

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Hristina N. Obradović

FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA
PRIMARNIH MEZENHIMSKIH MATIČNIH
ĆELIJA U PROINFLAMATORNIM I
USLOVIMA IZMENJENE OKSIGENACIJE

Doktorska disertacija

Beograd, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Hristina N. Obradović

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF
PRIMARY MESENCHYMAL STEM CELLS
UNDER PROINFLAMMATORY AND
ALTERED OXYGENATION CONDITIONS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019.

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

dr Diana Bugarski, naučni savetnik

Institut za medicinska istraživanja

Univerzitet u Beogradu

dr Gordana Matić, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Jelena Krstić, viši naučni saradnik

Institut za medicinska istraživanja

Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Ova doktorska disertacija je u celini urađena u **Laboratoriji za eksperimentalnu hematologiju i matične ćelije Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu**, u okviru projekta „**Regenerativni i modulatorni potencijal adultnih matičnih ćelija**“ (OI 175062), čiji je rukovodilac dr Diana Bugarski, a koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Mami

ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost dugujem dr Diani Bugarski na pruženoj prilici da se pridružim njenom timu i na ukazanom poverenju i podstreku da se bavim ovom temom. Hvala na posvećenosti i strpljenju prilikom izrade ove doktorske disertacije.

Prof. dr Gordani Matić veliko hvala na pruženoj podršci i korisnim savetima tokom doktorskih studija i izrade ove doktorske disertacije. Zahvaljujem što me je naučila osnovama molekularne biologije i što je svojim znanjem, pristupačnošću, posvećenosti studentima kao i korisnim predavanjima uticala na mene i moja saznanja tokom celokupnog studiranja.

Posebno sam i beskrajno zahvalna dr Jeleni Krstić, na nesebičnosti, strpljivosti i pomoći tokom realizacije mog prvog samostalnog projekta. Veliko hvala na zalaganju i optimizmu koji su motivišuće delovali na moj rad. Pod njenim nadzorom naučila sam kako da definišem istraživački problem, pronađem rešenje i objavim rezultate. Svojom stručnošću, entuzijazmom i savetima dala mi je podstrek za dalje usavršavanje.

Veliko hvala kolegama iz laboratorije Dr Ivani Okić, dr Drenki Trivanvić i dr Slavku Mojsiloviću koji su mi pružili veliku pomoć svojim znanjem i savetima tokom izrade ove doktorske teze. Na podsticajnim razgovorima, dostupnošću i pronalaženju rešenja kako bi se ova teza uobličila. Zahvaljujem se i doktorantu Anđeliji Petrović, dr Tamari Kukulj, dr Aleksandri Jauković i Snežani Marković na podršci i savetima i prijatnoj atmosferi u laboratoriji.

Naučnim savetnicima, dr Huanu Santibanjezu i dr Vesni Ilić dugujem veliku zahvalnost na korisnim stručnim savetima i sugestijama koji su značajno doprineli ovom istraživanju.

Zahvaljujem prof. dr Milanu Terziću što nam je obezbedio uzorke tkiva pupčanika za istraživanja sprovedena u okviru ove disertacije.

Ani Stančić, svojoj prijateljici i saputnici u nauci, zahvalna sam na savetima, razumevanju i pomoći tokom izrade ove disertacije i konstantnoj podršci koju mi zajedno sa Jelenom, Anjom, Stefanom, Marijanom C., Marijanom K., Milanom i Ivanom pruža i van laboratorije.

Najveću zahvalnost dugujem svom ocu i sestrama, na bezgraničnoj podršci i strpljenju. Svojoj mami koja me je uvek bodrila tokom studija i doprinela mojoj istrajnosti u svetu nauke, a kojoj posvećujem svoj uspeh i čija mi podrška puno nedostaje.

FUNKCIONALNA KARAKTERIZACIJA PRIMARNIH MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA U PROINFLAMATORNIM I USLOVIMA IZMENJENE OKSIGENACIJE

REZIME

Mezenhimske matične ćelije (MMC) deo su populacije multipotentnih matičnih ćelija prisutnih u mnogim adultnim tkivima gde učestvuju u održavanju homeostaze. Zahvaljujući sposobnosti samoobnove, potencijalu diferenciranja u specijalizovane ćelije mezodermnog porekla i imunomodulatornim svojstvima, ove nediferencirane ćelije karakteriše širok opseg potencijalne terapijske primene. Regenerativnom kapacitetu MMC doprinosi i sposobnost migracije do oštećenih tkiva gde učestvuju u njihovom obnavljanju što ove ćelije čini pogodnim za ćelijsku terapiju. Mezenhimske MC su do sada izolovane iz velikog broja adultnih tkiva i mnoge studije potvrdile su da njihov regenerativni potencijal u velikoj meri zavisi od izvora iz kojeg potiču. Prvobitno su izolovane iz kostne srži koja je do sada najčešće korišćen izvor MMC, međutim zbog invazivnih metoda izolacije i malog prinosa MMC, stvorena je potreba za alternativnim izvorima. Činjenica da su MMC izolovane i iz periferne krvi jedno je od značajnih otkrića iz ove oblasti i smatra se da ove ćelije najverovatnije vode poreklo iz kostne srži, međutim nije dovoljno poznato na koji način migriraju i bivaju privučene u oštećena tkiva. Poslednjih godina se kao povoljan izvor MMC sa potencijalnom primenom u regenerativnoj medicini sve češće pominju i perinatalna tkiva (pupčanik i placenta). Prednost pupčanika kao izvora MMC ogleda se u lakoj dostupnosti tkiva koje se smatra medicinskim otpadom, neinvazivnoj izolaciji ćelija i činjenici da su izolovane MMC po kapacitetu samoobnove i većoj ekspresiji markera pluripotentnost slične embrionalnim MC.

Iako se već nekoliko decenija MMC intenzivno istražuju, uprkos velikom doprinosu nauci i medicini, o njihovom ukupnom terapijskom potencijalu se još uvek nedovoljno zna. Trenutno nije poznat univerzalan mehanizam terapijskog delovanja MMC, a mnogobrojni nalazi sve više u poslednje vreme upućuju da ponašanje i uloge MMC zavise od konteksta mikrosredine u kojoj obitavaju i/ili deluju, kao mestu integracije spoljnih signala koji određuju sudbinu MMC i usmeravaju ih ka određenoj funkciji.

Stoga je bolje razumevanje efekata specifične mikrosredine na funkcije MMC od velikog značaja za optimizovanje uslova za njihovu uspešnu primenu.

Iako je pokazano da MMC imaju ključnu ulogu u obnavljanju oštećenog tkiva, u pitanju je dinamičan i kompleksan proces koji uključuje brojne koordinisane događaje, te su funkcije MMC u svim fazama tokom zarastanja oštećenog tkiva nedovoljno objašnjene. Povreda tkiva je povezana i sa procesom inflamacije i posledičnom produkcijom i akumulacijom proinflamatornih citokina. Interleukin 17 (IL-17), proinflamatorni citokin kojeg sintetišu infiltrirani Th17 limfociti, solubilni je faktor mikrosredine koji ima značajnu ulogu u inflamatornim bolestima kakve su autoimunske bolesti, metabolički poremećaji i kancer. Ovaj citokin učestvuje u regulaciji proinflamatornih procesa putem stimulacije sekrecije drugih proinfamatornih citokina, hemokina i antimikrobnih proteina, aktiviranjem brojnih signalnih puteva posredstvom transmembranskog receptora IL17RA u ciljnim ćelijama čije funkcije reguliše. Receptor za IL-17 je široko rasprostranjen, i njegova ekspresija zabeležena je i kod MMC. Iako je pokazano da ovaj citokin učestvuje u regulaciji proliferacije i diferencijacije matičnih ćelija kao i regrutovanja imunskih i MMC na mesta inflamacije, ipak se do sada malo zna o njegovoj ulozi u regulaciji migracije MMC iz periferne krvi i o mehanizmima uključenim u njihovu invaziju ciljnih tkiva.

Kiseonik (O_2) je osnovna komponenta mikrosredine neophodna za aktivnost i metabolizam ćelija, te je kontrolisanje oksigenacije vitalno za održavanje ćelijskih funkcija. Za razliku od laboratorijskih uslova u kojima se ćelije kultiviraju pri atmosferskoj koncentraciji od 21% O_2 , fiziološka koncentracija O_2 u tkivima se kreće od 0-14%. Dosadašnja istraživanja pokazala su da niska oksigenacija (hipoksija) ostvaruje različite efekte na hematopoetske matične ćelije, dok su svojstva MMC u ovakvim uslovima manje poznata. Ipak, do sada je ispitan uticaj hipoksije na proliferaciju, diferencijaciju, migraciju, preživljavanje kao i na fenotipske karakteristike MMC izolovanih iz adipoznog tkiva, kostne srži, dentalne pulpe, krvi pupčanika i drugih izvora. Oprečni rezultati dobijeni u različitim studijama ukazuju da je ova oblast još uvek nedovoljno istražena. U zavisnosti od tkiva i organa iz kojih potiču, različite koncentracije O_2 utiču na održavanje specifičnih osobina i funkcija MMC. U perinatalnim tkivima niske koncentracije O_2 predstavljaju značajan regulatorni faktor mikrosredine. Međutim, i pored velikog napretka u ovoj oblasti, još uvek nisu u

potpunosti razjašnjeni mehanizmi regulacije višestrukih funkcija i ukupnog terapijskog potencijala MMĆ izolovanih iz humanog pupčanika u zavisnosti od koncentracije O₂.

Cilj istraživanja ove disertacije bilo je ispitivanje efekata specifičnih uslova mikrosredine na funkcionalna svojstva primarnih MMĆ izolovanih iz periferne krvi (PK-MMĆ) i Vartonove sluzi humanog pupčanika (VS-MMĆ). MMĆ izolovane iz periferne krvi bile su primenjene za analizu uticaja proinflamatorne mikrosredine na regulaciju migratornog potencijala MMĆ, s obzirom da su cirkulirajuće MMĆ prisutne u sredini izloženoj inflamatornim faktorima; dok su na VS-MMĆ analizirani efekti fiziološke (3%) i „laboratorijske“ (21%) koncentracije O₂ s obzirom na njihovu hipoksičnu fiziološku nišu, kako bi se optimizovali uslovi za kultivaciju i umnožavanje MMĆ.

Karakterizacija izolovanih MMĆ izvedena je prema kriterijumima Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju putem određivanja sposobnosti adhezije za plastiku, ispitivanja ekspresije mezenhimskih i hematopoetskih površinskih i embrionalnih markera, kao i sposobnosti diferencijacije u osteogenu, adipogenu i hondrogenu lozu. U prvom delu ove doktorske disertacije, analizirana je uloga IL-17 u migraciji i mobilizaciji PK-MMĆ iz kolagena kao i ekspresija i aktivnost proteolitičkih enzima vanćelijskog matriksa uključenih u ove procese - urokinaze (uPA, od engl. *urokinase-type plasminogen activator*) i matriksnih metaloproteinaza (MMP). Pored toga, praćeni su i efekti IL-17 na sposobnost adhezije PK-MMĆ na endotelske ćelije kao i njihovu transendotelsku migraciju i adheziju za fibronektin. Analizirana je i organizacija citoskeleta tokom migratornih aktivnosti PK-MMĆ u prisustvu IL-17. Takođe, ispitani su i molekularni mehanizmi koji leže u osnovi efekata IL-17 na ispitana migratorna svojstva PK-MMĆ, analiziranjem učešća MAPK (od engl. *Mitogen Associated Protein Kinases*) signalnog puta. U okviru drugog dela ove doktorske disertacije, ispitivani su efekti različitih koncentracija O₂ na „matičnost“ i funkcionalne karakteristike VS-MMĆ. Za potrebe ovih eksperimenata, VS-MMĆ su kultivisane na 21% i 3% O₂ u određenim vremenskim periodima pri čemu su analizirani imunofenotip, proliferativni i klonogeni kapacitet, diferencijacioni potencijal, ćelijski ciklus i preživljavanje. U cilju ispitivanja efekata hipoksije na multipotentnost MMĆ, na molekularnom nivou ispitivana je ekspresija gena za transkripcione faktore koji regulišu „matičnost“, *NANOG*, *OCT4a*, *OCT4b*, *SOX2*. U kontekstu ispitivanja efekata na diferencijacioni

potencijal, analizirana je ekspresija gena za markere osteogeneze (alkalna fosfataza (ALP), osteokalcin (OCN) i RUNX2 (od engl. *Runt-related transcription factor 2*)), adipogeneze (PPAR γ (od engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) i LPL (od engl. *Lipoprotein lipase*)) i hondrogeneze (SOX-9 (od engl. (*Sex determining region Y*)-box 9) i kolagen-2 (COL-2)). Pored toga, određivani su efekti različitih koncentracija O₂ na migraciju i mobilizaciju ovih ćelija iz kolagenskih kapi i aktivaciju proteolitičkih enzima. Za ispitivanje molekularnih mehanizama delovanja na migraciju VS-MMĆ praćeno je ućešće MAPK i Wnt/ β *catenin* signalnih puteva.

Rezultati dobijeni u okviru ove doktorske disertacije potvrdili su mezenhimske karakteristike izolovanih MMĆ s obzirom da na osnovu sposobnosti adhezije za plastiku, ekspresije mezenhimskih uz istovremeno odsustvo hematopoetskih površinskih markera kao i sposobnosti diferencijacije u osteogenu, adipogenu i hondogenu lozu, zadovoljavaju kriterijume Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju. Dodatno je pokazano da izolovane ćelije eksprimiraju markere pluripotentnosti NANOG, OCT4, SOX-2 i SSEA4.

Rezultati dobijeni u sklopu prvog dela ovog istraživanja, pokazali su da IL-17 povećava migraciju PK-MMĆ kao i mobilizaciju iz kolagenskih kapi istovremeno indukujući ekspresiju uPA bez efekata na ekspresiju MMP. Povećanje ekspresije uPA posreduje povećanoj migraciji PK-MMĆ stimulisanom interleukinom-17 i to na način zavisen od aktivacije ERK1/2 MAPK. Takođe, rezultati su ukazali da IL-17 istovremeno sa povećanjem migracije PK-MMĆ, indukuje i polarizaciju ćelija putem reorganizacije aktinskih filamenata i γ - tubulina i lokalizaciju uPA u ćelijskim protruzijama. Pored toga, IL-17 povećava adheziju PK-MMĆ za endotelske ćelije i posledičnu transendotelsku migraciju. Uočeno je takođe da ovaj citokin stimuliše i adheziju PK-MMĆ za fibronektin i to na način zavisen od uPA.

U drugom delu ove disertacije, dobijeni rezultati pokazali su da kultivacija VS-MMĆ u hipoksićnim uslovima na 3% O₂ nema uticaja na njihovu morfologiju i imunofenotip, ali moduliše njihov diferencijacioni potencijal. Uočeno je da 3% O₂ pojaćava adipogenu i hondogenu, a smanjuje osteogenu diferencijaciju. Rezultati su takođe pokazali da hipoksićni uslovi poboljšavaju „matićnost” VS-MMĆ putem povećanja klonogenog i proliferativnog potencijala i ekspresije markera pluripotentnosti

NANOG, *OCT4* i *SOX2*. Pored toga, dobijeni rezultati ukazuju da 3% O₂ ne moduliše ćelijski ciklus, ali sprečava apoptozu VS-MMĆ. Takođe, uočeno je i da kultivacija i prekultivacija VS-MMĆ na 3% O₂ povećavaju migraciju i mobilizaciju ovih ćelija i pojačavaju aktivnost uPA i MMP-2. Dobijeni rezultati pokazali su i da ERK1/2 MAPK posreduje mobilizaciji iz kolagenskih kapi bez obzira na nivo O₂, dok je Wnt/*β-catenin* put aktiviran tokom migratornih procesa u standardnim uslovima.

Imajući u vidu predstavljene rezultate, može se zaključiti da periferna krv i humani pupčanik predstavljaju povoljne izvore za izolaciju MMĆ. Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji sugerišu da IL-17 može da funkcioniše kao hemotropni faktor za PK-MMĆ koji povećava ćelijsku mobilnost i ekspresiju uPA tokom inflamacije. Takođe, fizioloških 3% O₂ može da poboljša kvalitet VS-MMĆ, održavajući njihovu „matičnost” i povećavajući njihov migratorni potencijal te ovi rezultati upućuju da kultivisanje VS-MMĆ u uslovima koji vladaju u njihovoj prirodnoj mikrosredini mogu da obezbede postizanje boljeg kvaliteta uzorka za potencijalnu primenu u ćelijskoj terapiji.

KLJUČNE REČI: mezenhimske matične ćelije, periferna krv, pupčana vrpca, mikrosredina, interleukin-17, hipoksija, migracija, urokinaza, matičnost.

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Molekularna biologija ćelije

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF PRIMARY MESENCHYMAL STEM CELLS UNDER PROINFLAMMATORY AND ALTERED OXYGENATION CONDITIONS

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are part of the population of multipotent stem cells present in many adult tissues where they participate in maintaining of homeostasis. Due to their self-renewal capacity, differentiation potential into specialized cells of mesodermal origin and immunomodulatory features, these undifferentiated cells are characterized with wide range of potential therapeutic applications. Their ability to migrate towards damaged tissues where they participate in tissue repair, also contributes to their regenerative potential which makes them suitable for cell therapy. MSCs have so far been isolated from various adult tissues and many studies confirmed that MSCs' regenerative potential depends largely on the source which they originate from. They were originally isolated from bone marrow which has been the most commonly used source of MSCs so far, however due to invasive methods of isolation and low MSCs yield, there is a need for alternative sources of MSCs. The fact that these cells were isolated from peripheral blood is one of the significant discoveries in this area and it is believed that these MSCs are most likely to originate from bone marrow, but how they migrate and home to damaged tissues has not yet been elucidated completely. Perinatal tissues (umbilical cord and placenta) have been recently increasingly suggested as favourable sources of MSCs with potential applications in regenerative medicine. The advantage of umbilical cord as a source of MSCs is reflected in easy availability of tissue considered as medical waste, non-invasive cell isolation methods, and the fact that MSCs isolated from umbilical cord are similar to embryonic stem cells in the terms of self-renewal capacity and pluripotency markers' expression.

Eventhough MSCs have been extensively investigated for several decades, and despite their great contribution to science and medicine, their overall therapeutic potential is still poorly understood. Currently, there is no universal mechanism of MSCs' therapeutic action known, and many findings have recently suggested that behaviour and roles of MSCs depend on the context of microenvironment in which they

reside and/or act, as sites of integration of external cues that determine the fate of MSCs and govern them towards specific function. Therefore, a better understanding of the effects of specific environment on the MSCs' functions is of great importance for optimizing the conditions for their successful use.

Although MSCs have been shown to play a key role in tissue repair, it is a dynamic and complex process involving numerous coordinated events, and MSCs' functions at all stages during healing of damaged tissue are poorly explained. Tissue injury is also associated with inflammation and subsequent production and accumulation of proinflammatory cytokines. Interleukin-17 (IL-17), a proinflammatory cytokine secreted by infiltrated Th17 lymphocytes, is a soluble microenvironmental factor with significant role in inflammatory diseases such as autoimmune diseases, metabolic disorders and cancer. This cytokine participates in the regulation of proinflammatory processes by stimulating the secretion of other proinflammatory cytokines, chemokines and antimicrobial proteins, by activating various signaling pathways through transmembrane receptor IL17RA in target cells whose functions it regulates. IL-17RA is ubiquitously expressed and its expression has also been shown on MSCs. Although this cytokine has been shown to regulate proliferation and differentiation of stem cells, as well as recruitment of immune cells and MSCs to sites of inflammation, so far, little is known about its role in regulation of migration of MSCs from peripheral blood and the mechanisms involved in their tissue invasion.

Oxygen (O₂) is the main microenvironmental factor necessary for cell activity and metabolism, therefore oxygenation control is vital for maintaining cell functions. Unlike laboratory conditions in which cells are cultured at atmospheric oxygen level of 21%, the physiological levels of O₂ in tissues range from 0-14%. Previous studies have shown that low oxygenation (hypoxia) exerts different effects on hematopoietic stem cells, while the effects on MSCs' properties are less known. Nevertheless, the effects of hypoxia on proliferation, differentiation, migration, cell survival and phenotypic characteristic of MSCs isolated from adipose tissue, bone marrow, dental pulp, cord blood and other sources has been investigated so far. The conflicting results obtained in various studies indicate that this area is still under-explored. Depending on the tissue and organs from which they originate, different O₂ levels affect maintenance of specific properties and functions of MSCs. In perinatal tissues low O₂ levels represent an

important regulatory microenvironmental factor. However, despite a great progress in this area, the regulatory mechanisms of multiple functions and the overall therapeutic potential of MSCs from umbilical cord depending on O₂ levels have not yet been fully elucidated.

