inoue D, Numasaki M, Watanabe M, Kubo H, Sasaki T, Yasuda H, Yamaya M, Sasaki H. IL-17A promotes the growth of airway epithelial cells through ERK-dependent signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;347:852-8.
- Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol*. 1998;160:3513-21.
- Jovčić G, Bugarski D, Petakov M, Stanković J, Stojanović N, Milenković P. Effect of IL-17 on in vitro hematopoietic progenitor cells growth and cytokine release in normal and post-irradiated murine bone marrow. *Growth Factors*. 2001;19:61-71.
- Jovčić G, Bugarski D, Petakov M, Krstić A, Vlaski M, Stojanović N, Milenković P. In vivo effects of interleukin-17 on haematopoietic cells and cytokine release in normal mice. *Cell Prolif*. 2004;37:401-12.
- Jovčić G, Bugarski D, Krstić A, Vlaski M, Petakov M, Mojsilović S, Stojanović N, Milenković P. The effect of interleukin-17 on hematopoietic cells and cytokine release in mouse spleen. *Physiol Res*. 2007;56:331-9.
- Kao CY, Chen Y, Thai P, Wachi S, Huang F, Kim C, Harper RW, Wu R. IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways. *J Immunol*. 2004;173:3482-91.
- Katsumoto K, Shiraki N, Miki R, Kume S. Embryonic and adult stem cell systems in mammals: ontology and regulation. *Dev Growth Differ*. 2010;52:115-29.

- Katz Y, Nadiv O, Beer Y. Interleukin-17 enhances tumor necrosis factor alpha-induced synthesis of interleukins 1,6, and 8 in skin and synovial fibroblasts: a possible role as a "fine-tuning cytokine" in inflammation processes. *Arthritis Rheum.* 2001;44:2176-84.
- Kennedy J, Rossi DL, Zurawski SM, Vega F Jr, Kastelein RA, Wagner JL, Hannum CH, Zlotnik A. Mouse IL-17: a cytokine preferentially expressed by alpha beta TCR+ CD4-CD8-T cells. *J Interferon Cytokine Res.* 1996;16:611-7.
- Koç ON, Gerson SL, Cooper BW, Dyhouse SM, Haynesworth SE, Caplan AI, Lazarus HM. Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2000;18:307-16.
- Kocić J, Santibañez JF, Krstić A, Mojsilović S, Dorđević IO, Trivanović D, Ilić V, Bugarski D. Interleukin 17 inhibits myogenic and promotes osteogenic differentiation of C2C12 myoblasts by activating ERK1,2. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823:838-49.
- Kong QF, Sun B, Bai SS, Zhai DX, Wang GY, Liu YM, Zhang SJ, Li R, Zhao W, Sun YY, Li N, Wang Q, Peng HS, Jin LH, Li HL. Administration of bone marrow stromal cells ameliorates experimental autoimmune myasthenia gravis by altering the balance of Th1/Th2/Th17/Treg cell subsets through the secretion of TGF-beta. *J Neuroimmunol.* 2009;207:83-91.
- Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006;24:386-98.
- Krampera M. Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. *Leukemia.* 2011;25:1408-14.
- Krasnov P, Michurina T, Packer MA, Stasiv Y, Nakaya N, Moore KA, Drazan KE, Enikolopov G. Neuronal nitric oxide synthase contributes to the regulation of hematopoiesis. *Mol Med.* 2008;14:141-9.