The main goal of this doctoral thesis was the investigation of the effects of specific microenvironmental conditions on functional features of primary MSCs isolated from peripheral blood (PB-MSCs) and Wharton's jelly of the human umbilical cord (WJ-MSCs). PB-MSCs were used to analyse the effect of the proinflammatory microenvironment on migratory potential of MSCs since these cells are circulating in the microenvironment exposed to inflammatory factors, while the effects of physiological (3%) and "laboratory" (21%) O₂ levels were investigated on WJ-MSCs given their naturally hypoxic niche, in order to optimize the cultivation and expanding conditions.

Characterization of isolated MSCs was performed according to the criteria of the International Society for Cellular Therapy by determining capability of MSCs to adhere to plastic, investigating the expression of mesenchymal and hematopoietic surface markers and embryonic markers, as well as the ability to differentiate to osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineages. The first part of this doctoral dissertation, analyses the role of IL-17 in migration and mobilization of PB-MSCs from collagen, as well as the expression and activity of the extracellular matrix proteolytic enzymes involved in these processes such as urokinase (urokinase-type plasminogen activator, uPA) and matrix metalloproteinases (MMP). Besides that, the effects of IL-17 on the adhesion of PB-MSCs to endothelial cells, as well as their transendothelial migration and adhesion to fibronectin were investigated. Moreover, cytoskeleton arrangement during migratory activities of PB-MSCs in presence of IL-17 was also analysed. The molecular mechanisms underlying the effects of IL-17 on the investigated migratory properties of PB-MSCs were examined by analysing the involvement of MAPK (Mitogen Associated Protein Kinases) signalling pathways. Within the second part of this doctoral thesis, the effects of different O₂ levels on stemness and functional characteristics of WJ-MSCs were investigated. For these experiments, WJ-MSCs were cultivated at 21% and 3% O₂ for specific periods of time and immunophenotype, proliferative and clonogenic capacity, differentiation potential, cell cycle and survival

were examined. In order to investigate the effects of hypoxia on the multipotency of WJ-MSCs on the molecular level, the expression of genes for transcriptional factors that regulate stemness was determined. In the context of examining the effects on differentiation potential, gene expression for markers of osteogenesis (alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN) and RUNX2 (Runt-related transcription factor 2)), adipogenesis (PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma) and lipoprotein lipase (LPL)) and chondrogenesis (SOX-9 (Sex determining region Y)-box 9) and collagen-2 (COL-2)) was analysed. Moreover, the effects of different O₂ levels on the migration and mobilization of these cells from collagen drops and the activation of proteolytic enzymes were determined. In order to examine molecular mechanisms underlying migratory processes of WJ-MSCs at different oxygen levels, the involvement of MAPK and Wnt/ β *catenin* signalling pathways was monitored.

The results obtained in this doctoral dissertation confirmed mesenchymal characteristics of the isolated MSCs since based on their ability to adhere to plastic, expression of mesenchymal with absence of hematopoietic surface markers, as well as ability for osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation they meet the proposed criteria. It is additionally shown that isolated MSCs express pluripotency markers NANOG, OCT4, SOX-2 and SSEA4.

The results obtained within the first part of the thesis showed that IL-17 enhances PB-MSCs migration and mobilization from collagen drops while inducing uPA expression without any effect on MMP expression. Increased uPA expression mediates increased migration of PB-MSC stimulated by IL-17 in an ERK1/2 MAPK dependent way. Also, the results indicated that concomitantly with stimulation of migration, IL-17 induces cell polarization through actin filament and γ - tubulin rearrangement and localization of uPA in cell protrusions. In addition, IL-17 increases PB-MSCs adhesion to endothelial cells and subsequent transendothelial migration. It is also noticed that this cytokine stimulates PB-MSCs adhesion to fibronectin in an uPA-dependent manner.

In the second part of this dissertation, the results obtained showed that the cultivation of WJ-MSCs under hypoxic conditions at 3% O₂ has no effect on their morphology and immunophenotype, but modulates their differentiation potential. It was observed that 3% O₂ enhances adipogenic and chondrogenic, and decreases osteogenic

differentiation. The results also showed that hypoxic conditions improve the stemness of WJ-MSCs by increasing the clonogenic and proliferative potential and the expression of the pluripotency markers *NANOG*, *OCT4* and *SOX2*. In addition, the results obtained indicate that 3% O₂ does not modulate the cell cycle but prevents apoptosis of WJ-MSCs. It was also noticed that cultivation and pre-cultivation of WJ-MSCs at 3% O₂ increase migration and mobilization of these cells and enhance the activity of uPA and MMP-2. Obtained results also showed that mobilization of WJ-MSCs from collagen drops is mediated by ERK1/2 MAPK regardless of O₂ levels, whereas the Wnt / β -catenin pathway is activated during migratory processes under standard conditions.

Presented results lead to conclusion that peripheral blood and human umbilical cord represent favourable sources of MSCs. The results obtained in this dissertation suggest that IL-17 may act as chemotropic factor for PB-MSCs that enhances cell mobility and uPA expression during inflammation. Also, physiological 3% O₂ can improve the quality of WJ-MSCs, by maintaining their stemness and increasing their migratory potential, therefore these results indicate that culturing of WJ-MSCs in their native microenvironmental conditions can ensure better sample quality for potential application in cell therapy.

KEYWORDS: mesenchymal stem cells, peripheral blood, umbilical cord, microenvironment, interleukin-17, hypoxia, migration, urokinase, stemness

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC SUBFIELD: Molecular biology of cell

Sadržaj

1. UVOD

1.1.	MEZENHIMSKE MATIČNE ČELIJE	1
1.1.1.	ISTORIJA RAZVOJA NAUKE O MATIČNIM ČELIJAMA	1
1.1.2.	POJAM MATIČNIH ČELIJA	4
1.1.3.	MEZENHIMSKE MATIČNE ČELIJE	7
1.1.3.1.	KARAKTERIZACIJA I IZVORI MMĆ	7
1.1.3.2.	FIZIOLOŠKA ULOGA I TERAPIJSKI POTENCIJAL MMĆ	10
1.1.3.3.	MEZENHIMSKE MATIČNE ČELIJE IZOLOVANE IZ PERIFERNE KRVI (PK-MMĆ)	16
1.1.3.4.	MEZENHIMSKE MATIČNE ČELIJE IZOLOVANE IZ VARTONOVE SLUZI HUMANOG PUPČANIK (VS-MMĆ)	17
1.2.	MIKROSREDINA MMĆ	21
1.2.1.	KONCEPT I DEFINICIJA NIŠE MMĆ	21
1.2.2.	SASTAV NIŠE	21
1.2.3.	BIOHEMIJSKA I BIOFIZIČKA REGULACIJA U NIŠI MĆ	22
1.2.4.	DINAMIKA I FLEKSIBILNOST NIŠE	24
1.2.5.	SPECIFIČNE MIKROSREDINE MĆ	25
1.2.5.1.	INFLAMACIJA	25
1.2.5.1.1.	INTERLEUKIN-17 FAMILIJA CITOKOINA	26
1.2.5.1.2.	STRUKTURA INTERLEUKINA-17 I NJEGOVOG RECEPTORA	27
1.2.5.1.3.	SIGNALNI PUTEVI AKTIVIRANI IL-17	28
1.2.5.1.4.	BIOLOŠKA ULOGA IL-17	30
1.2.5.2.	KISEONIK I HIPOKSIJA	31
1.2.5.2.1.	STRUKTURA FAKTORA KOJI REGULIŠU ODGOVOR NA SMANJENU OKSIGENACIJU	31
1.2.5.2.2.	MOLEKULARNA REGULACIJA ODGOVORA NA HIPOKSIJU POSREDOVANA FAKTOROM INDUKOVANIM HIPOKSIJOM	32
1.2.5.2.3.	BIOLOŠKI EFEKTI HIPOKSIJE	34

2. CILJEVI

3. MATERIJAL I METODE

3.1.	MATERIJAL	39
3.2.	EKSPERIMENTALNI DIZAJN	42
3.2.1.	IZOLACIJA I KARAKTERIZACIJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH ČELIJA IZ VARTONOVE SLUZI HUMANOG PUPČANIK (VS-MMĆ) I PERIFERNE KRVI (PK-MMĆ)	42
3.2.2.	ISPITIVANJE EFEKATA DELOVANJA IL-17 NA MIGRATORNA SVOJSTVA MMĆ PERIFERNE KRVI	43
3.2.3.	ISPITIVANJE EFEKATA DELOVANJA 3% O ₂ NA MULTIPOTENTNA I MIGRATORNA SVOJSTVA MMĆ VARTONOVE SLUZI PUPČANIK	44
3.3.	ČELIJE I ČELIJSKE KULTURE	45
3.3.1.	ČELIJSKE LINIJE	45
3.3.2.	IZOLACIJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH ČELIJA	45
3.3.2.1.	IZOLACIJA PK-MMĆ	45
3.3.2.2.	IZOLACIJA VS-MMĆ	46
3.3.3.	KULTIVACIJA ČELIJA	47
3.3.4.	ODREĐIVANJE BROJA I VIJABILNOSTI ČELIJA	48
3.4.	ANALIZA ČELIJSKIH FUNKCIJA	49
3.4.1.	ANALIZA PROLIFERACIJE ČELIJA	49
3.4.1.1.	MTT TEST	49
3.4.1.2.	ČELIJSKA PROLIFERACIJA U KRATKOTRAJNIM KULTURAMA	49
3.4.1.3.	ČELIJSKA PROLIFERACIJA U DUGOTRAJNIM KULTURAMA	49
3.4.1.4.	ANALIZA KLONOGENOG POTENCIJALA, CFU- F TEST	50
3.4.2.	DIFERENCIJACIJA ČELIJA	50

3.4.2.1.	OSTEOGENA DIFERENCIJACIJA	51
3.4.2.2.	ADIPOGENA DIFERENCIJACIJA	51
3.4.2.3.	HONDROGENA DIFERENCIJACIJA	52
3.4.3.	ANALIZA ČELJSKE MOBILNOSTI	52
3.4.3.1.	ANALIZA ČELJSKE MIGRACIJE <i>SCRATCH</i> TESTOM	52
3.4.3.2.	ANALIZA ČELJSKE MIGRACIJE ZASNOVANE NA <i>BOYDEN</i> -KOMORI	53
3.4.3.3.	ANALIZA ČELJSKE MOBILIZACIJE IZ KOLAGENA	54
3.4.4.	ANALIZA ČELJSKE ADHEZIJE	54
3.4.5.	ANALIZA ČELJSKOG CIKLUSA	55
3.4.6.	ANALIZA ČELJSKE SMRTI	56
3.5.	ANALIZA PROTEINA	56
3.5.1.	PROTOČNA CITOMETRIJA	56
3.5.2.	IMUNOFLUORESCENCA	57
3.5.3.	<i>WESTERN BLOT</i> ANALIZA EKSPRESIJE PROTEINA	57
3.5.4.	ANALIZA AKTIVNOSTI PROTEINA ZIMOGRAFIJOM	59
3.6.	ANALIZA EKSPRESIJE GENA	60
3.7.	STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA	62
4.	REZULTATI	
4.1.	IZOLACIJA, KULTIVACIJA I KARAKTERIZACIJA MMĆ	63
4.2.	EFEKTI MIKROSREDINE NA FUNKCIONALNA SVOJSTVA MMĆ	67
4.2.1.	EFEKTI I MEHANIZMI DELOVANJA IL-17 NA MULTIPOTENTNE MEZENHIMSKE MATIČNE ČELIJE IZ PERIFERNE KRVI	68
4.2.1.1.	EKSPRESIJA RECEPTORA ZA IL-17 NA PK-MMĆ	68
4.2.1.2.	EFEKAT IL-17 NA MIGRATORNI KAPACITET PK-MMĆ	68
4.2.1.3.	EFEKAT IL-17 NA PROLIFERACIJU PK-MMĆ	70
4.2.1.4.	SPECIFIČNOST ULOGE IL-17 U MIGRACIJI PK-MMĆ	71
4.2.1.5.	EFEKAT IL-17 NA REMODELOVANJE VČM TOKOM MIGRACIJE PK-MMĆ	72
4.2.1.5.1.	EFEKAT IL-17 NA EKSPRESIJU UPA KOD PK-MMĆ	72
4.2.1.5.2.	EFEKAT IL-17 NA EKSPRESIJU MMP KOD PK-MMĆ	74
4.2.1.5.3.	ULOGA UPA U MIGRACIJI INDUKOVANOJ INTERLEUKINOM-17	75
4.2.1.6.	MOLEKULARNI MEHANIZMI UKLJUČENI U MIGRACIJU PK-MMĆ STIMULISANU INTERLEUKINOM-17	77
4.2.1.7.	REORGANIZACIJA CITOSKELETA TOKOM MIGRACIJE INDUKOVANE IL-17	80
4.2.1.8.	EFEKAT IL-17 NA ADHEZIJU I TRANSENDOTELSKU MIGRACIJU PK-MMĆ	83
4.2.1.9.	EFEKAT IL-17 NA ADHEZIJU PK-MMĆ ZA FIBRONEKTIN	84
4.2.2.	EFEKTI IZMENJENE OKSIGENACIJE NA FUNKCIONALNA SVOJSTVA MEZENHIMSKIH MATIČNIH ČELIJA IZ VARTONOVE SLUZI PUPČANIK	87
4.2.2.1.	EKSPRESIJA HIF-1A KOD VS-MMĆ	87
4.2.2.2.	EFEKAT 3% O ₂ NA MEZENHIMSKI FENOTIP VS-MMĆ	88
4.2.2.3.	EFEKAT 3% O ₂ NA DIFERENCIJACIONI POTENCIJAL VS-MMĆ	90
4.2.2.4.	EFEKAT 3% O ₂ NA KLONOGENI POTENCIJAL VS-MMĆ	93
4.2.2.5.	EFEKAT 3% O ₂ NA VIJABILNOST I PROLIFERACIJU VS-MMĆ	94
4.2.2.6.	EFEKAT 3% O ₂ NA EKSPRESIJU MARKERA PLURIPOTENTNOSTI VS-MMĆ	96
4.2.2.7.	EFEKAT 3% O ₂ NA APOPTOZU I ČELJSKI CIKLUS VS-MMĆ	97
4.2.2.8.	EFEKAT RAZLIČITIH KONCENTRACIJA O ₂ NA MOBILNOST VS-MMĆ	98
4.2.2.9.	MEHANIZMI UKLJUČENI U MIGRACIJU I MOBILIZACIJU VS-MMĆ NA RAZLIČITIM KONCENTRACIJAMA O ₂	101
5.	DISKUSIJA	103
6.	ZAKLJUČCI	119
7.	LITERATURA	121
	SPISAK SKRAĆENICA	I

1. UVOD



1.1. MEZENHIMSKE MATIČNE ĆELIJE

1.1.1. Istorija razvoja nauke o matičnim ćelijama

Termin „matična ćelija“ (MĆ) nastao je krajem XIX veka u istraživanjima koja su se odnosila na kontinuitet „germinativne plazme“, razviće višćelijskog organizma i poreklo hematopoetskog sistema. *Ernst Haeckel* je smatrao da svaki organizam rekapitulira svoje filogenetske stadijume, i stoga je ontogenetska MĆ- oplođena jajna ćelija, odgovarajući entitet filogenetskoj MĆ (od nem. *Stamzelle*, izvorna ćelija) - jednoćelijskom organizmu (objašnjeno u *Dröscher, 2014; Maehle, 2011; Ramalho-Santos i Willenbring, 2007*). Međutim, sa novim saznanjima iz oblasti embriologije i genetike, pojavilo se nekoliko teorija o nasleđivanju i faktorima koji ga regulišu, te se tako postavio temelj za istraživanje potencijalnih tzv „nosioca“ materijala za ontogenezu. Jedno od tih istraživanja vodio je i *August Weismann* koji je upućujući na postojanje germinativnih i somatskih ćelija, pretpostavio da se nasleđivanje vrši samo pomoću germinativnih ćelija koje su nespecijalizovane i nosioci organizovane supstance ćelijskog nukleusa, tzv germinativne plazme (od nem, *Keimplasma*) (*Dröscher, 2014; Maehle, 2011*). Shodno toj teoriji, germinativna plazma se tokom citokineze kod deobe somatskih ćelija prenosi nejednako i dovodi do specijalizacije ćerki ćelija. Sa novim saznanjima, njegov koncept se blago menjao, ali se uvek zasnivao na postojanju faktora koji određuju i usmeravaju razvoj ćelije. *Theodor Boveri* i *Valentin Häcker* su, vodeći se *Weismann*-ovom teorijom, težili ka identifikovanju najranije germinativne ćelije koja je nosilac germinativne plazme . U tim istraživanjima su kao MĆ definisali zajedničku prekursorsku ćeliju koja u deobi daje identičnu matičnu ćerku ćeliju i jednu ćerku ćeliju koja je prekursor somatskim ćelijama (*Boveri, 1892; Häcker, 1892*). Ipak, danas se smatra da *Alexander Maximow* nosi zaslugu za uvođenje termina „matična ćelija“ u nauku u vreme kada se među hematolozima vodila polemika da li svi tipovi ćelija krvi vode poreklo od zajedničke ćelije (*Maehle, 2011*). *Maximow* je razvio i uveo teoriju o procesu hematopoeze na kojoj je baziran današnji koncept porekla i diferencijacije ćelija krvi. Međutim, ovaj termin se može naći i u ranijim studijama *Pappenheim-a* koji je na taj način opisao prekursorsku ćeliju od koje mogu nastati mijelociti i limfociti (objašnjeno u *Maehle, 2011*). Ipak, zbog ograničenja koje su pružale tadašnje metode,

UVOD

ova debata nastavila se do sredine XX veka, kada su konačne dokaze pružila mnogobrojna eksperimentalna istraživanja.

Jedno od značajnih dostignuća u ovoj oblasti kojim je podržana teorija o postojanju hematopoetske MĆ (HMC), jeste prvo uspešno presađivanje kostne srži bez odbacivanja transplanta. Naime, kasnih 1950-ih godina uspešno je pacijentu koji boluje od leukemije, prethodno tretiranom radioterapijom, presađena kostna srž identičnog brata blizanca (*Thomas i sar., 1959*), a ozračenim naučnicima 1958. godine izvršena je prva alogena transplantacija kostne srži (objašnjeno u *Jansen, 2005*). U narednom periodu usledio je niz ključnih otkrića. *Joseph Altman* je 1962. godine pokazao da se u mozgu stvaraju nove nervne ćelije što je ukazalo na postojanje MĆ (*Altman i Das, 1967*), međutim njegova studija je bila široko ignorisana u naučnoj zajednici u korist istraživanja koja su pokazala da je neurogeneza ograničena na prenatalni razvoj. S druge strane, *Becker, Till* i *McCulloch* su u istom periodu prvi eksperimentalno dokazali postojanje HMC, pruživši dokaze o sposobnosti MĆ za samoobnovu i diferencijaciju u specijalizovane ćelije. Ova istraživanja pokazala su da ćelija izolovana iz kostne srži može da regeneriše sve krvne ćelije i spasi miševе ozračene letalnom dozom zračenja i to jednostavnom infuzijom ćelija donora u krv primaoca (*A. J. Becker i sar., 1963*). Štaviše, u slezinama ovih miševa uočili su postojanje čvorića čiji je broj bio proporcionalan broju ćelija primljenih iz kostne srži- svaki čvorić je kolonija jedne HMC ili „jedinice formiranja kolonija“ (CFU, od engl. *colony-forming unit*) (*Till i McCulloch, 1961*), što je bio prvi klonalni ogled, ali i kvantitativni test koji se još uvek koristi za indirektno određivanje broja HMC. Prvoj uspešnoj transplantaciji kostne srži pacijentu sa teškom kombinovanom imunodeficijencijom, i to od donora koji je u srodstvu, a ne poseduje identičan genski sklop (*Good, 1987*) doprinelo je saznanje da je za transplantaciju ključno posebno podudaranje, između davaoca i primaoca, na nivou humanog leukocitnog antigena (HLA, od engl. *human leukocyte antigen*), koji kodiraju za proteine glavnih kompleksa histokompatibilnosti (MHC, od engl. *major histocompatibility complex*).