- Krishnappa V, Boregowda SV, Phinney DG. The peculiar biology of mouse mesenchymal stromal cells--oxygen is the key. *Cytotherapy*. 2013;15:536-41.
- Krstić A, Ilić V, Mojsilović S, Jovčić G, Milenković P, Bugarski D. p38 MAPK signaling mediates IL-17-induced nitric oxide synthase expression in bone marrow cells. *Growth Factors*. 2009^a;27:79-90.
- Krstić A, Vlaski M, Hammoud M, Chevaleyre J, Duchez P, Jovčić G, Bugarski D, Milenković P, Bourin P, Boiron JM, Praloran V, Ivanović Z. Low O₂ concentrations enhance the positive effect of IL-17 on the maintenance of erythroid progenitors during co-culture of CD34⁺ and mesenchymal stem cells. *Eur Cytokine Netw*. 2009^b;20:10-6.
- Krstić A, Santibanez JF, Okić I, Mojsilović S, Kocić J, Jovčić G, Milenković P, Bugarski D. Combined effect of IL-17 and blockade of nitric oxide biosynthesis on haematopoiesis in mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010;199:31-41.
- Krstic A, Mojsilovic S, Jovcic G, Bugarski D. The potential of interleukin-17 to mediate hematopoietic response. *Immunol Res*. 2012;52:34-41.
- La Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Loria T, Lo Iacono M, Di Stefano A, Giannuzzi P, Marasà L, Cappello F, Zummo G, Farina F. Isolation and characterization of Oct-4⁺/HLA-G⁺ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol*. 2009;131:267-82.
- Lajtha LG. Haemopoietic stem cells: concept and definitions. *Blood Cells*. 1979;5:447-55.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005;201:233-40.
- Larson BL, Ylöstalo J, Prockop DJ. Human multipotent stromal cells undergo sharp transition from division to development in culture. *Stem Cells*. 2008;26:193-201.

- Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol.* 2003;57:11-20.
- Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell.* 2009;5:54-63.
- Lee SJ, Lee EJ, Kim SH, Choi I, Lee DM, Lee HJ, Yoon D, Chun T. IL-17A promotes transdifferentiation of mouse myoblast cells (C2C12) into adipocytes by increasing the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ through CAAT/enhancer binding protein β signaling. *Biotechnol Lett.* 2011;33:229-35.
- LeGrand A, Fermor B, Fink C, Pisetsky DS, Weinberg JB, Vail TP, Guilak F. Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. *Arthritis Rheum.* 2001;44:2078-83.
- Levy O, Dvir T, Tsur-Gang O, Granot Y, Cohen S. Signal transducer and activator of transcription 3-A key molecular switch for human mesenchymal stem cell proliferation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40:2606-18.
- Li H, Wallerath T, Förstermann U. Physiological mechanisms regulating the expression of endothelial-type NO synthase. *Nitric Oxide.* 2002;7:132-47.
- Li W, Ren G, Huang Y, Su J, Han Y, Li J, Chen X, Cao K, Chen Q, Shou P, Zhang L, Yuan ZR, Roberts AI, Shi S, Le AD, Shi Y. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ.* 2012;19:1505-13.
- Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med.* 2006;203:2271-9.

- Lindén A, Laan M, Anderson GP. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. *Eur Respir J.* 2005;25:159-72.
- Liu Z, Jiang Y, Hao H, Gupta K, Xu J, Chu L, McFalls E, Zweier J, Verfaillie C, Bache RJ. Endothelial nitric oxide synthase is dynamically expressed during bone marrow stem cell differentiation into endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H1760-5.
- Ma CS, Chew GY, Simpson N, Priyadarshi A, Wong M, Grimbacher B, Fulcher DA, Tangye SG, Cook MC. Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. *J Exp Med.* 2008;205:1551-7.
- MacDonald GI, Augello A, De Bari C. Role of mesenchymal stem cells in reestablishing immunologic tolerance in autoimmune rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* 2011;63:2547-57.
- Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón IM, Nepomnaschy I, Costa H, Cañones C, Raiden S, Vermeulen M, Geffner JR. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One.* 2010;5:e9252.
- Maher P. p38 mitogen-activated protein kinase activation is required for fibroblast growth factor-2-stimulated cell proliferation but not differentiation. *J Biol Chem.* 1999;274:17491-8.
- Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol.* 1998;176:57-66.
- Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res.* 2000;9:841-8.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest.* 1999;103:697-705.
- Marks BR, Craft J. Barrier immunity and IL-17. *Semin Immunol.* 2009;21:164-71.

- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981;78:7634-8.
- Maximow A. Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematologica*. 1909;8:125-34.
- Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004;103:4619-21.
- Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466:829-34.
- Miljkovic D, Trajkovic V. Inducible nitric oxide synthase activation by interleukin-17. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004;15:21-32.
- Mojsilović S, Krstić A, Ilić V, Okić-Đorđević I, Kocić J, Trivanović D, Santibañez JF, Jovčić G, Bugarski D. IL-17 and FGF signaling involved in mouse mesenchymal stem cell proliferation. *Cell Tissue Res*. 2011;346:305-16.
- Moll G, Jitschin R, von Bahr L, Rasmusson-Duprez I, Sundberg B, Lönnies L, Elgue G, Nilsson-Ekdahl K, Mougiakakos D, Lambris JD, Ringdén O, Le Blanc K, Nilsson B. Mesenchymal stromal cells engage complement and complement receptor bearing innate effector cells to modulate immune responses. *PLoS One*. 2011;6:e21703.
- Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006;441:1068-74.
- Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003;14:155-74.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136:2348-57.

- Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M, Hotta T, Ando K. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*. 2006;107:1878-87.
- Muraglia A, Cancedda R, Quarto R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci*. 2000;113:1161-6.
- Nadri S, Soleimani M, Hosseni RH, Massumi M, Atashi A, Izadpanah R. An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Dev Biol*. 2007;51:723-9.
- Najar M, Rouas R, Raicevic G, Boufker HI, Lewalle P, Meuleman N, Bron D, Toungouz M, Martiat P, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6. *Cytherapy*. 2009;11:570-83.
- Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2006^a;177:2080-7.
- Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood*. 2006^b;108:2114-20.
- Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, Mezey E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009;15:42-9.

- Noort WA, Kruisselbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, Heemskerk MH, Löwik CW, Falkenburg JH, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol.* 2002;30:870-8.
- Novatchkova M, Leibbrandt A, Werzowa J, Neubüser A, Eisenhaber F. The STIR-domain superfamily in signal transduction, development and immunity. *Trends Biochem Sci.* 2003;28:226-9.
- Oh I, Ozaki K, Sato K, Meguro A, Tatara R, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Interferon-gamma and NF-kappaB mediate nitric oxide production by mesenchymal stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;355:956-62.
- O'Shea JJ, Steward-Tharp SM, Laurence A, Watford WT, Wei L, Adamson AS, Fan S. Signal transduction and Th17 cell differentiation. *Microbes Infect.* 2009;11:599-611.
- Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl.* 1988;10:63-76.
- Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp.* 1988;136:42-60.
- Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara Y, Kikuchi Y, Ito T, Okada T, Urabe M, Mizukami H, Kume A. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmun.* 2008;30:121-7.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005;6:1133-41.
- Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strom SC. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells.* 2008;26:300-11.

- Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*. 2004;103:1662-8.
- Petakov M, Jovčić G, Stojanović N, Bugarski D, Ivanović Z, Milenković P. Značaj testova za određivanje matičnih ćelija hematopoeze u transplantaciji. *Bilten za hematologiju*. 1998;26:1-6.
- Petakov M, Balint B, Bugarski D. Biologija matičnih ćelija hematopoeze. U: *Transfuziologija*. Aut. Balint B. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva. Beograd. I izdanje. 2004. Str. 497-524.
- Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem*. 1999;72:570-85.
- Phinney DG. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *J Cell Biochem*. 2012;113:2806-12.
- Phinney DG, Sensebé L. Mesenchymal stromal cells: misconceptions and evolving concepts. *Cytotherapy*. 2013;15:140-5.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-7.
- Ploemacher RE, van der Sluijs JP, Voerman JS, Brons NH. An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood*. 1989;74:2755-63.
- Polchert D, Sobinsky J, Douglas G, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, Genrich K, Mehrotra S, Setty S, Smith B, Bartholomew A. IFN-gamma activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *Eur J Immunol*. 2008;38:1745-55.
- Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebé L, Papadaki HA. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cell Rev*. 2011;7:569-89.