Značajni napredak u ovoj oblasti usledio je kada su izolovane HMC iz krvi humane pupčane vrpce (objašnjeno u *Kita i sar., 2011*), a ubrzo nakon toga po prvi put i mišje embrionalne MĆ (EMC) iz unutrašnje mase blastocista koje su održavane *in vitro* (*Evans i Kaufman, 1981*). Gotovo istovremeno je *Martin* opisala razne tehnike

UVOD

izolovanja embrionalnih ćelija iz miša i dokazala njihovu pluripotentnost (*Martin, 1981*). Ova istraživanja su postavila temelj istraživačkom timu *Thomsona* koji je uspešno, 1995. godine po prvi put izolovao EMĆ primata, rezus majmuna (*J A Thomson i sar., 1995*). Ubrzo je po prvi put postignuto i uspešno kloniranje životinje metodom nuklearnog transfera kojom je u neoplođenu jajnu ćeliju ovce unet nukleus zrele odrasle ćelije te se tako dobijeni hibrid stimulisao na ćelijske deobe elektrošokovima (*Wilmut i sar., 1997*). Nakon dostizanja stadijuma blastocista, usađen je u surogat ovcu. Na ovaj način *Wilmut* je pokazao da nukleus odrasle zrele diferentovane ćelije može da se povрати u embrionalno stanje totipotentnosti stvarajući ćeliju koja može da se razvije u bilo koji organ odrasle životinje. Godinu dana kasnije, *Thomson* je sa saradnicima uspešno izolovao EMĆ iz ranih humanih embriona koji su nastali metodom veštačke *in vitro* fertilizacije (IVF), ali u kliničke svrhe (*James A. Thomson i sar., 1998*).

Početak XXI veka doneo je mnoga otkrića u ovoj oblasti među kojima se za deo pokazalo da su fabrikovana. Ipak, ovu deceniju obeležilo je otkriće da je od adultnih ćelija moguće dobiti ćelije nalik embrionalnim, a bez upotrebe i/ili uništavanja embriona (*Takahashi i sar., 2007; Takahashi i Yamanaka, 2006*). Sa svojim timom istraživača *Takashi* je 2006. godine uspeo da reprogramira običnu mišju, a 2007. godine i humanu adultnu ćeliju unoseći u nju četiri ključna gena- *OCT3/4* (od engl. *Octamer-binding transcription factor 4*), *SOX2* (od engl. (*Sex determining region Y*)-box 2), *KLF4* (od engl. *Kruppel-like factor 4*), i *C-MYC* i tako dobijene ćelije nazvao „indukovane pluripotentne matične ćelije“ (IPMĆ). Ovaj pronalazak značajno je doprineo razvoju oblasti biologije MĆ, s obzirom da se na ovaj način našla alternativa embrionu kao izvoru pluripotentnih ćelija, a pritom su dobijene ćelije koje mogu predstavljati visoko personalizovan izvor ćelija.

Tokom poslednje dve decenije, transplantacija HMĆ uspostavljena je kao standardni način za lečenje pacijenata sa hematološkim malignitetima ili deficijencijama, a otkriće da kultivisane ćelije kože mogu proizvoditi dovoljan broj ćelija sa regenerativnim potencijalom omogućilo je lečenje i pacijenata sa ozbiljnim opekotinama (*Copelan, 2006; C. P. Zhang i Fu, 2008*). Zahvaljujući otkrivanju novih izvora MĆ, uz razvoj nauke i tehnologije, u savremenoj medicini u toku je veliki broj prekliničkih testiranja i kliničkih studija koje ispituju terapijski potencijal MĆ. Ipak, put ka razvoju efikasne ćelijske terapije za široku primenu je dugačak i uključuje

savladavanje velikog broja tehničkih, zakonskih, etičkih i bezbedonosnih problema pa se i dalje smatra naukom u začetku.

1.1.2. Pojam matičnih ćelija

MĆ su definisane kao ćelije koje karakteriše sposobnost samoobnove i određeni stepen sposobnosti diferencijacije, čime se specijalizuju za obavljanje određene funkcije (*Łos i sar., 2019; Preston i sar., 2003*). Samoobnova predstavlja sposobnost ćelije da se višestruko i neograničeno deli bez gubitka diferencijacionog potencijala i podložnosti biološkom starenju, senscenciji. Ove ćelije se samoobnavljaju i) simetričnom deobom dajući ćerke ćelije identične roditeljskoj ćeliji; ii) asimetričnom deobom kojom pored ćerki ćelija koje ulaze u proces samoobnove kako bi se održao rezervoar MĆ, daju i ćerke ćelije koje se diferenciraju u specijalizovana tkiva (*S. He i sar., 2009*). Na taj način je fiziološki osigurano i održavanje ćelijskog sastava organizma, i regeneracija određenog oštećenog tkiva putem obnove tkiva diferencijacijom MĆ. Smatra se da MĆ prolaze sporo kroz ćelijski ciklus radi zaštite DNK, koja je podložna greškama prilikom deoba, ali da su visoko klonogene (*Preston i sar., 2003*). Prisutne su u najvećem broju organa sa mogućim izuzetkom srca, ali u većini tkiva predstavljaju mali procenat (1-2%) ukupnog broja ćelija (*Alison i sar., 2002*).

MĆ imaju različit potencijal diferencijacije (*Alison i sar., 2002; Preston i sar., 2003*) pa tako totipotentne ćelije imaju sposobnost formiranja svih tipova ćelija organizma u razvoju, uključujući embrionalna i perinatalna tkiva (npr tkiva embriona i trofoblasta placent) i takva je oplodena jajna ćelija tj zigot; pluripotentne ćelije imaju sposobnost diferencijacije u skoro sve ćelije koje potiču od tri klicina lista te stoga mogu dati bilo koju ćeliju organizma i taj potencijal imaju EMĆ; multipotentne ćelije karakteriše diferencijacija u ograničen broj ćelijskih linija unutar datog tkiva; i konačno, unipotentne ćelije se diferenciraju samo u jedan ćelijski tip i takve su epidermalne ćelije i spermatogonije testisa.

Do sada je identifikovano nekoliko tipova MĆ. Embrionalne MĆ su pluripotentne ćelije izolovane iz unutrašnje mase embriona u stanju blastule, koji se kod humanih embriona dostiže 4-5 dana nakon fertilizacije i sadrži 50-150 ćelija, i najčešće se dobijaju iz „viška” embriona dobijenih metodom IVF (*Bongso i Richards, 2004*).

UVOD

Mogu se *in vitro* propagirati beskonačno uz odgovarajuće faktore u kulturi (Rippon i Bishop, 2004), uz konstantni visok nivo aktivnosti telomerase (Hiyama i Hiyama, 2007). Do sada su se *in vitro* uspešno diferencirale u veliki broj ćelijskih tipova (Rippon i Bishop, 2004), međutim uprkos tome što se njihova izolacija i upotreba odvija uz saglasnost donora embriona („roditelja”), smatra se da je potrebno prevazići mnoge prepreke etičke i tehničke prirode pre odobrene upotrebe EMC u kliničkim ispitivanjima.

Otkriće IPMC značajno je unapredilo istraživanja MC, ali i medicinu generalno, s obzirom da je na ovaj način dokazano da je moguće manipulirati stepenom diferencijacije ćelija. Smatra da ove ćelije imaju veliki potencijal primene s obzirom na lako dobijanje, etičku nekompromitovanost i činjenicu da su tkiva dobijena pomoću ovih ćelija autologna. Ipak, i za ove ćelije je još uvek neophodno prevazići veći broj tehničkih problema koji onemogućavaju njihovu uspešnu upotrebu, između ostalog i činjenicu da su više tumorigene u odnosu na EMC (Gutierrez-Aranda i sar., 2010).

Adultne matične ćelije prisutne su u velikom broju tkiva odraslog organizma i njihova aktivnost, kapacitet diferencijacije i životni vek se razlikuju. Ove prekursorske ćelije imaju ulogu u konstantnom održavanju i obnavljanju tkiva u kojem se nalaze tokom čitavog životnog veka jedinke (Ahsan i sar., 2008; Gurusamy i sar., 2018; Łos i sar., 2019). Inicijalno se mislilo da su ove ćelije prisutne u malom broju tkiva, i da je njihov diferencijacioni potencijal ograničen samo na tip tkiva iz kog su izolovane, ali su do danas izolovane iz gotovo svakog tkiva odrasle jedinke. Pored svoje dostupnosti, ove tkivno-specifične progenitorske ćelije značajne su i zbog multipotentnog potencijala za diferencijaciju. Međutim, broj MC u adultnim tkivima je procentualno mali u odnosu na ukupan broj ćelija (Preston i sar., 2003), a starenjem dolazi do smanjenja njihovog broja i karakteristika što utiče na njihov regenerativni potencijal, rast i deobu (Ahmed i sar., 2017).

Najbolje istražene i okarakterisane adultne MC su HMC, koje iz brojčano vrlo male populacije primitivnih ćelija, sa malom proliferativnom aktivnošću (svega 10-15% ovih ćelija se nalazi u S fazi ćelijskog ciklusa) (Pietras i sar., 2011), obezbeđuju neprekidno stvaranje dovoljnog broja novih ćelija hematopoeze u toku života svake jedinke. Naime, u procesu hematopoeze, od primitivnih MC, preko niza tranzitnih

UVOD

kategorija manje primitivnih ćelija, a potom ćelija opredeljenih za više, dve ili samo jednu krvnu lozu, daljim diferentovanjem nastaju morfološki prepoznatljive ćelije koje daljom proliferacijom, diferencijacijom i sazrevanjem daju zrele ćelije krvi. Tako, u ovom hijerarhijski organizovanom procesu, multipotentne HMC daju multipotentne progenitorske ćelije od kojih dalje nastaju oligopotentne zajedničke progenitorske ćelije limfoidne i mijeloidne loze koje preko progenitora opredeljenih za određenu lozu, daju zrele limfocite, prirodne ćelije ubice (od engl. *natural killer cells*, *NK cells*) odnosno granulocite, makrofage/monocite, eritrocite i krvne pločice, redom (Bryder i sar., 2006). Na ovaj način, sukcesivnim diferenciranjem u hematopoetske progenitore, HMC progresivno gube sposobnost samoobnove, ali proliferativna aktivnost se eksponencijalno povećava uz nastavak procesa diferencijacije, odnosno dolazi do progresivne specijalizacije ćelija. Smatra se da HMC predstavljaju heterogenu populaciju ćelija čiji se podtipovi razlikuju prema funkcionalnim karakteristikama (poput proizvoda procesa diferencijacije, potencijala samoobnove, profila ćelijskog ciklusa i zrelosti) na šta upućuje veliki broj dokaza (objašnjeno u Crisan i Dzierzak, 2017). Tako, jedna od aktuelnih podela prema kinetici obnavljanja hematopoeze podrazumeva postojanje dugotrajno-, srednje- i kratkotrajno- repopulišućih HMC (engl. *LT*, *long-*, *IT*, *intermediate-*, *ST*, *short-term repopulating HSCs*) (Schroeder, 2010). Životni vek diferenciranih HMC je različit u zavisnosti od tipa zrele ćelije krvi i stoga HMC moraju biti konstantno angažovane, te stabilan rezervoar ovih ćelija mora biti održavan. Za te potrebe, HMC održavaju balans samoobnove i diferencijacije. Hematopoetske MC imaju visok proliferativni potencijal, ali su kao i druge adultne MC retke (~1/10000 ćelija u kostnoj srži) (objašnjeno u Bonnet, 2002). Proces hematopoeze je kontrolisan različitim faktorima mikrosredine kostne srži u kojoj se HMC nalaze putem međućelijskih interakcija, signalnih molekula, vanćelijskog matriksa (VCM) koji određuju proliferativni status, ćelijski ciklus, veličinu rezervi, sudbinu ćelija i njihovu mobilizaciju (Bryder i sar., 2006). Hematopoetske MC su ispitivane u brojnim kliničkim studijama i HMC prikupljene iz različitih izvora poput kostne srži, mobilisane periferne krvi i krvi pupčanika danas predstavljaju osnovu uspeha terapijske primene HMC u transplantaciji.

Pored HMC, iz velikog broja adultnih, ali i perinatalnih tkiva, izolovane su i mezenhimske matične ćelije (MMC). Ovaj tip adultnih MC, dobro je okarakterisan za

većinu tkiva, a zbog izrazitog regenerativnog i modulatornog potencijala ove ćelije su trenutno u fokusu brojnih istraživanja usmerenih ka njihovoj potencijalnoj primeni u medicini.

1.1.3. Mezenhimske matične ćelije

Mezenhimske MĆ su deo populacije adultnih multipotentnih MĆ koje u mnogim tkivima učestvuju u održavanju homeostaze. To su nediferencirane ćelije sa sposobnošću samoobnove i potencijalom diferenciranja u specijalizovane ćelije mezodermskog porekla (*Via i sar., 2012*), što upućuje na širok opseg njihove potencijalne terapijske primene. Na postojanje nehematopoetskih matičnih ćelija u kostnoj srži prvi put je sugerisalo istraživanje *Cohnheim*-a koje je ukazalo na mogućnost postojanja fibroblasta koji talože kolagenska vlakna u procesu zarastanja tkiva (objašnjeno u *Prockop, 1997*). Prvi dokaz o postojanju MMĆ u kostnoj srži dalo je istraživanje *Friedenstein*-a i saradnika koji su na osnovu originalnog sistema kultivisanja CFU-F (od engl. *colony forming unit – fibroblast*), krajem šesdesetih godina prošlog veka, ukazali na njihovu adherentnu, klonogenu, nefagocitnu i fibroblastnu prirodu (*Friedenstein i sar., 1976*). Brojnim istraživanjima koja su usledila dokazano je da ćelije izolovane ovom metodom jesu multipotentne i mogu se diferencirati u osteocite, hondrocite, adipocite i mioblaste (objašnjeno u *Chamberlain i sar., 2007*). Pojam „mezenhimske MĆ“ uveo je Arnold Kaplan sa ciljem da označi istu kategoriju ćelija, koje se mogu izolovati i umnožiti *ex vivo* u određenim uslovima, pri čemu zadržavaju sposobnost diferenciranja u različita vezivna tkiva (*Caplan, 1991*).

1.1.3.1. Karakterizacija i izvori MMĆ

S obzirom da se MMĆ mogu izolovati iz različitih izvora kao i da postoje različite metode izolacije MMĆ iz istog izvora, pojavio se problem nedoslednosti u karakteristikama ovih ćelija, te je stoga Komitet za mezenhimske matične ćelije i tkiva Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju, predložio minimalne kriterijume za definisanje MMĆ koji se koriste za svrhe naučnih i prekliničkih istraživanja (*Dominici i sar., 2006*). Da bi se izolovane ćelije okarakterisale kao MMĆ neophodno je da zadovolje sledeće kriterijume: i) sposobnost adhezije za plastiku; ii) ekspresija specifičnih površinskih antigena; iii) multipotentni diferencijacioni potencijal.

UVOD

Kriterijumi podrazumevaju da više od 95% ćelija mora da eksprimira najmanje CD105 (endoglin), CD73 (*ecto 5' nucleotidase*) i CD90 (Thy-1), dok ekspresija CD45 (opšti leukocitni marker), CD34 (marker endotelskih ćelija), CD14 ili CD11b (ekspimirani na monocitima i makrofagima), CD79a ili CD19 (markeri B ćelija) i HLA-DR treba da izostaje (< 2% ćelijske populacije je pozitivno). Ipak, kako panel predloženih antigena nije jedinstven za MMC, a s obzirom na njihovu multipotentnost, neophodno je dodatno potvrditi da se ove ćelije diferenciraju u osteoblaste, hondroblaste i adipocite *in vitro* u diferencijacionim medijuma karakterističnog sastava. Iako je do sada identifikovan veći broj markera koji se dodatno koriste za prečišćavanje MMC u kulturi, poput CD13, CD29, CD44 i CD10 (*Mafi i sar., 2011*), CD146 je univerzalno detektovan kod MMC izolovanih iz raznih tkiva (*Lv i sar., 2014*).

Kako ove ćelije imaju sposobnost diferencijacije u mezenhimska tkiva, u nauci je opšteprihvaćen i koristi se termin „mezenhimske matične ćelije“, međutim s obzirom na njihovo poreklo, karakteristike, odsustvo specifičnih markera i pitanje njihovog realnog potencijala *in vivo*, postoji polemika da li je ovaj naziv adekvatan. Međunarodno društvo za ćelijsku terapiju predložilo je oznaku „multipotentne mezenhimske stromalne ćelije“ (*Dominici i sar., 2006*), a upravo autor termina MMC sugeriše usvajanje naziva „lekovite signalne ćelije“ (MSC, od engl, *Medicinal Signaling Cells*), kao precizniji opis imunomodulatornog i trofičkog delovanja ovih ćelija nakon pristizanja u ciljano tkivo, odnosno kao nekog vida terapijskih lekova (*Caplan, 2017*). Ipak, na engleskom jeziku se za opis ovih ćelija u nauci zadržao jedan isti akronim „MSC“ s obzirom da pored gore-pomenutih označava i: mezenhimske matične ćelije (*mesenchymal stem cells*), multipotentne stromalne ćelije (*multipotent stromal cells*), mezenhimske stromalne ćelije (*mesenchymal stromal cells*) koji opisuju isti tip stromalnih ćelija izolovanih iz adultnih tkiva a okarakterisanih *in vitro* kriterijumima utvrđenim konzensusom (*Bianco, 2014; Nicodemou i Danisovic, 2017*).

Mnoge studije potvrdile su da regenerativni potencijal MMC u velikoj meri zavisi od tkiva iz kojeg potiču. MMC su prvobitno izolovane iz kostne srži glodara, a kasnije i humane, tako da je do sada kostna srž najčešće korišćen izvor MMC. Iako je prinos MMC iz kostne srži (KS-MMC) mali, svega do 0,01% izolata mononuklearnih ćelija (MNC) (*Pittenger, M. F. i sar., 1999*), ove ćelije korišćene su u kliničkim studijama za autologne i alogene transplantacije (*Polymeri i sar., 2016*). Međutim,

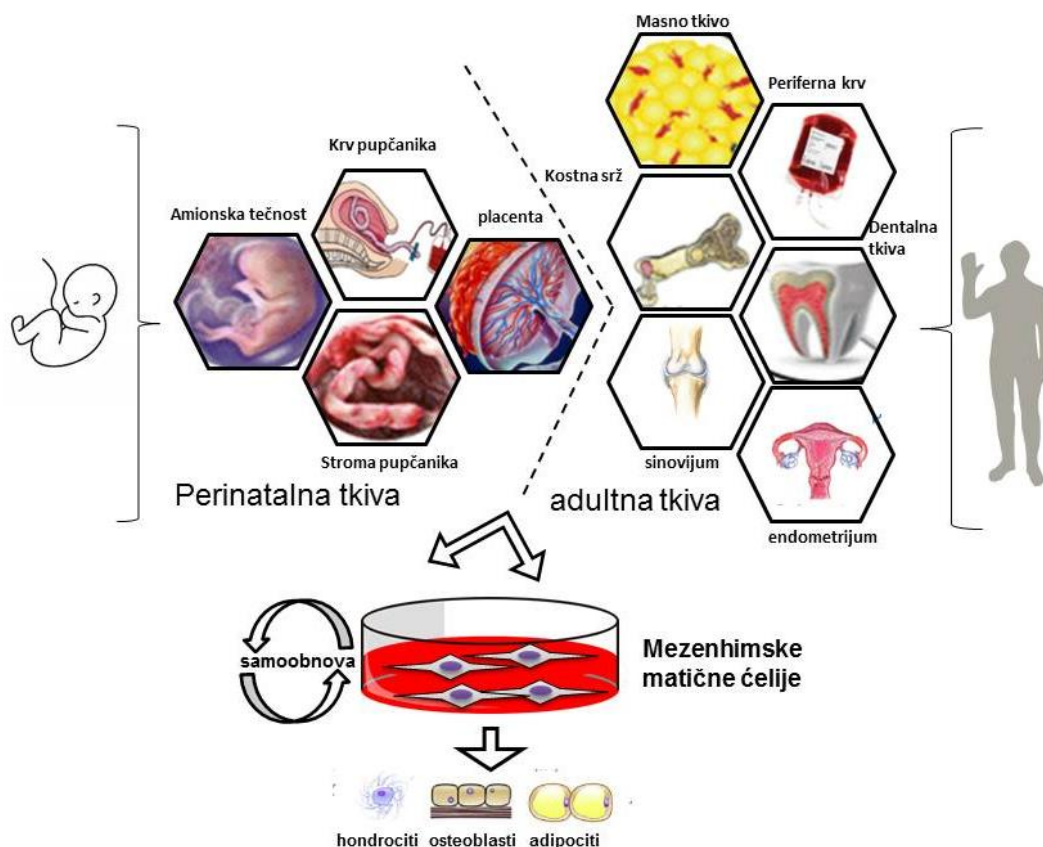
UVOD

autologna primena je ograničena brojem ćelija i smanjenjem diferencijacionog potencijala usled starenja (*Charif i sar., 2017*), a alogena zbog invazivne i često bolne izolacije ćelija i rizika od infekcija. Zbog toga je stvorena potreba za alternativnim izvorima MMĆ, tako da su do danas izolovane iz velikog broja tkiva (**Slika 1.**).

Prisustvo MMĆ opisano je u dentalnim tkivima poput dentalne pulpe mlečnih zuba, zubne klice, apikalne papile i periodoncijuma (*Estrela i sar., 2011; Gronthos i sar., 2000; G. T. J. Huang i sar., 2009*), s obzirom da su u pitanju tkiva koja okružuju zub u razvoju kome je obnavljanje tkiva neophodno. Ove ćelije su posebno pogodne za istraživanja, s obzirom na laku dostupnost tkiva putem neinvazivnih stomatoloških procedura i jednostavnih metoda za izolaciju ovih ćelija. Najznačajnija osobina masnog tkiva, kao izvora MMĆ, ogleda se u njegovoj relativnoj dostupnosti u velikim količinama, s obzirom da je najčešća procedura njegovog dobijanja liposukcija (*Zuk i sar., 2001*). Ovaj način izolacije je neinvazivan, a prinos MMĆ iz masnog tkiva je veći u odnosu na kostnu srž (*Fraser i sar., 2006*). MMĆ su izolovane i iz periferne krvi, ali se smatra da one najverovatnije vode poreklo iz kostne srži (*Roufosse i sar., 2004*). Prikupljanje uzoraka za njihovu izolaciju je takođe neinvazivno.

Perinatalna tkiva se u skorijim istraživanjima sve češće spominju kao povoljan izvor MMĆ sa potencijalnom primenom u regenerativnoj medicini (*Bieback i Brinkmann, 2010*). Do sada su MMĆ izolovane iz placente, Vartonove sluzi i krvi pupčanika, kao i amnionske tečnosti (*Igura i sar., 2004; Margossian i sar., 2012; Puranik i sar., 2012; Sibov i sar., 2012; M. S. Tsai i sar., 2004*). Pokazano je da MMĆ iz humane placente imaju veći kako potencijal ekspanzije, tako i kapacitet usađivanja u tkiva pri transplantaciji u odnosu na KS-MMĆ (*Hass i sar., 2011*), a amnionske MMĆ karakterišu niska imunogenost i tumorigenost (*Joerger-Messerli i sar., 2016*). S obzirom da se ova tkiva nakon porođaja odbacuju, pored toga što je njihovo prikupljanje neinvazivno, bez posledica po majku i dete, njihovo korišćenje u ove svrhe ne povlači sa sobom nikakve probleme moralne i etičke prirode.

Pored toga MMĆ su identifikovane i izolovane iz drugih tkiva poput menstrualne krvi, endometrijuma, jajovoda, zglobne hrskavice, sinovijalne membrane i tečnosti (*Ding i sar., 2011; Y. Z. Huang i sar., 2017*) i smatra se da se MMĆ mogu izolovati iz gotovo svakog tkiva.



Slika 1. Izvori MMĆ. *Adultne MĆ izolovane su iz velikog broja tkiva u organizmu, a sve se više ističu alternativni izvori poput perinatalnih tkiva zbog svoje dostupnosti, etičke nekompromitovanosti i neinvazivnih metoda izolacije MMĆ. Detaljnije objašnjenje u tekstu.*

1.1.3.2. Fiziološka uloga i terapijski potencijal MMĆ

Fiziološka uloga MMĆ još uvek nije u potpunosti ispitana i objašnjena s obzirom da trenutno ne postoje markeri za praćenje njihovih funkcija *in vivo*. Mnogi rezultati upućuju na to da MMĆ kostne srži funkcionišu kao prekursori ćelija koje čine funkcionalne komponente mikrosredine HMC, te stoga podržavaju hematopoezu i održavaju homeostazu HMC (Galderisi i Giordano, 2014; Muguruma i sar., 2006; Uccelli i sar., 2008). Međutim postoje i nalazi koji ukazuju da je fiziološka uloga MMĆ obnavljanje tkiva, pa se tako prema toj teoriji MMĆ mobilisu iz kostne srži u cirkulaciju kako bi u ciljnim tkivima na mestima oštećenja učestvovala u obnavljanju oštećene populacije ćelija. S druge strane, činjenice da se prekursori MMĆ u adultnim tkivima *in vivo* preferencijalno lokalizuju blizu krvnih sudova, ukazuju na njihovu povezanost sa

vaskulaturom, što olakšava da funkcionišu kao izvor novih ćelija za lokalne lezije tkiva u kojem borave (*da Silva Meirelles i sar., 2008*).

MMC se smatraju najpristupačnijim izvorom MC za primenu u regenerativnoj medicini, s obzirom da mogu biti lagano prikupljene i izolovane iz dostupnih tkiva, a njihova upotreba zadovoljava etičku, zakonsku i proizvodnu regulativu. Takođe, ove ćelije karakteriše niska imunogenost, te ih imunski sistem domaćina toleriše, a poseduju i visok migratorni potencijal, multidiferencijacioni kapacitet, kao i imunomodulatorna svojstva. Trenutno nije poznat univerzalan mehanizam kojim MMC ostvaruju svoj terapijski potencijal, niti je način primene ovih ćelija u terapiji različitih bolesti standardizovan. Postoji nekoliko potencijalnih mehanizama terapijskog delovanja MMC, i ne isključuje se mogućnost da MMC u nekim slučajevima deluju na više načina.

Migracija ćelija ka ciljnom tkivu („Homing“). MMC imaju tendenciju da migriraju ka mestima oštećenja tkiva i područjima zahvaćenim inflamacijom (*English, 2013; Spaeth i sar., 2008*) (**Slika 2.A**), što je pokazano u brojnim eksperimentima prilikom njihove sistemske primene. Iako je nedvosmisleno pokazano da najveći broj MMC primenjenih intravenski završi u plućima (*Fischer i sar., 2008*), tačan mehanizam kojim MMC bivaju privučene u ciljna tkiva još uvek nije dovoljno ispitan. Prema pojedinim navodima u literaturi, MMC kostne srži se kotrljaju, pružaju nastavke posredstvom p-selektina, i ostvaruju migraciju zahvaljujući interakciji molekula VLA4 (od engl. *very late antigen-4*) sa VCAM1 (vaskularni ćelijski adhezivni molekul, od engl. *vascular cell adhesion protein 1*) na endotelskim ćelijama, za koje je vezivanje pojačano stimulacijom faktorom nekroze tumora- α (TNF- α , od engl. *tumor necrosis factor- α*) (*Ruster i sar., 2006*). Značaj ove interakcije potvrđen je i u drugim studijama, koje su ukazale i da su za transendotelnu migraciju zaslužni i β 1 integrini, matriksne metaloproteinaze (MMP)-2 i različiti citokini (*Ries i sar., 2007; Steingen i sar., 2008*).

U procesima migracija MMC učestvuju i brojni hemokini i njihovi receptori. Među najviše izučavanim receptorima za hemokine su CXCR4 i CCR2 (*Belema-Bedada i sar., 2008; Wynn i sar., 2004*), a pokazana je i ekspresija CCR4, CCR7, CCR10, CCR9, CXCR5, i CXCR6 (*Chamberlain i sar., 2007; da Silva Meirelles i sar., 2008; Spaeth i sar., 2008*). Među drugim MMP ključnim za invaziju MMC ističe se i MT1-MMP (od engl. *membrane type 1 MMP*)/MMP-14, a pored navedenih adhezivnih

UVOD

molekula kod MMC zabeležena je i ekspresija $\alpha 4$ integrina i ICAM (unutarćelijski adhezivni molekul, od engl. *Intercellular Adhesion Molecule*) (A. De Becker i sar., 2007; Mafi i sar., 2011; Ries i sar., 2007; Ruster i sar., 2006; De Ugarte i sar., 2003).

Mnogi autori su potvrdili da migracija i *homing* aplikovanih MMC ka određenom tkivu zavise od faktora kao što su pasaža i konfluentnost ćelija, s obzirom da utiču na ekspresiju odgovarajućih površinskih receptora na MMC uključenih u ove procese. Sveže izolovane MMC imaju pojačanu sposobnost migracije ka oštećenim tkivima u poređenju sa odgovarajućim ćelijama koje su dugotrajno propagirane u kulturi, s obzirom da pri većem broju pasaža MMC gube ekspresiju pojedinih površinskih receptora. Tako su, na primer CXCR4 i CX3CR1 markeri preferencijalno eksprimirani na MMC u ranim pasažama i niske konfluentnosti, a kod MMC visoke konfluentnosti povećana je produkcija prirodnog inhibitora MMP, TIMP-3 (objašnjeno u Kang i sar., 2012). S druge strane, na sposobnost migracije i *hominga* MMC utiče i način njihove primene, s obzirom na malu efikasnost intravenske aplikacije MMC. Stoga se smatra da je pogodna alternativna intraarterijalna primena (Shan Liu i sar., 2016). Međutim, kako ovaj način primene može dovesti do mikrovaskularnih okluzija ili cerebralnih lezija (Argibay i sar., 2017; Walczak i sar., 2008), direktna, lokalna primena u blizini oštećenog tkiva se pokazala još efikasnijom metodom (Kanazawa i sar., 2018).

U procesu modulacije ove značajne funkcije MMC uključeni su i mnogobrojni inflamatorni citokini, poput IL (interleukina)-1, faktora transformacije rasta (TGF- β 1, od engl. *transforming growth factor* β 1), inhibitornog faktora migracije makrofaga (MIF, od engl. *macrophage migration inhibitory factor*), IL-8 i hemokina MCP-1 (hemoatraktantni protein monocita, od engl. *monocyte chemotactic protein-1*) (M. Shi i sar., 2007; Lei Wang i sar., 2002), što je potvrdilo da efikasni *homing* i usađivanje ovih ćelija zavisi od inflamatorne mikrosredine oštećenog tkiva. Efikasnost delovanja primenjenih MMC umnogome zavisi i od patološkog stanja domaćina, čije ćelije u obolelim tkivima mogu da produkuju određene hemoatraktante, poput faktora rasta, kao što su faktor rasta hepatocita (HGF, od engl. *hepatocyte growth factor*), epidermalni faktor rasta (EGF, od engl. *epidermal growth factor*), trombocitni faktor rasta (PDGF, od engl. *platelet-derived growth factor*), insulinu sličan faktor rasta (IGF, od engl. *insulin-like growth factor*) i angiopoetin- 1 (Li Li i Jiang, 2011). U prilog ovom

mehanizmu ostvarivanja migratorne funkcije MMC su i nalazi da su na ovim ćelijama identifikovani i njihovih odgovarajući receptori.

Diferencijacija i regeneracija tkiva. S obzirom da su MMC multipotentne ćelije, njihova sposobnost diferencijacije u različita tkiva mezodermnog porekla *in vitro* bila je osnova za ispitivanja njihove potencijalne terapijske primene. Takođe, jedan broj eksperimentalnih nalaza sugerisao je da je kapacitet diferencijacije MMC veći, te da MMC mogu dati i ćelije ektodermnog i endodermnog porekla, poput hepatocita, neurona i kardiomiocita (N. Kim i Cho, 2013). U eksperimentima *in vivo* potvrđeno je usađivanje MMC na raznim životinjskim modelima oštećenja koštanog i hrskavičavog tkiva, tkiva miokarda i jetre i dr (N. Kim i Cho, 2013), pri čemu su se ove ćelije uspešno diferencirale u osteoblaste u slučaju *osteogenesis imperfecta* ili kardiomiocite u slučaju infarkta miokarda (Chamberlain i sar., 2007; Ren i sar., 2012). Međutim, još uvek nije sa sigurnošću utvrđeno da li su ovi efekti posledica samo diferencijacionog kapaciteta MMC ili je uključen i neki drugi mehanizam, poput parakrine interakcije (Slika 2.B i C). Naime, novija istraživanja upućuju na mogućnost da se terapijski potencijal ovih ćelija zasniva najvećim delom na sekreciji različitih faktora angiogeneze, trofičkih faktora, imunomodulatornih, neuroregulatornih i anti-inflamatornih faktora, a manje na direktnoj regeneraciji tkiva putem diferencijacije (Phinney i Sensebe, 2013; Tögel i sar., 2005).

Imunomodulacija. Regenerativnom kapacitetu MMC doprinose i njihova imunomodulatorna svojstva (Slika 2.D), koja ispoljavaju kroz različito delovanje na osnovne funkcije imunskih ćelija, i to kako direktnim međućelijskim kontaktom, tako i delovanjem putem solubilnih faktora (Hass i sar., 2011). Imunomodulatorna svojstva MMC ogledaju se u uticaju na proliferaciju i diferencijaciju B i T ćelija, sazrevanje dendritičnih ćelija i aktivnost NK ćelija, kako u *in vitro* tako i u *in vivo* uslovima (Aggarwal i Pittenger, 2005; Uccelli i sar., 2008). Pokazano je da se važan mehanizam imunomodulatornog delovanja MMC ostvaruje preko sekrecije različitih molekula, kao i da je krajnji ishod efekata MMC kumulativan i posredovan delovanjem više medijatora (Uccelli i sar., 2008). Među ovim faktorima su azot-monoksid,IDO (indolamin 2,3-dioksigenaza), prostaglandin E2 (PGE2), TSG-6 (od engl, *tumor necrosis factor-inducible gene- 6*), CCL-2, i PDL-1 (od engl, *programmed death ligand*

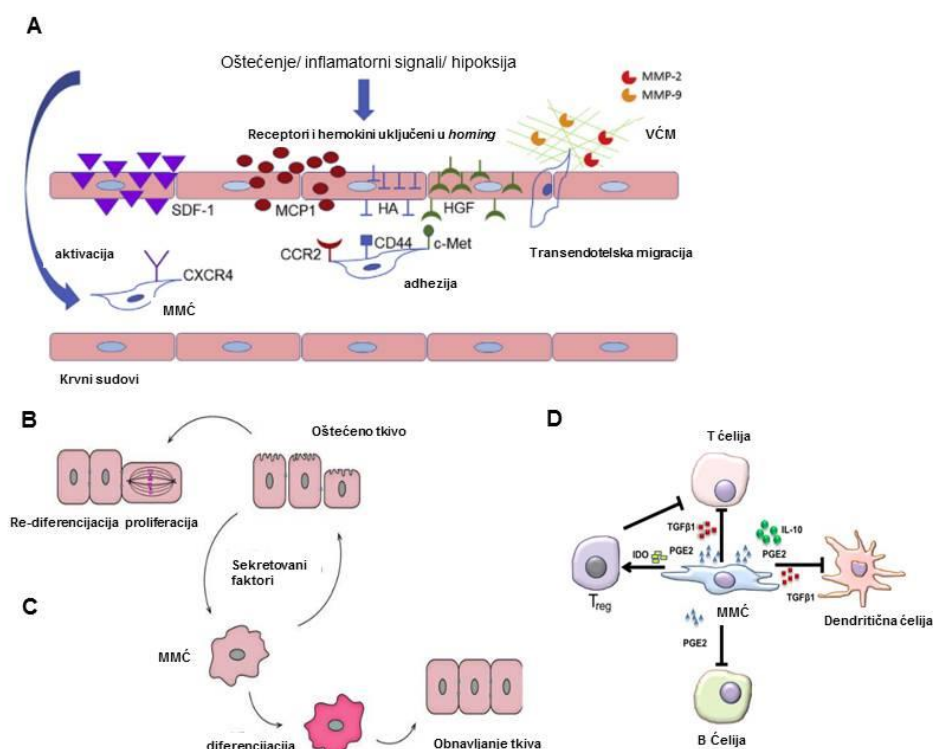
UVOD

1) (*English, 2013*). Ovi faktori se minimalno eksprimiraju na MMC osim ako nisu stimulirani inflamatornim citokinima, poput IFN- γ , TNF- α , i IL-1 (*Ren i sar., 2008*).

MMC su do sada ispitivane u kliničkim studijama u terapijama bolesti kalema protiv domaćina (GVHD, od engl. *graft versus host disease*) i u imunosupresivnim terapijama kod pacijenata sa dijabetesom, multiplom sklerozom, reumatoidnim artritisom i drugim bolestima koje su povezane sa autodestrukcijom imunskog sistema (*Uccelli i sar., 2008*).

Produkcija trofičkih faktora. Sve se više veruje da terapijski efekti MMC zapravo potiču od njihovog kapaciteta da luče različite faktore (**Slika 2.C**). Nakon migracije u oštećeno tkivo, ove ćelije interaguju sa drugim ćelijama, ali i prisutnim solubilnim faktorima i citokinima, ligandima za TLR (*toll -like receptor*), te bivaju izloženi hipoksiji i drugim specifičnim faktorima mikrosredine, koji udruženo stimulišu MMC da sekretuju veliki broj biološki aktivnih molekula.

Ovi molekuli, poput VEGF (vaskularni endotelski faktor rasta, od engl. *vascular endothelial growth factor*), IGF-1, bFGF (od engl. *basic fibroblast growth factors*), HGF, IL-6, i CCL-2 (*Y. Fu i sar., 2017; Hofer i Tuan, 2016*), učestvuju u procesima posredovanim MMC, poput angiogeneze, inhibicije apoptoze i drugim (*Caplan i Dennis, 2006; Crisostomo i sar., 2008*). Povoljan efekat parakrinog dejstva MMC u obnavljanju oštećenih tkiva uočen je i na primerima oštećenja rožnjače, miokarda nakon infarkta i defekata hrskavice, muskuloskeletnog sistema i neurovaskularanih oštećenja (*Y. Fu i sar., 2017*). Na osnovu ovih istraživanja sve zastupljenija su mišljenja da je alternativa direktnom korišćenju samih ćelija u terapijama, zapravo korišćenje njihovih solubilnih faktora.



Slika 2. Mogući mehanizmi delovanja primenjenih MMĆ. Modifikovano po *Lin i sar., 2017; Fu i sar., 2017; Samsonraj i sar., 2017*. A) Migracija/homing do oštećenih tkiva. B) Parakrino dejstvo MMĆ na ćelije oštećenog tkiva putem sekrecije različitih faktora koji stimulišu njihovu proliferaciju i diferencijaciju samim tim i regeneraciju oštećenja. C) Diferencijacija MMĆ čime se regeneriše ciljano tkivo. D) Imunomodulatorni mehanizmi kojima MMĆ deluju na ćelije imunskog sistema; Detaljnije objašnjenje u tekstu.

Molekularna osnova mehanizama terapijskog delovanja MMĆ nije u potpunosti poznata i predstavlja atraktivnu oblast istraživanja usled širokog opsega primene MMĆ i razvijanja strategija za uspešnije terapije. Do kraja izrade ove disertacije bilo je registrovano 907 kliničkih studija (baza i registar *ClinicalTrials.gov*) koje su uključivale primenu MMĆ kod pacijenata sa hematološkim, neurološkim, kožnim oboljenjima, oštećenjima kardiovaskularnog i muskuloskeletnog sistema i autoimunskih bolesti (*Galipeau i Sensébé, 2018; Squillaro i sar., 2016*). Međutim, mora se naglasiti da je više od 80% ovih studija u fazi I ili fazi II ispitivanja, što direktno upućuje da su za konačnu primenu ovih ćelija u terapiji neophodna još mnogobrojna istraživanja. Međutim, pored primene u regenerativnoj medicini i ćelijskoj terapiji, MMĆ i brojna

tkiva u koja se mogu diferencirati, mogu biti i značajan model sistem raznih bolesti, kao i test sistemi za *skrining* lekova i testiranje raznih bioaktivnih proizvoda.