- Prowse KR, Greider CW. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 May;92:4818-22.
- Puel A, Cypowyj S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, Migaud M, Israel L, Chrabieh M, Audry M, Gumbleton M, Toulon A, Bodemer C, El-Baghdadi J, Whitters M, Paradis T, Brooks J, Collins M, Wolfman NM, Al-Muhsen S, Galicchio M, Abel L, Picard C, Casanova JL. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science*. 2011;332:65-8.
- Rahman MS, Yamasaki A, Yang J, Shan L, Halayko AJ, Gounni AS. IL-17A induces eotaxin-1/CC chemokine ligand 11 expression in human airway smooth muscle cells: role of MAPK (Erk1/2, JNK, and p38) pathways. *J Immunol*. 2006;177:4064-71.
- Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 2006;312:2169-79.
- Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2:141-50.
- Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'huillie A, Zhang J, Lu Y, Roberts AI, Ji W, Zhang H, Rabson AB, Shi Y. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells*. 2009;27:1954-62.
- Reynolds JM, Angkasekwinai P, Dong C. IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21:413-23.
- Rodríguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Meseguer L, Ramírez MC, Blanquer M, Marín N, Martínez S, Moraleda JM. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J*. 2011;44:800-6.
- Romieu-Mourez R, François M, Boivin MN, Bouchentouf M, Spaner DE, Galipeau J. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *J Immunol*. 2009;182:7963-73.
- Roufosse CA, Direkze NC, Otto WR, Wright NA. Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36:585-97.

- Rouvier E, Luciani MF, Mattéi MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol.* 1993;150:5445-56.
- Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC. In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. *Stem Cells.* 2010;28:788-98.
- Russell KC, Lacey MR, Gilliam JK, Tucker HA, Phinney DG, O'Connor KC. Clonal analysis of the proliferation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells as a function of potency. *Biotechnol Bioeng.* 2011;108:2716-26.
- Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells.* 2010;28:585-96.
- Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood.* 2007;109:228-34.
- Sato Y, Araki H, Kato J, Nakamura K, Kawano Y, Kobune M, Sato T, Miyanishi K, Takayama T, Takahashi M, Takimoto R, Iyama S, Matsunaga T, Ohtani S, Matsuura A, Hamada H, Niitsu Y. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood.* 2005;106:756-63.
- Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature.* 2006;441:1075-9.
- Schwarzenberger P, La Russa V, Miller A, Ye P, Huang W, Zieske A, Nelson S, Bagby GJ, Stoltz D, Mynatt RL, Spriggs M, Kolls JK. IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. *J Immunol.* 1998;161:6383-9.
- Schwarzenberger P, Huang W, Ye P, Oliver P, Manuel M, Zhang Z, Bagby G, Nelson S, Kolls JK. Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J Immunol.* 2000;164:783-9.

- Schwarzenberger P, Kolls JK. Interleukin 17: an example for gene therapy as a tool to study cytokine mediated regulation of hematopoiesis. *J Cell Biochem Suppl.* 2002;38:88-95.
- Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells.* 2008;26:212-22.
- Sengers BG, Dawson JI, Oreffo RO. Characterisation of human bone marrow stromal cell heterogeneity for skeletal regeneration strategies using a two-stage colony assay and computational modelling. *Bone.* 2010;46:496-503.
- Shen F, Gaffen SL. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine.* 2008;41:92-104.
- Shen F, Li N, Gade P, Kalvakolanu DV, Weibley T, Doble B, Woodgett JR, Wood TD, Gaffen SL. IL-17 receptor signaling inhibits C/EBPbeta by sequential phosphorylation of the regulatory 2 domain. *Sci Signal.* 2009;2:ra8.
- Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol.* 2011;164:1-8.
- Shin JH, Shin DW, Noh M. Interleukin-17A inhibits adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells and regulates pro-inflammatory responses in adipocytes. *Biochem Pharmacol.* 2009;77:1835-44.
- Shiota M, Heike T, Haruyama M, Baba S, Tsuchiya A, Fujino H, Kobayashi H, Kato T, Umeda K, Yoshimoto M, Nakahata T. Isolation and characterization of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells with myogenic and neuronal properties. *Exp Cell Res.* 2007;313:1008-23.
- Silva WA Jr, Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JL, Zanette DL, Santos AR, Zago MA. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2003;21:661-9.
- Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Physiol.* 1963;62:327-36.

- Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2005;203:398-409.
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells.* 2006^a;24:74-85.
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006^b;24:462-71.
- Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med.* 2007;13:139-45.
- Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH, Mao N. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells.* 2003;21:527-35.
- Sung JH, Yang HM, Park JB, Choi GS, Joh JW, Kwon CH, Chun JM, Lee SK, Kim SJ. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplant Proc.* 2008;40:2649-54.
- Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications. *Placenta.* 2011;32:S311-5.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126:663-76.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282:1145-7.
- Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* 1961;14:213-22.
- Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1964;51:29-36.

- Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, Navarrete C, Dazzi F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia*. 2007;21:1992-9.
- Tögel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2005;289:F31-42.
- Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, Panoskaltsis Mortari A, McElmurry RT, Bell S, Xia L, Zhou N, Riddle M, Schroeder TM, Westendorf JJ, McIvor RS, Hogendoorn PC, Szuhai K, Oseth L, Hirsch B, Yant SR, Kay MA, Peister A, Prockop DJ, Fibbe WE, Blazar BR. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2007;25:371-9.
- Tomic S, Djokic J, Vasilijic S, Vucevic D, Todorovic V, Supic G, Colic M. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. *Stem Cells Dev*. 2011;20:695-708.
- Trajkovic V, Stosic-Grujicic S, Samardzic T, Markovic M, Miljkovic D, Ramic Z, Mostarica Stojkovic M. Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase activation in rodent astrocytes. *J Neuroimmunol*. 2001;119:183-91.
- Trivanović D, Mojsilović S, Ilić V, Krstić J, Jauković A, Okić-Djordjević I, Santibanez JF, Jovčić G, Bugarski D. Immunomodulatory capacity of human mesenchymal stem cells isolated from adipose tissue, dental pulp, peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Centr Eur J Immunol* 2013;38:421-9.
- Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res*. 2004;295:395-406.
- Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*. 2008;26:591-9.

- Tuljapurkar SR, Jackson JD, Brusnahan SK, O’Kane BJ, Sharp JG. Characterization of a mesenchymal stem cell line that differentiates to bone and provides niches supporting mouse and human hematopoietic stem cells. *Stem Cell Discov.* 2012;2:5-14.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 2006;36:2566-73.
- Valenti MT, Dalle Carbonare L, Donatelli L, Bertoldo F, Zanatta M, Lo Cascio V. Gene expression analysis in osteoblastic differentiation from peripheral blood mesenchymal stem cells. *Bone.* 2008;43:1084-92.
- van Os RP, Dethmers-Ausema B, de Haan G. In vitro assays for cobblestone area-forming cells, LTC-IC, and CFU-C. *Methods Mol Biol.* 2008;430:143-57.
- Vater C, Kasten P, Stiehler M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater.* 2011;7:463-77.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity.* 2006;24:179-89.
- Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005;33:1402-16.
- Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One.* 2010;5:e10088.
- Weisel KC, Gao Y, Shieh JH, Moore MA. Stromal cell lines from the aorta-gonadomesonephros region are potent supporters of murine and human hematopoiesis. *Exp Hematol.* 2006;34:1505-16.
- Wineman J, Moore K, Lemischka I, Müller-Sieburg C. Functional heterogeneity of the hematopoietic microenvironment: rare stromal elements maintain long-term repopulating stem cells. *Blood.* 1996;87:4082-90.

- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 2000;61:364-70.
- Wright JF, Guo Y, Quazi A, Luxenberg DP, Bennett F, Ross JF, Qiu Y, Whitters MJ, Tomkinson KN, Dunussi-Joannopoulos K, Carreno BM, Collins M, Wolfman NM. Identification of an interleukin 17F/17A heterodimer in activated human CD4⁺ T cells. *J Biol Chem.* 2007;282:13447-55.
- Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol.* 2010;7:164-74.
- Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, Rousseau AM, Painter SL, Comeau MR, Cohen JI, Spriggs MK. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity.* 1995^a;3:811-21.
- Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage RJ. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol.* 1995^b;155:5483-6.
- Yao Z, Spriggs MK, Derry JM, Strockbine L, Park LS, VandenBos T, Zappone JD, Painter SL, Armitage RJ. Molecular characterization of the human interleukin (IL)-17 receptor. *Cytokine.* 1997;9:794-800.
- Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med.* 2001;194:519-27.
- Ylöstalo J, Bazhanov N, Prockop DJ. Reversible commitment to differentiation by human multipotent stromal cells in single-cell-derived colonies. *Exp Hematol.* 2008;36:1390-402.
- Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood.* 2005;106:1755-61.