1.1.3.3. Mezenhimske matične ćelije izolovane iz periferne krvi (PK-MMĆ)

Cirkulišuće MMĆ su prvi put uočene u perifernoj krvi sredinom XX veka u istraživanjima transformacije krvnih leukocita u ćelije nalik fibroblastima i dalje u vezivna tkiva (objašnjeno u *Q. He i sar., 2007*). Tada su definisane kao CFU-fibroblast iz periferne krvi (PK-CFU-F), a kasnije su mnoge druge istraživačke grupe potvrdile postojanje takvih CFU-F kod kojih je dokazan klonogeni kapacitet i sposobnost održavanja u kulturi (*Paul, 1958; Stirling i Kakkar, 1969*). Ove ćelije su danas okarakterisane kao adultne mezenhimske ćelije (*Chong i sar., 2012*) i pokazano je da je njihov imunofenotip sličan imunofenotipu KS-MMĆ (*Xu i Li, 2014*). Međutim, MMĆ su u perifernoj krvi zdravih osoba prisutne u malom broju (~1 na 10^8 MNC periferne krvi) (*Kuznetsov i sar., 2001; Zvaifler i sar., 2000*). Mezenhimske MĆ su takođe izolovane i iz adultne periferne krvi drugih vrsta poput morskog praseta, zeca, psa, pacova i miša (*Q. He i sar., 2007*).

Poreklo MMĆ u perifernoj krvi je još uvek nepoznato, ali se smatra da bi ove ćelije mogle biti mobilisane u cirkulaciju iz kostne srži ili drugih organa, o čemu svedoči niz publikacija sa mogućim direktnim dokazima u slučajevima raznih patoloških stanja (opisano u *Q. He i sar., 2007*). U literaturi preovlađuje mišljenje da je efikasnost usađivanja PK-MMĆ nakon transplantacije veća u odnosu na KS-MMĆ (*Elfenbein i Sackstein, 2004*), a smatra se i da su zbog mobilizacije pogodan model za klinička istraživanja MMĆ. Uprkos tome, u literaturi nema puno podataka o njihovoj primeni u prekliničkim istraživanjima, mada je jedno od istraživanja na životinjskom modelu ukazalo na kapacitet PK-MMĆ da pojačaju regeneraciju kostiju (*Wan i sar., 2006*). U prilog njihovom regenerativnom potencijalu i potencijalnoj upotrebi ide i činjenica da im se broj u krvi povećava nakon povrede, poput frakture kostiju, velikih akutnih opekotina, ali i u patološkim stanjima - kod pacijenata sa hroničnim bolestima kao što su osteoporoza, kancer dojke i sarkomi kostiju (*Bian i sar., 2009; Fernández i sar., 1997; Mansilla i sar., 2006*).

Smatra se da se ove ćelije sistemski mobilišu do mesta povrede ili oštećenja tkiva zahvaljujući različitim molekulima poput citokina i faktora rasta koje ta tkiva otpuštaju. Međutim, iako tačni mehanizmi kojima se ovi procesi odigravaju još uvek nisu dovoljno istraženi, postoje literaturni podaci koji ukazuju na visoke nivoe SDF-1 (od engl. *stromal cell derived factor*; CXCL12), VEGF-A i FGF-2 istovremeno sa prisutnim cirkulišućim MMC kod pacijenata sa akutnim infarktom miokarda (*Y. Wang i sar., 2006*), kao i da je MMC iz periferne krvi moguće mobilisati faktorom stimulacije kolonije granulocita (G-CSF, od engl. *granulocyte-colony stimulating factor*) (*Kassis i sar., 2006*).

1.1.3.4. Mezenhimske matične ćelije izolovane iz Vartonove sluzi humanog pupčanika (VS-MMC)

Stroma mukusnog vezivnog rastresitog tkiva pupčane vrpce koja okružuje krvne sudove - Vartonova sluz (VS) prvi put opisana je od strane Tomasa Vartona 1656. godine (*Taghizadeh i sar., 2011*; *H.-S. Wang i sar., 2004*). Glavna uloga ove strukture jeste da spreči kompresiju, torziju i savijanje ograđenih sudova, što obezbeđuje dvosmernu krvnu komunikaciju između majčine i fetalne cirkulacije i razvoj fetusa (*Can i Karahuseyinoglu, 2007*; *Troyer i Weiss, 2008*). Prvi put su glavne ćelijske komponente strome pupčanika nalik fibroblastima izolovane iz VS, i opisane kao miofibroblasti 1991. godine, i pokazano je da koeksprimiraju vimentin, dezmin (*Takechi i sar., 1993*) i α -smooth muscle actin (α -SMA) (*Kobayashi i sar., 1998*). Danas su ove ćelije uspešno izolovane i okarakterisane kao MMC.

Ove ćelije se uspešno izoluju enzimskom digestijom i metodom eksplanta (*De Bruyn i sar., 2011*; *Puranik i sar., 2012*). Metoda eksplanta se pokazala efikasnijom, s obzirom da se ovom metodom dobije prosečno 2,8 puta više ćelija/g tkiva, a i vreme dupliranja ćelija je kraće (*Yoon i sar., 2013*). Pri izolaciji enzimskom digestijom postoji mogućnost oštećenja ćelija, a metodom eksplanta kod ćelija ostaje očuvana sposobnost lučenja raznih faktora rasta (*Kalaszczynska i Ferdyn, 2015*). Međutim, iako se smatralo da su oba protokola efikasna samo kada se primene na svežem tkivu VS (*Chatzistamatiou i sar., 2014*), pokazano je i da su ćelije, okarakterisane kao MMC, uspešno izolovane iz zamrznutog tkiva, mada uz manji prinos i promenu proteoma ćelija u odnosu na sveže tkivo (*Di Giuseppe i sar., 2014*; *Roy i sar., 2014*). S obzirom

UVOD

da izolacija ovih ćelija nije standardizovana, predložene su u literaturi različite modifikacije kako bi se povećala efikasnost (Azandeh i sar., 2012; Hassan i sar., 2017; Hendijani i sar., 2014; Venugopal i sar., 2011), mada se metod eksplanta ipak pokazao najboljim izborom.

Postoje dve teorije o poreklu VS-MMĆ (Bongso i Fong, 2013). Prema jednoj hipotezi, u ranom stadijumu razvoja embriona desile su se dve migracije MĆ tokom kojih su neke ostale „zarobljene” u VS pupčanika i dobile nove osobine usled promene mikrosredine. Druga hipoteza razmatra postojanje primitivnih stromalnih ćelijamiofibroblasta poreklom od mezenhima pupčanika, čija je uloga sinteza glikozaminoglikana, glikoproteina i proteina VĆM. Stoga, usled primitivnog porekla, osobine matičnosti ovih ćelija se razlikuju od KS-MMĆ, a bliže su EMĆ. MMĆ mogu biti izolovane i iz drugih regiona pupčanika poput perivaskularne zone i subamnionskog sloja, ali VS-MMĆ imaju najbolje osobine u smislu prinosa, vremena dupliranja populacije, klonogenog potencijala i matičnosti (Conconi i sar., 2011; Subramanian i sar., 2015).

Pokazano je da je prilikom izolovanja prinos dobijenih MMĆ iz pupčanika gotovo uvek veći u odnosu na MMĆ dobijenih iz kostne srži (Kalaszczynska i Ferdyn, 2015), i u proseku iznosi $1-5 \times 10^4$ ćelija/cm pupčanika (Karahuseyinoglu i sar., 2007). U poređenju sa KS-MMĆ, vreme dupliranja ćelijske populacije je kraće, a period do ulaska u senescenciju duži (Troyer i Weiss, 2008). Pored toga zabeleženo je da je u odnosu na MMĆ poreklom iz kostne srži i masnog tkiva, proliferativni kapacitet VS-MMĆ veći (Amable i sar., 2014; Hsieh i sar., 2010). Ipak, ono što ih izdvaja od drugih adultnih MĆ jeste to što su njihove karakteristike slične EMĆ. Humane VS-MMĆ eksprimiraju markere EMĆ, glavne regulatore pluripotentnosti, poput *NANOG*, *OCT4*, *SSEA3*, *SSEA* (od engl. *Stage-specific embryonic antigen*) 4 i *c-MYC* (Gao i sar., 2013; Nekanti, Mohanty, i sar., 2010). Pored toga, njihov diferencijacioni potencijal *in vitro* prevazilazi tkiva mezodermskog porekla, s obzirom da eksprimiraju i progenitorske markere ćelija srčanog, nervnog, tkiva jetre, kao i neuroglijalne markere (Gao i sar., 2013; Khodabandeh i sar., 2016; Messerli i sar., 2013). Ipak, s obzirom da je nivo ekspresije markera pluripotentnosti u odnosu na EMĆ manji (Fong i sar., 2011), kod VS-MMĆ ne postoji rizik od formiranja teratoma *in vivo* (D.-W. Kim i sar., 2013; Rachakatla i sar., 2007), a tome doprinosi i činjenica da ove ćelije pokazuju visok nivo

UVOD

ekspresije nekoliko tumor-supresorskih gena (*Fong i sar., 2011*). Pored toga, za razliku od adultnih MMC, održavaju telomere na najvećoj mogućoj dužini što ih štiti od preranog starenja i gubitka vijabilnosti (*Kalaszczynska i Ferdyn, 2015*). Ovo je jedna od glavnih osobina koja ove ćelije čini pogodnim za terapijsku primenu.

Značaju upotrebe ovih ćelija u alogenim transplantacijama, doprinosi i njihova niska imunogenost koja ih štiti od imunskog sistema domaćina. Naime, ekspresija MHC-I je niska, pri čemu VS-MMC ne ekspimiraju MHC-II i kostimulatorne molekule CD40, CD80, CD86, dok suIDO i PGE2 molekuli visoko ekspimirani (*Anzalone i sar., 2010; Cho i sar., 2007; Shuyun Liu i sar., 2012; Stubbendorff i sar., 2013*). VS-MMC sekretuju mnoge molekule koji doprinose njihovoj imunosupresivnoj funkciji, poput IL-6, VEGF, HLA-G6, a povećani su i nivoi IL-10 i TGF- β (*Shuyun Liu i sar., 2012; La Rocca i sar., 2009; Weiss i sar., 2008*). Imunosupresivne funkcije VS-MMC, ostvarene kako preko direktnih međućelijskih kontakata, tako i preko parakrinih efekata, dokazane su na ksenogenim i alogenim eksperimentalnim modelima (*Donders i sar., 2015; Tipnis i sar., 2010*). U odnosu na KS-MMC i MMC iz drugih tkiva, imunogenost ovih ćelija je niža (*D.-W. Kim i sar., 2013*), međutim prestimulacija IFN- γ može povećati imunogenost alogeno primenjenih VS-MMC putem povećanja ekspresije MHC-I i indukcije ekspresije MHC-II (*Cho i sar., 2007*). Pored toga, imunomodulatorne karakteristike VS-MMC slične su onim kod KS-MMC, mada su nivoi efektorskih molekula viši (*Prasanna i sar., 2010*), a pretretman proinflamatornim citokinima čak pojačava imunomodulatorni kapacitet ovih ćelija (*Donders i sar., 2015; Prasanna i sar., 2010*).

VS-MMC su do sada pored tkiva mezodermskog porekla (*Nagamura-Inoue, 2014*) u *in vitro* kontrolisanim uslovima uspešno diferencirale u neurone (*Bonilla-Porras i sar., 2017; Y.-S. Fu i sar., 2006; Hosseini i sar., 2015*), endotelske ćelije (*M. Y. Chen i sar., 2009*), ćelije nalik hepatocitima (*Mortezaee i sar., 2015; Prasajak i Leeansaksiri, 2013; Y.-N. Zhang i sar., 2009*), optičke ćelije sočiva (*Khatami i sar., 2014*), ćelije endometrijuma (*Q. Shi i sar., 2017*), kardiomiocite (*Corrao i sar., 2013; Nartprayut i sar., 2013; H.-S. Wang i sar., 2004*), miocite (*Conconi i sar., 2006; Troyer i Weiss, 2008*), epidermalne ćelije (*D. Chen i sar., 2015; D. Li i sar., 2014*), progenitorske ćelije retine (*Y. Hu i sar., 2013*) i insulin-produkujuće ćelije (*Anzalone i sar., 2011; P. J. Tsai i sar., 2015*).

UVOD

VS-MMĆ proizvode citokine, hemokine, interleukine i trofičke faktore uključene u regulaciju njihovih različitih funkcija poput samoobnove, migracije, diferencijacije i produkcije komponenti VCM. Ove ćelije karakteriše lučenje velikog broja različitih faktora rasta poput IGF-I, FGF, TGF- β , PDGF i EGF (*Sobolewski i sar., 2005*), a najznačajniji među njima je bFGF, koji reguliše samoobnovu, te njegovo prisustvo u medijumu pozitivno utiče na osteogenu i hondrogenu diferencijaciju MMĆ (*Kalaszczynska i Ferdyn, 2015*). Pokazana je i ekspresija hemokinskih receptora CXCR3, CXCR4 i CXCR6 (*Gao i sar., 2013*), uključenih u migraciju MĆ ka mestima oštećenja tkiva gde bi trebalo da učestvuju u tkivnoj regeneraciji.

Sve ove osobine, zajedno sa dostupnošću tkiva pupčanika, čine VS-MMĆ pogodnijim za primenu u regenerativnoj medicini u odnosu na KS-MMĆ. Tome doprinosi i činjenica da s obzirom da je pupčanik tkivo koje se nakon porođaja odbacuje i da su metode izolacije ćelija neinvazivne, korišćenje VS-MMĆ u istraživačke i terapijske svrhe nije etički kompromitovano. Zahvaljujući svojim osobinama, VS-MMĆ se koriste u istraživanjima terapije kancera, bolesti jetre, oštećenja perifernih nerava, kardiovaskularnog i vezivnog tkiva, gojaznosti i dijabetesa (*Watson i sar., 2015*). Takođe je pokazano da ove ćelije mogu da formiraju stromalne ćelije, slične sloju stromalnih ćelija neophodnih za održavanje hematopoetskih ćelija krvi iz pupčanika u dugotrajnim kulturama (*Bakhshi i sar., 2008*). U prekliničkim studijama na životinjskim modelima VS-MMĆ su se uspešno usadile u organe poput mozga, kože, srca, pluća i bubrega, a u skorije vreme intenzivnija su i istraživanja kod moždanih poremećaja i povreda, kao i na modelima kongenitalnih poremećaja poput bronhopulmonarne displazije, spine bifide i periventrikularne leukomalacije (*Joerger-Messerli i sar., 2016*). Prva klinička studija u kojoj se ispituje potencijal ovih ćelija registrovana je 2008. godine, a do sada je najveći broj kliničkih studija u fazi ispitivanja bezbedne upotrebe ovih ćelija (baza i registar kliničkih istraživanja *ClinicalTrials.gov*). Rezultati raznih istraživanja koji su do sada publikovani ne ukazuju na sporedne efekte primene ovih ćelija, i najčešće se sugerise primena u kombinaciji sa konvencionalnim terapijama.

1.2. MIKROSREDINA MMC

1.2.1. Koncept i definicija niše MMC

Kako bi se funkcija adultnih MĆ održala tokom životnog veka organizma, neophodno je održavanje balansa između mirovanja, samoobnove i diferencijacije što je regulisano različitim signalima koje primaju iz njihove lokalne mikrosredine (često nazivane i „niša MĆ“), zbog čega adultne ćelije generalno imaju drugačije funkcije kada se nalaze van ćeljske niše (*Fuchs i sar., 2004*).

Hipotezu niše MĆ prvi put je predložio *Schoefield*, pretpostavivši da MĆ obitavaju u fiksnim, fiziološki ograničenim odeljcima, ili nišama, koje obezbeđuju održavanje osobina MĆ (*Schofield, 1978*). Ova hipoteza podržana je kokulturama *in vitro*, kao i eksperimentima u kojima su niše koje su prethodno „ispražnjene“ zračenjem ili tretmanima raznim supstancama, transplantirane sa ćelijama kostne srži (opisano u *Linheng Li i Xie, 2005*). *Schoefield*-ov koncept niše odnosio se na hematopoetske mikrosredine kod sisara, ali se do prvih eksperimentalnih dokaza i karakterizacije niša došlo radom na *D. melanogaster* i *C. Elegans* (opisano u *Ferraro i sar., 2010*). Upotreba metoda za vizualizaciju i lokalizaciju MĆ u životinjskim modelima dovela je do saznanja o kompleksnijoj strukturi niša.

Dinamična regulacija biologije MĆ putem održavanja balansa njihovih osnovnih funkcija čini nišu MĆ konceptom važnim za medicinu (**Slika 3.**). Bez obzira na to što MĆ imaju visok potencijal proliferacije, niša s jedne strane održava MĆ u mirovanju i niskom metaboličkom stanju (*Fuchs i sar., 2004; Kuhn i Tuan, 2010*), dok u odvojenim, ali susednim lokacijama, podržava i MĆ podstaknute na proliferaciju, tako da mirujuće i aktivne subpopulacije MĆ koegzistiraju zajedno (*Greco i Guo, 2010; Linheng Li i Clevers, 2010*). U nišama MĆ precizna regulacija balansa između simetričnih i asimetričnih deoba kritična je za održavanje broja MĆ neophodnog za ispunjavanje potreba organizma.

1.2.2. Sastav niše

Istraživanja na prototipskim nišama, poput niša germinativnih ćelija, hematopoetskog sistema, epidermisa, intestinuma i folikula dlake (*Jones i Fuller, 2014*)

kao modelima, objasnila su nekoliko fizičkih i funkcionalnih karakteristika niše MĆ. Generalno usvojen model niše (*Wagers, 2012*) podrazumeva prisustvo: MĆ; stromalnih potporneih ćelija koje interaguju direktno sa MĆ i međusobno putem površinskih receptora, pukotinastih veza i solubilnih faktora; VĆM koji obezbeđuje strukturu, organizaciju i mehaničke signale; krvnih sudova koji provode sistemske i nutritivne signale i obezbeđuju regrutovanje inflamatornih i drugih cirkulišućih ćelija u nišu; i najzad nervnih ćelija koje sprovode udaljene fiziološke signale do mikrosredine MĆ (**Slika 3.**). Posebno je značajno da niša može da zadrži glavne funkcije i osobine, čak i u trenutnom odsustvu MĆ (poput trošenja MĆ putem tretmana zračenjem) dozvoljavajući regrutovanje i *homing* egzogenih MĆ u već postojeće niše (objašnjeno u *Fuchs i sar., 2004; Rompolas i sar., 2013*). Fundamentalne anatomske komponente i molekularni putevi niše su visoko evolutivno očuvani među vrstama, iako njihove uloge u samim nišama mogu biti različite (*Ferraro i sar., 2010*). Interakcije između MĆ i niše su recipročne, pa tako MĆ mogu da remodeluju nišu i sekretuju komponente VĆM u odgovoru na signale koje primaju (*Gattazzo i sar., 2014; Mesa i sar., 2015*). Iako se komponente različitih niša međusobno razlikuju (*Lander i sar., 2012*), jasno je da niša predstavlja kompleksni i dinamični entitet u kojem se integracijom višestrukih signala postiže kontrola ćelijskog broja i funkcija.

1.2.3. Biohemijaska i biofizička regulacija u niši MĆ

Solubilni faktori. MĆ, i druge ćelijske komponente niše, poput potpornih ćelija, sekretuju veliki broj važnih parakrinih regulatora ćelijskih funkcija, kao što su faktori rasta, citokini i hormoni (*Scadden, 2006; Vishwakarma i sar., 2017*), koji deluju lokalno ili difunduju kroz nišu (*Jones i Wagers, 2008*). Neke komponente VĆM su sposobne da vežu faktore rasta, regulišući lokalnu dostupnost i stvarajući biohemijaski gradijent. Na taj način VĆM može da funkcioniše kao rezervoar faktora rasta, ali i kao njihov distributer (*Gattazzo i sar., 2014; Wagers, 2012*). Stoga, ovakva aktivnost predstavlja jednu od najvažnijih osobina VĆM.

Pored sekretovanih proteina, mali molekuli i joni takođe predstavljaju važne signale u nišama. Tako, metabolički proizvodi, kakav je kalcijum, kao i koncentracija kiseonika kao metaboličkog supstrata i signalnog molekula istovremeno, utiču na ponašanje MĆ u niši jer reflektuju stanje tkiva u realnom vremenu i omogućavaju

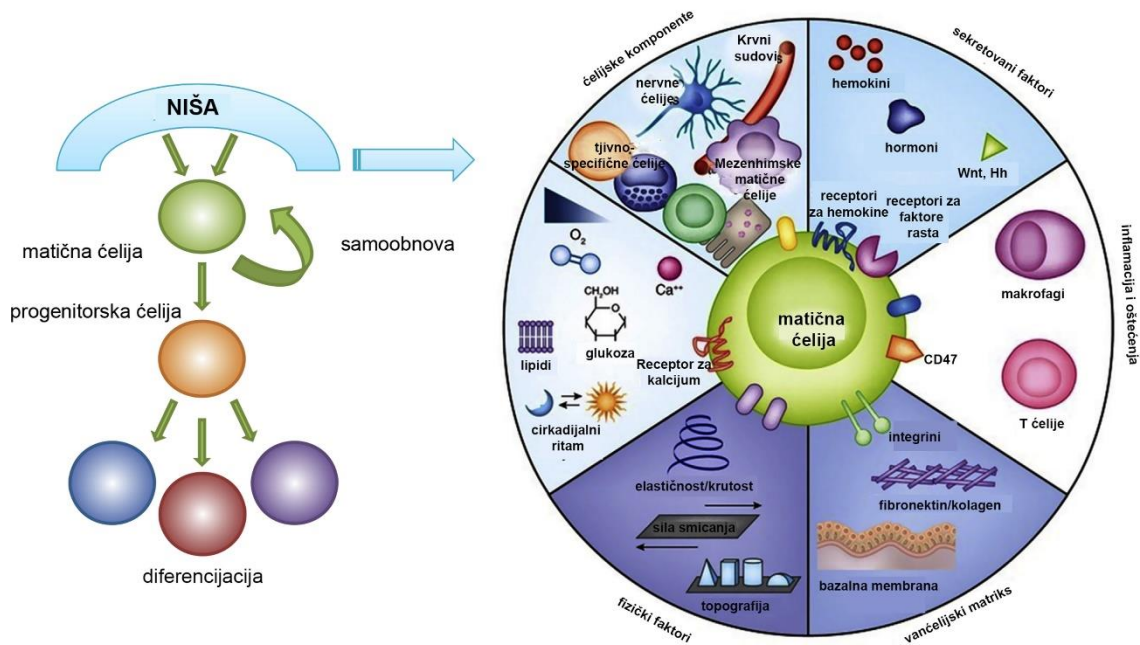
ćelijama da odgovore na te promene (*Scadden, 2006; Vishwakarma i sar., 2017*). Dosadašnja istraživanja identifikovala su neke od signalnih puteva karakterističnih za niše MĆ koji uključuju *Notch, Wnt, BMP*, ali se pokazalo da se njihova uloga razlikuje u različitim nišama (*Ferraro i sar., 2010; Jones i Fuller, 2014*).

Ćelijska adhezija. Ultrastrukturnu organizaciju niše čine ćelije, glikoproteini matriksa i tridimenzionalni prostor koji formiraju i njihov kontakt omogućava molekulske interakcije koje su kritične za regulisanje funkcija MĆ (*Scadden, 2006*). Fizička povezanost sa potpornim stromalnim ćelijama ili bazalnom laminom VĆM obezbeđuje održavanje MĆ u blizini signala koji ih regulišu. Adhezivne veze sa potpornim ćelijama niše moguće su zahvaljujući vimentinu (*Kuhn i Tuan, 2010*) i kadherinima, a interakcija sa bazalnom laminom VĆM putem integrina (**Slika 3.**) (*S. Chen i sar., 2012; Marthiens i sar., 2010*). Među glikoproteinima VĆM, tenascin-C i osteopontin (OPN) učestvuju u procesu adhezije povećavajući osetljivost ćelija na faktore rasta ili interagujući sa integrinima i zadržavaju MĆ u nišama (*Ferraro i sar., 2010*). Iako je ćelijska adhezija proces koji je kao način održavanja MĆ u potpornim nišama evolutivno očuvan, jasno je da različiti tipovi veza i molekula uključenih u taj proces mogu da se razlikuju u različitim nišama zbog različitih funkcija.

Mehanički i fizički faktori. Adhezija za komponente VĆM niše obezbeđuje podjednako važne mehaničke signale koji imaju veliki uticaj na funkcije MĆ. Biofizičke osobine mikrosredine, elastičnost, krutost i struktura VĆM, elektrostatički naboji i vlažnost regulišu funkcije i osobine MĆ (**Slika 3.**) (*Vishwakarma i sar., 2017*). Tako su određena istraživanja pokazala da se MMĆ kultivisane na elastičnoj podlozi diferenciraju kao nervnim ćelijama, dok su se ćelije kultivisane na rigidnijoj podlozi diferencirale u kost (*Engler i sar., 2006*). Ipak, krajnji efekat na sudbinu MĆ posledica je kompleksnog uzajamnog uticaja osobina VĆM i solubilnih faktora.

Prostorni signali. Topografska organizacija MĆ u odnosu na okolne potporne ćelije može takođe da ima važnu ulogu u održavanju odgovarajućeg broja ćelija (**Slika 3.**) Polarizovano vezivanje za potporne ćelije ili VĆM kroz spojne komplekse, ili asimetrično lokalizovane faktore u niši, može da obezbedi signale koji regulišu deobe i određuju sudbinu MĆ (*Fuchs i sar., 2004; Jones i Fuller, 2014; Mesa i sar., 2015*).

Iako literatura sugerše da su za funkcionisanje MĆ u nišama neophodne potporne ćelije, ipak postoje anatomske lokacije gde one nedostaju (*Jones i Wagers, 2008*).



Slika 3. Funkcije i komponente niše MĆ. Modifikovano po *Vishwakarma i sar., 2017*. Objašnjenje u tekstu.

1.2.4. Dinamika i fleksibilnost niše

S obzirom na kompleksnost niše i interakcija koje se u njoj odvijaju, jasno je da njeno nastajanje i aktivnost moraju biti strogo regulisani. U mnogim sistemima niše nastaju u odvojenim razvojnim periodima i njihova pojava omogućava nastanak ili regrutovanje MĆ na posebne anatomske lokacije. Niše mogu nastati tokom razvoja od heterolognih ćelijskih tipova, i mogu postojati čak i pre nego što se u njih nastane MĆ; ali MĆ i potporne ćelije sa kojima interaguju mogu da se razviju i zajedno, uz međusobnu zavisnost koja je određena lokalizacijom i interakcijama (*Fuchs i sar., 2004; Jones i Wagers, 2008*). Broj MĆ je kontrolisan dostupnošću niša sa potrebnim signalima za samoobnavljanje i preživljavanje (*Jones i Fuller, 2014*), i niše moraju da budu dinamične celine kako bi obezbedile odgovarajuće razvojne i homeostatske signale za regulaciju sudbine MĆ na tkivno specifičan način i u odgovoru na različite fiziološke stimulse i patološke uslove. Promene u funkcionisanju niša mogu da dovedu

do sledstvenog gubitka ili deregulacije tkivnih MĆ što je jedan od glavnih faktora u osnovi patogeneze niza bolesti povezanih sa degeneracijom tkiva, starenjem i tumorigenezom (*Jones i Wagers, 2008; Kuhn i Tuan, 2010*)

1.2.5. Specifične mikrosredine MĆ

1.2.5.1. Inflamacija

Inflamacija predstavlja jedan vid lokalnog ili sistemskog zaštitnog adaptivnog odgovora organizma izazvanog infekcijom, oštećenjem ili povredom tkiva (*Goldsby i sar., 2002*). Do sada je ostvaren veliki napredak u razumevanju molekularnih mehanizama koji posreduju u akutnoj inflamaciji tokom infekcije i oštećenja tkiva, kao i u razjašnjavanju uzroka koji dovode do lokalne hronične inflamacije u hroničnim infekcijama i autoimunskim bolestima. Međutim, još uvek nije u potpunosti poznato koji su uzroci i mehanizmi uključeni u hroničnim infekcijama brojnih bolesti, poput dijabetesa 2 i kardiovaskularnih bolesti, mada je ukazano na povezanost sa nepravilnim funkcionisanjem tkiva, odnosno sa homeostatskom neravnotežom koja nije direktno funkcionalno povezana sa odbranom domaćina ili popravkom tkiva (*Medzhitov, 2008*). U zavisnosti od okidača, inflamatorni odgovor ima različitu fiziološku svrhu i patološke posledice. Od tri moguća inicirajuća stimulis, samo infekcija dovodi do inflamacije povezane sa indukcijom imunskog odgovora.

Opšti inflamatorni mehanizam podrazumeva učešće okidača inflamacije, tj signala na koje reaguju senzori, koji posredstvom medijatora aktiviraju efektore inflamacije (ćelije i tkiva), koji se prilagođavaju uslovima izazvanim odgovarajućim okidačima. Ovi kompleksni i dinamični putevi dovode do inflamatornog odgovora koga karakterišu vazodilatacija, povećanje permeabilnosti kapilara i influks fagocita (*Goldsby i sar., 2002*). Inflamaciju mogu izazvati spoljašnji faktori, koji pored mikroba obuhvataju i alergene, strana tela, toksične supstance, ili unutrašnji faktori, kakvi su signali koje produkuju oštećena tkiva, tkiva pod stresom ili tkiva sa lošom funkcijom (*Medzhitov, 2008*). Inflamatorni medijatori su takođe mnogobrojni i raznovrsni i prema biohemijskim svojstvima mogu biti vazoaktivni amini i peptidi, lipidi, hemokini, proteolitički enzimi i citokini (*Goldsby i sar., 2002*). Mnogi od ovih medijatora imaju zajedničke efekte, a mogu nastati iz neaktivnih prekursora u plazmi ili kao produkti

specijalizovanih ćelija (naročito tkivnih makrofaga i mast ćelija) ili ćelija lokalnih tkiva. Na njihovo delovanje reaguju različiti tipovi ćelija poput endotelskih ćelija, hepatocita, leukocita, MMC i drugih. Odgovori na određene inflamatorne medijatore, poput TNF-a i IL-1, su skoro sveprisutni, mada ovi citokini imaju različite efekte na različite tipove tkiva i ćelija. Pored stvaranja eksudata (kroz dejstvo na vaskulaturu i migraciju leukocita), mnogi inflamatorni medijatori imaju i druge, podjednako važne, efekte na neuroendokrine i metaboličke funkcije i na održavanje tkivne homeostaze uopšte. Plastičnost MMC omogućava lokalnoj mikrosredini da oblikuje, između ostalog imunoregulatorne efekte tkivno specifičnih MMC. Tako MMC pojačavaju imunske odgovore tokom ranih faza inflamacije, dok s druge strane, u prisustvu dovoljnog nivoa proinflamatornih citokina suprimiraju imunski odgovor i inflamaciju kako bi doprinele održavanju homeostaze (Bernardo i Fibbe, 2013). Razumevanje biologije MMC u inflamaciji može imati implikacije na upotrebu MMC u ćelijskoj terapiji.

1.2.5.1.1. Interleukin-17 familija citokoina

Citokini iz porodice interelukina 17 (IL-17) su proinflamatorni medijatori koji imaju značajnu ulogu u regulaciji inflamacije, autoimunosti i odbrani domaćina od patogena. Za sada je identifikovano šest članova porodice ovog citokina, IL-17A–F, i 5 članova porodice receptora za IL-17 (IL-17R), IL-17RA–E. Prvootkriveni član porodice IL-17 ujedno i najviše istraživani, IL-17A (IL-17), dobijen je prvi put 1993.godine kloniranjem pomoću T ćelijskog hibridoma glodara (Rouvier i sar., 1993) i nazvan je antigen citotoksičnih T limfocita (CTLA8, od engl *cytotoxic T lymphocyte antigen 8*). Potom je klonirana i virusna forma, HVS13 iz T- limfotropnog *Herpesvirus samirii* (Zhengbin Yao i sar., 1995), kao i humana IL-17A iz biblioteke CD4⁺ T ćelija (Z Yao i sar., 1995). Aminokiselinski sastav humanog IL-17A pokazuje 63% homologije sa CTLA8 i 72% sa virusnom formom IL-17.

Ubrzo su različitim metodama klonirani i identifikovani i ostali članovi porodice citokina- IL-17B, C, D i E (Lee i sar., 2001; H. Li i sar., 2002; Y. Shi i sar., 2000; Starnes i sar., 2001, 2002). Sa IL-17A se često proizvodi i IL-17F (S. H. Chang i Dong, 2009), a iako su blisko locirani na humanom hromozomu 6, njihove ekspresije su različito regulisane u raznim patološkim stanjima. Profil ekspresije članova porodice IL-17 u tkivima je raznolik, a lokalizacije njihovih gena su rasute po genomu. Poređenje

humanog IL-17 sa drugim vrstama pokazalo je da su članovi ove porodice citokina evolutivno visoko očuvani među kičmenjacima.

Istraživanja IL-17 intenzivirana su nakon otkrića podgrupe pomoćničkih T limfocita, CD4⁺ T ćelija koje proizvode IL-17, označenih kao Th17 ćelije, i otkrića njihove patološke uloge u inflamatornim i autoimunskim bolestima. Diferencijacija naivnih CD4⁺ T ćelija u Th17 ćelije indukovana je i usko kontrolisana, setom citokina koji uključuju IL-6, IL-1b, IL-21, IL-23 i TGF-β, što vodi do aktivacije RORγt i omogućava programiranje Th17 (*Korn i sar., 2009*). Dugo se smatralo da su Th17 ćelije glavni izvor IL-17A, međutim to nije objašnjavalo kako su rani imunski odgovori tokom stresa i odbrana domaćina od patogena uključivali ovaj citokin. U sledstvenim eksperimentima pokazano je postojanje ćelijskih populacija koje proizvode IL-17 bez indukcije obrađenim antigenima nakon stresa ili povrede. Među njima su najistaknutije ćelije urođenog imunskog sistema poput γδT ćelija (CD27⁻ γδT), NK ćelija, LTI ćelija (imunske ćelije limfoidnog sistema), invarijantnih NKT ćelija, podgrupe CD8⁺ T ćelija (Tc17 ćelije) i B ćelija (*Cua i Tato, 2010*). Pored ovih ćelija, IL-17 može biti i proizvod panetovih ćelija, neutrofila, mast ćelija, makrofaga, i epitelskih ćelija (*Cua i Tato, 2010; Lai i Dong, 2016*). S obzirom na to da su ove ćelije lokalizovane na površinama na kojima se ostvaruje kontakt domaćina i patogena (pluća, creva, jetra, koža) sugerise se na širok raspon njihovih imunoregulatornih funkcija koje još uvek nisu razjašnjene.

1.2.5.1.2. Struktura interleukina-17 i njegovog receptora

Svih šest formi IL-17 su strukturno slične i zajedničke su im četiri visoko očuvane cisteinske rezidue uključene u formiranje unutarlančanih disulfidnih veza i dve ili više cisteinskih rezidua koje mogu da formiraju unutarlančane disulfidne veze, s tim što svaka od njih ima svoje posebne karakteristike (*Lai i Dong, 2016*). IL-17A i F su najbolje okarakterisani članovi ove porodice citokina i pokazuju 56% homologije (*Gu i sar., 2013; Krstić i sar., 2015*). Oba citokina su kovalentni homodimeri, ali mogu formirati i IL-17A–IL-17F heterodimer (*Wright i sar., 2008*).

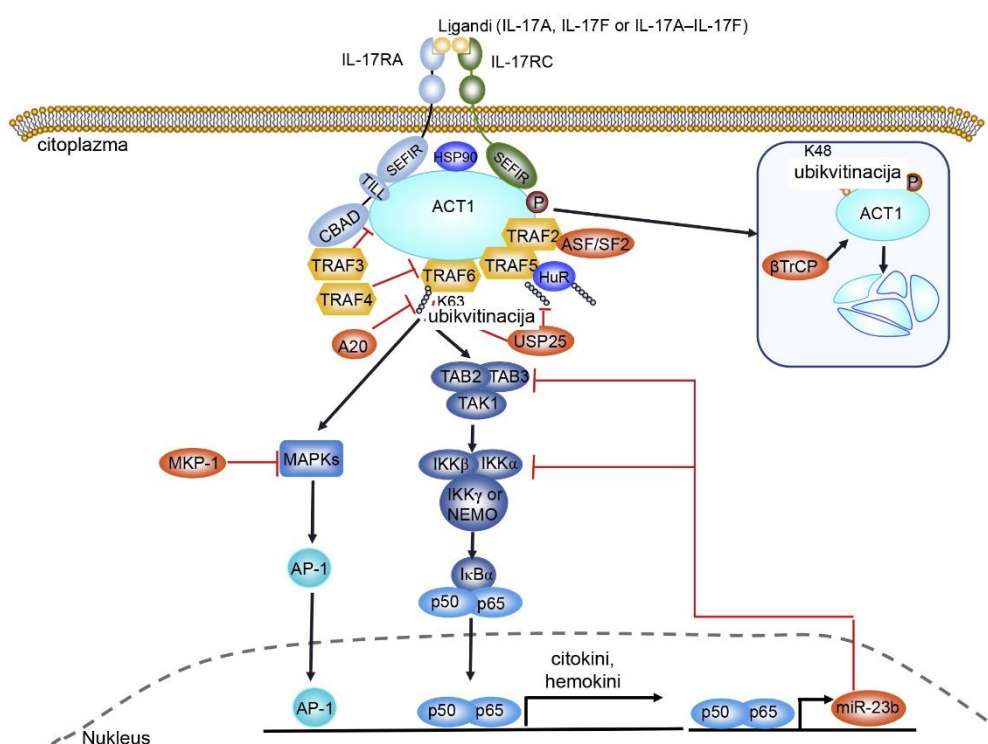
Porodica IL-17R broji pet članova sa homologijom u sekvenci. Subjedinice ovih receptora su transmembranski proteini koji sadrže dva regiona nalik fibronektinu tipa III (FNIII) u vanćelijskom domenu, dok je citoplazmatski SEFIR domen (od engl. *similar expression of fibroblast growth factor genes and IL-17Rs*, SEF/IL-17R) na C-terminusu

visoko evolutivno očuvan (Krstić i sar., 2015; Lai i Dong, 2016; Novatchkova i sar., 2003). Najveća homologija u okviru ove porodice je upravo u SEFIR motivu što ukazuje na to da je signalizacija posredovana IL-17R verovatno različita od ostalih receptora za citokine. Na C terminusu nishodno od SEFIR motiva isključivo kod humanog IL-17RA, nalazi se TILL domen (od engl. *TIR-like loop*) koji je kritičan za aktivaciju nishodnih signalnih puteva (Gaffen, 2009). IL-17RA je ubikvitarno eksprimiran na velikom broju tkiva i ćelija i vezivanjem IL-17 inicira se aktivacija nishodnih signalnih puteva kako bi se indukovala produkcija proinflamatornih molekula. IL-17RA sam po sebi nije dovoljan za ovu signalizaciju već formira heterodimerni receptorski kompleks sa IL-17RC (Toy i sar., 2006). Smatra se se da vezivanje liganda za jednu subjedinicu menja afinitet i specifičnost drugog vezivanja promovšući formiranje heterodimernog radije nego homodimernog receptorskog kompleksa (Ely i sar., 2009). Pored IL-17A, IL-17F i njihov heterodimer vezuju se za ovaj receptorski kompleks (Toy i sar., 2006). Međutim, njihove biološke uloge su različite, pri čemu IL-17A ima značajniju ulogu u autoimunosti i pretpostavlja se da je moguć razlog za to različit afinitet vezivanja za IL-17A komponentu kompleksa (Wright i sar., 2008), ili da varirajući odnosi monomera u IL-17A–IL-17C receptorskom kompleksu mogu dovesti do različitih preferencija za ligande (Gaffen, 2009). IL-17RA može formirati receptorske komplekse i sa IL-17RB, E ili D za koje se vezuju IL-17E, IL-17C i još uvek neidentifikovan ligand (Mellett i sar., 2012; Rickel i sar., 2008; Song i sar., 2011). Mnogi od ovih receptora postoje kao alternativno splajsovane izoforme od kojih neke možda ne sadrže transmembranske ili citoplazmatične domene, i na taj način nastaje solubilna izoforma IL-17RA koja ima inhibitorni efekat na IL-17A. Ovi receptori su evolutivno dobro očuvani i kod miša, i sličnost na proteinskom nivou između humanih i mišjih homologa je visoka.