- Zhang Y, Adachi Y, Suzuki Y, Minamino K, Iwasaki M, Hisha H, Song CY, Kusafuka K, Nakano K, Koike Y, Wang J, Koh E, Cui Y, Li C, Ikehara S. Simultaneous injection of bone marrow cells and stromal cells into bone marrow accelerates hematopoiesis in vivo. *Stem Cells*. 2004;22:1256-62.
- Zhou FH, Foster BK, Zhou XF, Cowin AJ, Xian CJ. TNF-alpha mediates p38 MAP kinase activation and negatively regulates bone formation at the injured growth plate in rats. *J Bone Miner Res*. 2006;21:1075-88.
- Zhu J, Garrett R, Jung Y, Zhang Y, Kim N, Wang J, Joe GJ, Hexner E, Choi Y, Taichman RS, Emerson SG. Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells. *Blood*. 2007;109:3706-12.
- Zhu J, Paul WE. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res*. 2010;20:4-12.
- Zhu S, Pan W, Shi P, Gao H, Zhao F, Song X, Liu Y, Zhao L, Li X, Shi Y, Qian Y. Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis through TRAF3-mediated suppression of interleukin 17 receptor signaling. *J Exp Med*. 2010;207:2647-62.
- Zipori D. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells*. 2005;23:719-26.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7:211-28.

BIOGRAFIJA

Slavko Mojsilović je rođen u Beogradu 27. decembra 1974. godine, gde je završio osnovnu i srednju Medicinsku školu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je školske 1993/1994. godine, a diplomirao je 2001. godine sa prosečnom ocenom 8,31. Poslediplomske magistarske studije iz imunologije upisao je 2002. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, a magistarsku tezu pod nazivom „Modulatorni efekat IL-17 na diferencijaciju i funkciju humanih dendritičnih ćelija monocitnog porekla in vitro“, pod mentorstvom prof. dr Miodraga Čolića, odbranio je 4. jula 2007. godine na istom fakultetu. Specijalističke studije iz imunologije započeo je 2006. godine i u maju 2011. položio specijalistički ispit sa odličnom ocenom. Od 2003. godine do danas zaposlen je u Institutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu, gde je 2007. godine izabran u istraživačko zvanje istraživač saradnik. Učestvovao je na 5 projekata Ministarstva Republike Srbije nadležnog za nauku i 2 međunarodna projekta. Autor je ili koautor ukupno 68 bibliografskih jedinica, od čega 26 publikacija objavljenih u celini u časopisima indeksiranim u Institute of Science Index bazama podataka (SCI i SCIE). Član je Lekarske komore Srbije i Društva imunologa Srbije.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani Slavko Mojsilović

broj upisa _____

Izjavljujem

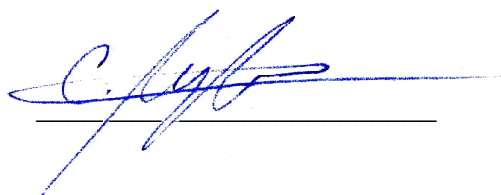
da je doktorska disertacija pod naslovom

„Uticaj interleukina-17 na mezenhimske matične ćelije u *in vitro* uslovima“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 24.03.2014. god.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Slavko Mojsilović

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada „Uticaj interleukina-17 na mezenhimske matične ćelije u *in vitro* uslovima“

Mentor Prof. dr Vladimir Trajković

Potpisani Slavko Mojsilović

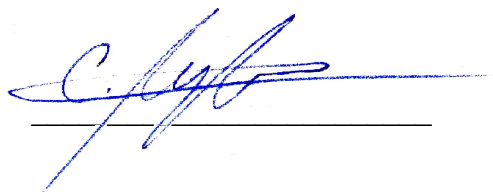
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktor nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 24.03.2014. god.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„Uticaj interleukina-17 na mezenhimske matične ćelije u *in vitro* uslovima“

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

- ①. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

U Beogradu, 24.03.2014. god.