1.2.5.1.3. Signalni putevi aktivirani IL-17

Vezivanjem IL-17A za IL-17RA–IL-17RC receptorski kompleks, dolazi do direktnog vezivanja za adaptorski protein ACT1 (od engl. *activator 1*) putem SEFIR motiva i TILL domena IL-17RA (S. H. Chang i sar., 2006), što dovodi do prenosa signala do nishodnih molekula (**Slika 4.**). Ovaj citosolni protein aktivira I κ B kinazu (IKK), i posledično otpuštanje NF- κ B iz kompleksa sa I κ B, a njegov nedostatak u

ćelijama ima za posledicu odsustvo produkcije proinflamatornih citokina zavisnih od IL-17 (S. H. Chang i sar., 2006; Qian i sar., 2007). Pored uloge adapterskog proteina koji regrutuje TRAF (faktore povezane sa TNFR, od engl. *TNFR-associated factor*) i usmerava aktivaciju nishodne signalizacije, ACT1 takođe služi i kao E3-ubikvitin ligaza koja olakšava ubikvitinaciju ciljnih proteina za posledične međuproteinske interakcije (C. Liu i sar., 2009). Pored NFκB, IL-17 aktivira signalni put mitogenom aktivirane proteinske kinaze (MAPK, od engl. *mitogen-activated protein kinase*) (Lai i Dong, 2016). Sam po sebi, IL-17A je slab aktivator NFκB, ali ima sposobnost da sa drugim citokinima poput TNF-α deluje sinergistički sa ciljem da pospeši i pojača proinflamatorne odgovore (Hartupee i sar., 2007). Značajni negativni regulatori IL-17 signalizacije su TRAF4 i TRAF3 koji interferiraju sa formiranjem IL-17R–Act1–TRAF6 kompleksa (Zepp i sar., 2012; Zhu i sar., 2010). Ometanje vezivanja za TRAF6 onemogućavaju i deubikvitinaza A20 i IL-17RD inhibirajući tako signalizaciju ovim citokinom (Garg i sar., 2013; Mellett i sar., 2012).



Slika 4. Signalna transdukcija preko IL-17R. Modifikovano po Lai i sar., 2016. Objašnjenje u tekstu.

1.2.5.1.4. Biološka uloga IL-17

Aktivacija signalnih puteva indukovanih IL-17 dovodi do produkcije citokina, hemokina, inflamatornih efektora i antimikrobnih proteina. Različiti tipovi ćelija odgovaraju na IL-17 ekspresijom ciljnih gena na različit način, vodeći tako do različitih efekata, bilo blagotvornih ili štetnih za domaćina. IL-17A i IL-17F najviše doprinose odbrani domaćina od bakterijskih i gljivičnih patogena na epitelnim i mukoznim barijerama, i funkcionišu preko regrutovanja neutrofila, pozitivne regulacije antimikrobnih molekula i proizvodnjom proteina akutne faze (*Jin i Dong, 2013*). U nedostatku ovih citokina dolazi do osetljivosti domaćina na različite patogene, a deregulisana produkcija IL-17A i IL-17F može da rezultuje prekomernom ekspresijom drugih proinflamatornih citokina i hroničnom inflamacijom, što vodi do oštećenja tkiva i autoimunosti. Visoki nivoi IL-17A pronađeni su kod pacijenata sa multiplom sklerozom, psorijazom, astmom, Kronovom bolesti, reumatoidnim artritisom ali i kolorektalnim kancerom (*Jin i Dong, 2013; J. Liu i sar., 2011*). Široka uloga IL-17A u mnogim autoimunskim bolestima čini ovaj citokin idealnim ciljnim molekulom za terapije, i humanizovana IL-17A antitela su se pokazala uspešnim za lečenje RA, psorijaze i uveitisa (*Jin i Dong, 2013*).

Stromalne ćelije, uključujući humane i mišje MMĆ, ekspimiraju visok nivo IL-17R (*H. Huang i sar., 2009; Mojsilović i sar., 2011; Wilson A. Silva i sar., 2003*), međutim efekti koje ovaj citokin ostvaruje na MMĆ su još uvek nedovoljno istraženi. Do sada je pokazano da IL-17 stimuliše proliferaciju mišjih i humanih KS-MMĆ (*H. Huang i sar., 2009; Mojsilović i sar., 2011*). Takođe, kod humanih KS-MMĆ, pojačava osteogenu (*H. Huang i sar., 2009; Osta i sar., 2014*), a inhibira adipogenu (*Shin i sar., 2009*) i hondrogenu diferencijaciju (*Kondo i sar., 2013*). Istraživanja efekata na osteogenezu mišjih MMĆ dala su dvosmislene rezultate s obzirom da IL-17 nije uticao na diferencijacioni potencijal MMĆ ka osteoblastima, dok je s druge strane suprimirao osteogenu diferencijaciju MMĆ putem I κ B kinaze i NF κ B (*J. Chang i sar., 2013; Mojsilović i sar., 2011*). Pored toga, zabeleženo je da IL-17 stimuliše migraciju humanih KS-MMĆ (*H. Huang i sar., 2009*) i pojačava imunosupresivna svojstva mišjih i humanih MMĆ (*Han i sar., 2014; Sivanathan i sar., 2015*). Ipak, uloga IL-17 u

fiziologiji MMC se još uvek istražuje i malo se zna o njegovoj ulozi u migraciji MMC i homingu do zapaljenog tkiva.

1.2.5.2. Kiseonik i hipoksija

Kiseonik (O_2) je osnovna komponenta mikrosredine neophodna za aktivnost i metabolizam ćelija, te je kontrolisanje oksigenacije vitalno za održavanje ćelijskih funkcija. Za opisivanje različitih nivoa oksigenacije upotrebljava se nekoliko termina: 'normoksija' - atmosferski pritisak O_2 , uglavnom korišćen za ćelijske kulture u standardnim laboratorijskim uslovima; „tkivna normoksija“ (često nazivana i „fizioksija“) odgovara nivoima O_2 merenim u različitim organima u fiziološkim uslovima; i „hipoksija“ koja podrazumeva niži nivo O_2 u odnosu na fizioksiju i koji se odnosi na smanjenu oksigenaciju u tkivima (*Carreau i sar., 2011; Ivanovic i Vlaski-Lafarge, 2016*). S obzirom na drastične efekte koje oksidativni stres vrši na ćelije, precizno određivanje tačnih nivoa O_2 u kojima ćelije originalno funkcionišu je fundamentalno. Fiziološka koncentracija O_2 u tkivima se kreće od 1% u hrskavici, 0-7% u kostnoj srži, do 10-14% u plućima, jetri i cirkulaciji i u zavisnosti od vaskularizacije i funkcionalne aktivnosti tkiva i organa iz kojih potiču, različite koncentracije O_2 utiču na održavanje specifičnih osobina i funkcija MMC.

1.2.5.2.1. Struktura faktora koji regulišu odgovor na smanjenu oksigenaciju

S obzirom na stres koji stvara nedostatak O_2 , kao i mogućnost stvaranja reaktivnih oblika O_2 , metazoe su razvile ćelijske metaboličke i sistemske fiziološke sisteme čija je uloga regulisanje kiseonične homeostaze, a koji su se evolutivno očuvali do danas. Kod sisara, proces odgovora na promenu u oksigenaciji regulisan je faktorom indukovanim hipoksijom (HIF, od engl. *hypoxia-inducible factor*).

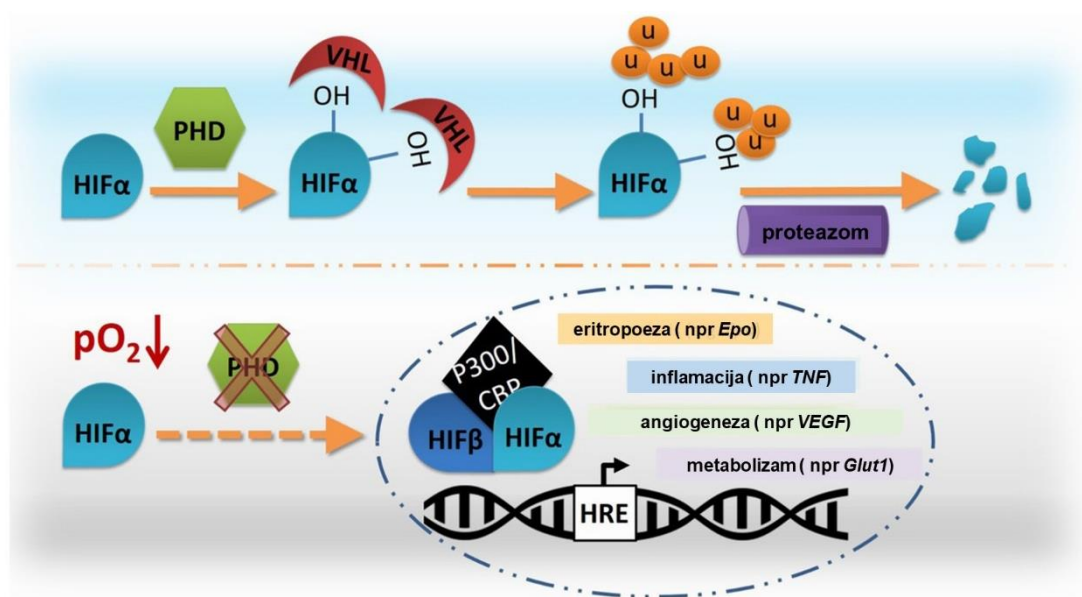
HIF su transkripcioni faktori koji se sastoje od α subjedinice zavisne od O_2 , i konstitutivno eksprimirane β subjedinice. Kod sisara postoje tri izoforme HIF- α , među kojima su HIF-1 α i HIF-2 α strukturno najslabije i najbolje okarakterisane. HIF1- α , prva je opisana α subjedinica i glavni je regulator odgovora na hipoksiju (*G. Semenza i Wang, 1992*). Eksprimirana je ubikvitarno u svim ćelijama (*G. L. Wang i Semenza,*

1993), dok su HIF-2 α i HIF-3 α selektivno eksprimirane u određenim tkivima (Majmundar i sar., 2010).

Obe subjedinice imaju bazične heliks-petlja-heliks (bHLH, od engl *helix-loop-helix*) domene koji sadrže PAS (od engl *periodic-aryl hydro- carbon receptor nuclear translocator-single-minded*, Per–Arnt–Sim) neophodne za heterodimerizaciju i vezivanje za DNK (G. L. Wang i sar., 1995). HIF- α subjedinica sadrži i domen za degradaciju koji je zavisen od O₂, ODD (od engl *oxygen-dependent degradation*) i dva transaktivaciona domena (TAD), za usmeravanje na proteazomalnu degradaciju i regulaciju ciljnih gena (Masson i sar., 2001).

1.2.5.2.2. Molekularna regulacija odgovora na hipoksiju posredovana faktorom indukovanim hipoksijom

U uslovima atmosferskog O₂, HIF-1 α protein se brzo degradira usled hidroksilacije prolil-hidroksilazom (PHD, od engl. *prolyl hydroxylase protein*) koja koristi O₂ kao supstrat (Slika 5.) (Kaelin i Ratcliffe, 2008). Ovako hidroksilovane proteine prepoznaje E3 ubikvitin ligaza, Von Hippel–Lindau (VHL) protein i obeležava za proteozomalnu degradaciju (Jaakkola i sar., 2001). U hipoksičnim uslovima, aktivnost PHD je inhibirana i stabilizovana HIF-1 α subjedinica se translocira iz citoplazme u jedro gde se vezuje za HIF1- β kako bi aktivirala ciljne gene (Slika 5.) (Wenger, 2002). Kod kičmenjaka, HIF-2 α je takođe regulisan hidroksilacijom i dimerizuje sa HIF1- β , ali je eksprimiran na ćelijsko-ograničen način (G. L. Semenza, 2012). HIF heterodimeri prepoznaju i vezuju se za konsenzusnu sekvencu 5'-(A/G)CGTG-3' u okviru elemenata responsivnih na hipoksiju, HRE (od engl. *hypoxia response elements*) (W. Liu i sar., 2012). Ovi transkripcioni faktori uglavnom funkcionišu kao aktivatori (Mole i sar., 2009) i geni koje predominantno regulišu su različiti (C.-J. Hu i sar., 2003; Warnecke i sar., 2004). Za razliku od njih, transkripciona aktivnost HIF-3 α je veoma slaba i za sada se malo zna o tome koje gene reguliše (Suzuki i sar., 2017). Transkripciona aktivnost HIF zavisi od vezivanja sa transkripcionim kofaktorima CBP i p300 (Kallio i sar., 1998). HIF- inhibirajući faktor (FIH-1, od engl. *factor-inhibiting HIF-1*) reprimira transkripcionu aktivnost HIF-1 α hidroksilacijom asparagina blokirajući tako vezivanje HIF1 α sa p300 koaktivatorom (Lando i sar., 2002).



Slika 5. Regulacija odgovora na nisku oksigenaciju putem HIF molekula. Modifikovano po *Sormendi i sar., 2017.* Detaljno objašnjenje u tekstu. U- ubikvitin; Epo-eritropoetin; TNF- faktor nekroze tumora; VEGF- vaskularni endotelni faktor rasta; Glut1-glukozni transporter 1.

Regulacija transkripcione aktivnosti HIF-1 zavisi od aktivacije različitih kinaznih puteva, poput PI-3 kinaze (PI-3K)/Akt signalnog puta kao i ERK (kinaze regulisane vanćelijskim signalima, od engl. *extracellular signal-regulated kinases*) i p38 kinaza MAPK puta (*Minet i sar., 2001*). Ipak, tačni mehanizmi njihove regulacije su još uvek nedovoljno istraženi. Pokazano je da HIF-3 α kompetitivno suprimira transkripcionu aktivnost HIF1/2- α okupacijom HIF- β subjedinice i HRE (*Tanaka i sar., 2009*), a kako se ekspresija HIF-3 α indukuje u uslovima hipoksije kroz regulaciju HIF1/2- α moguće je da HIF-3 α igra ulogu u negativnoj povratnoj regulaciji ekspresije gena indukovanih hipoksijom.

HIF-1 α interaguje sa, i stimuliše transkripcionu aktivnost Notch, koji igra glavnu ulogu u mnogim razvojnim putevima (*Gustafsson i sar., 2005*). Iako se HIF smatraju glavnim regulatorima odgovora na hipoksiju, identifikovano je i nekoliko alternativnih puteva koji doprinose adaptaciji i odgovoru ćelije na hipoksiju (*D'Ignazio i Rocha, 2016*). Ovi putevi se često ukrštaju sa signalizacijom putem HIF.

1.2.5.2.3. Biološki efekti hipoksije

HIF-1 je inicijalno identifikovan kao regulator produkcije eritropoetina (EPO) (G. Semenza i Wang, 1992; G. L. Wang i Semenza, 1995). Regulacija metabolizma je njegova osnovna funkcija i u hipoksičnim uslovima ovaj faktor posreduje u tranziciji od oksidativnog do glikolitičkog metabolizma. S obzirom da se veći deo embriogeneze sisara dešava na koncentracijama 1–5% O₂, pokazano je da HIF-1 i HIF-2 imaju važne uloge u razvoju cirkulatornog sistema, kao i da HIF-1 α učestvuje u hondrogenezi, adipogenezi, osteogenezi, hematopoezi, razvoju B limfocita, diferencijaciji T limfocita i urođenoj imunosti, a HIF2-a u eritropoezi, vaskularizaciji, pulmonarnom razvoju (Majmundar i sar., 2010; G. L. Semenza, 2012). HIF-1 je protektivni medijator u brojnim bolestima i patološkim stanjima, te se u ovim slučajevima pažnja usmerila ka razvoju terapeutika koji će delovati na nivou inhibicije PHD. Međutim, kako aktivnost HIF može i da doprinese nekim patološkim stanjima, za potrebe tretmana bolesti razvijaju se inhibitori aktivnosti HIF koji su za sada, na mišjim modelima pokazali da imaju antitumorske efekte (G. L. Semenza, 2012).

S obzirom na terapijski potencijal MMC i činjenicu da se prirodno nalaze u tkivima u kojima su koncentracije O₂ niske, jedan broj istraživanja fokusiran je na ispitivanja funkcija MMC u takvim mikrosredinama. Niske koncentracije O₂ (1-10%) utiču na diferencijaciju, proliferativni kapacitet, ekspresiju gena matičnosti, te apoptozu i migratorni potencijal humanih i mišjih MMC izolovanih iz kostne srži, humanih MMC pupčanika, masnog tkiva, periferne krvi, krvi pupčanika i drugih izvora (Buravkova i sar., 2014; Ejtehadifar i sar., 2015). Kao i kod drugih ćelija, hipoksija ove efekte ostvaruje posredstvom HIF molekula i posledičnom aktivacijom različitih signalnih puteva. Međutim, efekti koje hipoksija ostvaruje na MMC su različiti i zavise od tipa ćelija, koncentracije O₂ i eksperimentalog dizajna, a mnoga istraživanja su u određenoj meri dala oprečne rezultate, što je posebno izraženo u slučajevima kratkotrajnih izlaganja MMC hipoksiji (Buravkova i sar., 2014). Akutno, kratkotrajno smanjenje koncentracije O₂ može izazvati oštećenje ćelija, koje uključuje apoptozu, dok se sa dužim izlaganjem hipoksičnim uslovima, MMC brzo prilagođavaju takvoj mikrosredini, prebacivanjem metabolizma na anaerobnu glikolizu, praćenu održavanjem nediferenciranog multipotentnog stanja (Basciano i sar., 2011). Razlike u izolaciji i

UVOD

poreklu ispitivanih MMC, kao i u eksperimentalnom dizajnu, otežavaju poređenje i analizu dobijenih rezultata te stoga izostaju konkretniji/generalni zaključci o ulozi hipoksije u biologiji MMC. Ipak, koncentracija O₂ nesumnjivo predstavlja važan regulator koji određuje sudbinu MMC i potreba za daljim proučavanjem njenog efekta na stromalne prekursore povezana je sa funkcijama koje oni obavljaju u popravci tkiva, sa ciljem razvoja strategija za ćelijsku terapiju i tkivni inženjering.

2. *CILJEVI*



Zahvaljujući saznanjima da dinamični odeljci kakve su niše MMĆ, obezbeđuju integraciju različitih signala koji određuju sudbinu MMĆ i usmeravaju ih ka određenoj funkciji, sve se više teži ka definisanju uloge i mehanizama delovanja što većeg broja faktora specifične mikrosredine. Poznato je da su terapijski efekti MMĆ zasnovani na njihovom potencijalu smoobnove, regenerativnom, imunomodulatornom i migratornom kapacitetu, ali i pored velikog broja prekliničkih istraživanja i kliničkih studija, o njihovom realnom ukupnom terapijskom potencijalu se još uvek nedovoljno zna. Stoga, poznavanje ponašanja MMĆ u specifičnim mikrosredinama obezbedilo bi saznanja korisna za razvoj efikasnih terapija koje uključuju primenu ovih ćelija.

Uloga proinflamatornog citokina IL-17, produkta pomoćničkih T ćelija dokazana je u brojnim inflamatornim i autoimunskim bolestima. Međutim, ovaj citokin ostvaruje efekte i na različite ćelijske funkcije poput diferencijacije, proliferacije i migracije, koji su ispitivani i opisani i na MMĆ, uglavnom iz kostne srži. Uprkos tome, efekti IL-17 na biologiju MMĆ još uvek nisu u potpunosti objašnjeni. MMĆ su u svojim prirodnim mikrosredinama izložene niskim koncentracijama O₂, koje su posledica balansa njegovog dotoka i upotrebe u tkivu, i u zavisnosti od metaboličkog i funkcionalnog statusa određenog tkiva nivoi oksigenacije u organizmu su različiti. Do sada je pokazano da niske koncentracije O₂ regulišu različite funkcije MMĆ i da su ključni faktor koji doprinosi fiziologiji ovih ćelija, ali je jedan broj istraživanja koji se tiče efekata na njihov diferencijacioni potencijal kontradiktoran.

Stoga su istraživanja u okviru ove doktorske disertacije imala za cilj ispitivanje efekata specifičnih uslova mikrosredine na funkcionalna svojstva primarnih MMĆ izolovanih iz humanog pupčanika i periferne krvi. Uporednom analizom funkcionalnih karakteristika odredio bi se proliferativni i diferencijacioni kapacitet MMĆ izolovanih iz ova dva alternativna izvora matičnih ćelija. MMĆ izolovane iz periferne krvi bile bi primenjene kao model migratornih ćelija, za analizu uticaja proinflamatorne mikrosredine na regulaciju/modulaciju migratornog potencijala MMĆ. Ova istraživanja će doprineti boljem razumevanju delovanja IL-17 kao hemotaktičnog faktora za MMĆ i njegovog uticaja na pokretljivost i funkcije MMĆ tokom inflamatornih procesa. S druge strane, na modelu MMĆ iz tkiva pupčanika bili bi analizirani efekti fiziološke (3%) i „laboratorijske“ (21%) koncentracije O₂ što će doprineti određivanju povoljnijih uslova

CILJEVI

za kultivaciju MMĆ u cilju postizanja boljeg kvaliteta uzorka za potencijalnu primenu u ćelijskoj terapiji.

U skladu sa predmetom istraživanja u okviru ove disertacije postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Izolacija i karakterizacija MMĆ iz humanog pupčanika i periferne krvi:

- Izolacija VS-MMĆ metodom eksplanta i njihova ekspanzija u kulturi;
- Izolacija PK-MMĆ metodom centrifugiranja u gustinskom gradijentu;
- Karakterizacija MMĆ putem
 - određivanja sposobnosti adhezije ćelija za plastiku;
 - analiziranja imunofenotipa, određivanjem ekspresije karakterističnih mezenhimalnih (CD29-PE, CD44H-PE, CD73-PE, CD90-PE, CD105-PE) i hematopoetskih (CD34-PE, CD45-FITC, CD235a-PE i CD11b-FITC) markera primenom protočne citometrije;
 - određivanja sposobnosti ćelija za diferencijaciju u pravcu osteoblasta, hondrocita i adipocita nakon indukcije diferencijacije u specifičnim medijumima;

2. Ispitivanje uticaja IL-17 na migratorne funkcije MMĆ izolovanih iz periferne krvi:

- Određivanjem delovanja IL-17 na proliferaciju ćelija;
- Određivanjem delovanja IL-17 na migraciju i mobilizaciju ćelija;
- Određivanjem delovanja IL-17 na ekspresiju i aktivnost proteolitičkih enzima;
- Određivanjem delovanja IL-17 na sposobnost adhezije PK-MMĆ za endotelne ćelije;
- Određivanjem delovanja IL-17 na sposobnost transendotelne migracije ćelija i posledičnu reorganizaciju citoskeleta;
- Analiziranjem učešća signalnih puteva uključenih u delovanje IL-17 na migratorni potencijal PK-MMĆ;

3. Ispitivanje uticaja različitih koncentracija O₂ na ćelijske funkcije MMC izolovanih iz tkiva pupčanika:

- Određivanjem efekata različitih koncentracija O₂ na vijabilnost i proliferaciju ćelija;
- Određivanjem efekata različitih koncentracija O₂ na usmerenu diferencijaciju ćelija;
- Određivanjem efekata različitih koncentracija O₂ na klonogeni potencijal ćelija;
- Određivanjem efekata različitih koncentracija O₂ na ekspresiju markera matičnosti;
- Određivanjem efekata različitih koncentracija O₂ na preživljavanje i ćelijski ciklus;
- Određivanjem efekata različitih koncentracija O₂ na migraciju i mobilizaciju ćelija;
- Određivanjem efekata različitih koncentracija O₂ na aktivnosti proteolitičkih enzima;
- Analiziranjem učešća signalnih puteva uključenih u migraciju VS-MMC na različitim koncentracijama O₂.

3. *MATERIJAL I METODE*



3.1. MATERIJAL

Podaci o primarnim i sekundarnim antitelima kao i izotipskim kontrolama primenjenim u eksperimentima prikazani su u **Tabelama 1 i 2**. Podaci o citokinima i farmakološkim inhibitorima signalne transdukcije prikazani su u **Tabeli 3**. Podaci o primenjenim prajmerima prikazani su u **Tabeli 4**.

Tabela 1. Primenjena primarna antitela. (*PE*- fikoeritrin, *FITC*-fluorescein izotiocijanat, *WB*- western blot, *PC*- protočna citometrija, *IF*- imunoflorescentno obeležavanje)

Primarna antitela			
antitelo	poreklo	Proizvođač	primena
uPA	zec	Santa Cruz Biotechnology, SAD	WB, IF
IL-17	zec	Santa Cruz Biotechnology	WB
IL-17R	zec	Santa Cruz Biotechnology	WB
MT1-MMP/MMP14	miš	Ri D Systems, SAD	WB
pERK1/2	zec	Ri D Systems	WB
ERK1/2	miš	Santa Cruz Biotechnology	WB
pp38	zec	Ri D Systems	WB
p38	zec	Ri D Systems	WB
α -tubulin	miš	Sigma-Aldrich, SAD	IF
γ -tubulin	miš	Sigma-Aldrich	IF
CD45- FITC konjugovano	miš	Ri D Systems	PC
CD105- PE konjugovano	miš	Invitrogen, SAD	PC, IF
CD235- PE akonjugovano	miš	Ri D Systems	PC
CD90- PE konjugovano	miš	Ri D Systems,	PC
CD34- PE konjugovano	miš	DAKO, Danska	PC
CD44- PE konjugovano	miš	Ri D Systems	PC
CD73- PE konjugovano	miš	Ri D Systems,	PC
CD29- PE konjugovano	miš	Invitrogen	PC
CD11b-FITC konjugovano	miš	Biosource, SAD	PC
Faloidin- TRITC konjugovan		Sigma-Aldrich	IF
Nanog	miš	Cell Signaling Technology, SAD	IF
Oct-4	zec	Cell Signaling Technology	IF
Sox-2	miš	Cell Signaling Technology	IF
SSEA-4	miš	Cell Signaling Technology	IF
vimentin	miš	Santa Cruz Biotechnology	IF
α -SMA	miš	Developmental Studies Hybridoma Bank, SAD	IF
fibronektin	miš	Sigma-Aldrich	IF

MATERIJAL I METODE

Tabela 2. Primenjena sekundarna antitela. (*TRITC*-tetrametilrodamin, *FITC*-fluorescein izotiocijanat, *WB*- western blot, *PC*- protočna citometrija, *IF*- imunoflorescentno obeležavanje)

Sekundarna antitela			
antitelo	poreklo	proizvođač	primena
HRP konjugovano anti-zečije	koza	RnD Systems	WB
HRP konjugovano anti-mišje	koza	Sigma-Aldrich	WB
TRITC konjugovano anti- mišje	koza	Sigma-Aldrich	IF
FITC konjugovano anti-mišje	koza	Sigma-Aldrich	IF
FITC konjugovano anti-zečije	koza	Sigma-Aldrich	IF
Izotipske kontrole			
IgG1-konjugovano PE	miš	Invitrogen	PC
IgG1-konjugovano FITC	miš	Invitrogen	PC

Tabela 3. Primenjeni citokini i inhibitori.

Citokini i inhibitori signalne transdukcije		
Naziv	Dejstvo	proizvođač
humani rekombinantni IL-17	citokin	Ri D Systems
humani rekombinantni TGF- β	faktor rasta	Ri D Systems
PNU-74654	Inhibitor Wnt/ β - <i>catenin</i> signalnog puta	Santa Cruz.
PD- 98059	inhibitor ERK1/2	Tocris Bioscience, UK
SB-203580	inhibitor p38	Calbiochem, Nemačka
BC11 hidrobromid	Inhibitor urokinaze	Tocris Bioscience
Doksiciklin	Inhibitor MMP	Sigma-Aldrich
ϵ -aminokaprnska kiselina (E-ACA)	Inhibitor plazmin-plazminogen sistema	Sigma-Aldrich

MATERIJAL I METODE

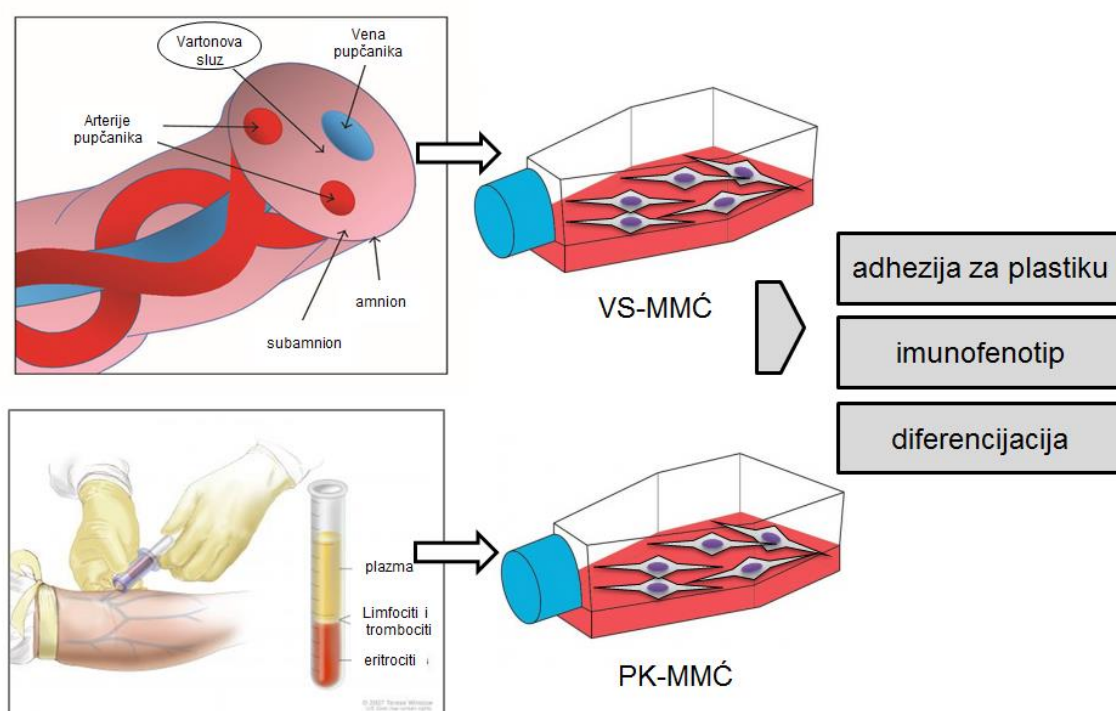
Tabela 4. Prajmeri primenjeni za RT-PCR i kvantitativni PCR.

Prajmeri			
Gen	Sekvenca 5'-3'	Dužina amplikona	Temperatura anilinga (°C)
Kvantitativan PCR			
<i>ALP</i>	F: CACCCACGTCGATTGCATCT R: TAGCCACGTTGGTGTGAGC	211bp	60
<i>RUNX</i>	F: GCCTAGGCGCATTTCAGA R: CTGAGAGTGGAAGGCCAGAG	66bp	60
<i>OCN</i>	F: GGCGCTACCTGTATCAATGG R: TCAGCCAACTCGTCACAGTC	106bp	60
<i>PPARγ</i>	F: CAGGAAAGACAACAGACAAATCA R: GGGGTGATGTGTTTGAACCTG	94bp	60
<i>LPL</i>	F: TCAACTGGATGGAGGAGGAG R: GGGGCTTCTGCATACTCAA	169bp	60
<i>SOX9</i>	F: GCCAGGTGCTCAAAGGCTA R: TCTCGTTCAGAAGTCTCCAGAG	213bp	60
<i>COL2</i>	F: AACTGGGACTGTCTCTG R: GTCCAGGGGCACCTTTTCA	270bp	60
<i>GAPDH</i>	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGTC R: GAAGATGGTGATGGGATTC	226bp	60
PCR			
<i>OCT4-A</i>	F: AGTGAGAGGCAACCTGGAGA R: GTGAAGTGAGGGCTCCCATA	270bp	55
<i>OCT4-B</i>	F: TATGGGAGCCCTCACTTCAC R: CAAAACCCTGGCACAACCT	194bp	55
<i>NANOG</i>	F: CTCCATGAACATGCAACCTG R: CTCGCTGATTAGGCTCCAAC	209bp	55
<i>SOX2</i>	F: ATGGGTTTCGGTGGTCAAGT R: GGCGCCGTGGGAGATACATG	126bp	51
<i>HIF-1α</i>	F: CAGAGCAGGAAAAGGAGTCA R: AGTAGCTGCATGATCGTCTG	234bp	52
<i>IL-17R</i>	F: GCTTCACCCTGTGGAACGAATC R: GGAGATGCCCCG GATGAACCA	328 bp	52
<i>uPA</i>	F: GCAGGAACCCAGACAACCG R: GACCCAGGTAGACGATGTAG	357 bp	52
<i>PAI-1</i>	F: CCACTTCTTCAGGCTGTTCC R: GCAGTTCAGGATGTCGTAG	350 bp	55
<i>MMP-2</i>	F: GGCCCTGTCACTCCTGAGAT R: GGCATCCAGGTTATCGGGGA	713 bp	50
<i>MMP-9</i>	F: GAGACCGGTGAGCTGGATAG R: TCGAAGATGAAGGGGAAGTG	476 bp	54
<i>MMP14/MT1-MMP</i>	F: CCCTATGCCTACATCCGTGA R: TCCATCCATCACTTGGTTAT	536 bp	52
<i>Vimentin</i>	F: AGATGGCCCTTGACATTGAG R: TCTTGCCTCCTGAAAAACT	345 bp	55
<i>α-SMA</i>	F: CTGTTCCAGCCATCCTTCAT R: CCGTGATCTCCTTCTGCATT	175bp	52
<i>Endoglin</i>	F: CTGGGTTCGAGTGGAGGACTG R: CAAGACCGGTCTCAAGACC	414bp	52
<i>GAPDH</i>	F: ACCACAGTCCATGCCATCAC R: TCCACCACCCTGTGCTGTA	452bp	52

3.2. EKSPERIMENTALNI DIZAJN

3.2.1. Izolacija i karakterizacija mezenhimskih matičnih ćelija iz Vartonove sluzi humanog pupčanika (VS-MMĆ) i periferne krvi (PK-MMĆ)

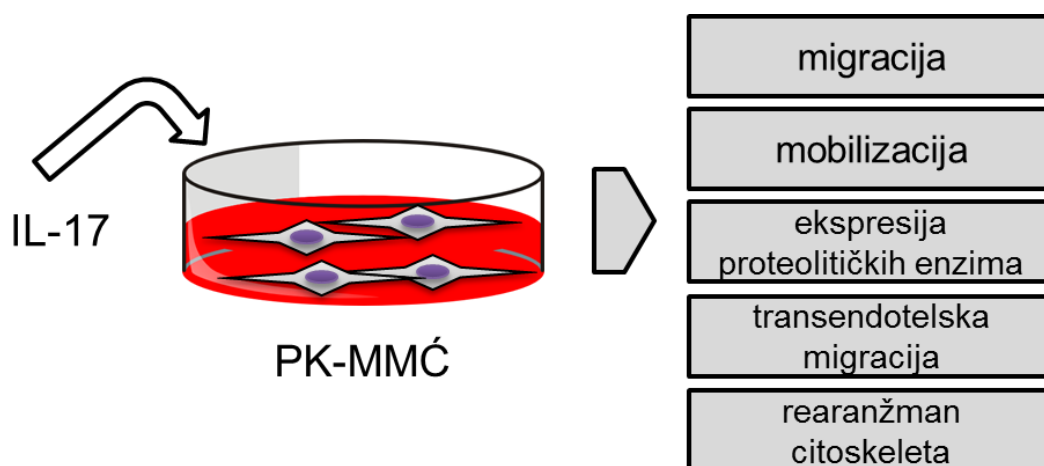
Nakon izolacije MMĆ iz pupčanika i periferne krvi zdravih pacijenata, ćelije su okarakterisane (**Slika 6.**) prema minimalnim kriterijumima Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju, koja obuhvataju određivanje sposobnosti adhezije ćelija za plastiku u kulturi, ćelijskog imunofenotipa i diferencijacionog potencijala (*Dominici i sar., 2006*). Imunofenotip MMĆ utvrđen je protočnom citometrijom analiziranjem nivoa ekspresije površinskih markera karakterističnih za mezenhimske ćelije: CD29, CD44H, CD73, CD90 i CD105; i površinskih markera karakterističnih za hematopoetske ćelije: CD34, CD45, CD235a, CD11b. Analiza multipotentnog diferencijacionog potencijala MMĆ praćena je *in vitro* indukcijom diferencijacije u osteoblaste, adipocite i hondroblaste.



Slika 6. Shematski prikaz eksperimentalnog protokola za izolaciju i karakterizaciju MMĆ iz različitih izvora.

3.2.2. Ispitivanje efekata delovanja IL-17 na migratorna svojstva MMĆ periferne krvi

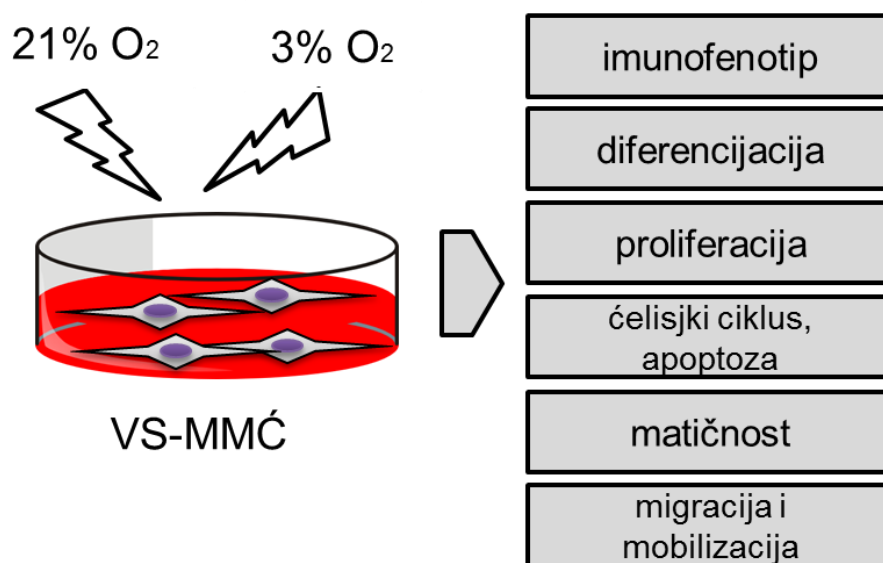
Kao model za ispitivanje efekata IL-17 kao faktora mikrosredine na migratorna svojstva MMĆ, korišćene su ćelije periferne krvi s obzirom da su cirkulirajuće MMĆ prisutne u sredini izloženoj, između ostalog, inflamatornim/imunološkim faktorima (Slika 7.). Prvobitno je određena ekspresija receptora za IL-17 u ovim ćelijama na proteinskom i genskom nivou. Analizirani su efekti IL-17 (0, 25 i 50 ng/ml) na migraciju i mobilizaciju ćelija iz kolagenskih kapi, kao i ekspresija i aktivnost proteolitičkih enzima VCM - urokinaze, aktivatora plazminogena (uPA, od engl. *urokinase-type plasminogen activator*) i matriksnih metaloproteinaza (MMP). Za potvrđivanje efekata IL-17 i učešća uPA u ispitivanim procesima korišćena su antitela za IL-17 i uPA kao i inhibitor za uPA- BC11. Takođe, ispitani su i molekularni mehanizmi koji leže u osnovi efekata IL-17 na ispitana migratorna svojstva PK-MMĆ, korišćenjem inhibitora MAPK signalnih puteva: za p38 (SB-203580) i za ERK1/2 (PD-98059). Analizirana je i organizacija citoskeleta kao i lokalizacija uPA tokom migratornih aktivnosti PK-MMĆ u pristustvu i odsustvu IL-17. Pored toga, praćeni su i efekti IL-17 na sposobnost adhezije PK-MMĆ na endotelske ćelije kao i njihovu transendotelsku migraciju.



Slika 7. Shematski prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje efekata IL-17 na migratorna svojstva PK-MMĆ.

3.2.3. Ispitivanje efekata delovanja 3% O₂ na multipotentna i migratorna svojstva MMĆ Vartonove sluzi pupčanika.

Za ispitivanje efekata 3% O₂ na funkcionalna svojstva MMĆ korišćene su ćelije humanog pupčanika, s obzirom da se nalaze u prirodno hipoksičnoj sredini (2-3% O₂) (Slika 8.). Za potrebe ovih eksperimenata, VS-MMĆ su kultivisane u prisustvu 21% i 3% O₂ u određenim vremenskim periodima prema dizajnu pojedinačnih eksperimenata i nakon toga analizirani su imunofenotip, proliferacija, klonogeni kapacitet, diferencijacioni potencijal, ćelijski ciklus, apoptoza i migracija. U cilju ispitivanja efekata hipoksije na multipotentnost MMĆ, na molekularnom nivou ispitivana je ekspresija gena za transkripcione faktore koji regulišu „matičnost” *NANOG*, *OCT4a*, *OCT4b*, *SOX2*. Pored toga, za ispitivanje mehanizama delovanja 3% O₂ na migraciju VS-MMĆ korišćeni su inhibitori MAPK signalnog puta (PD-98059) i Wnt/ β catenin signalnog puta (PNU-74654).



Slika 8. Shematski prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje efekata niske koncentracije kiseonika na funkcionalna svojstva VS-MMĆ.

3.3. ĆELIJE I ĆELIJSKE KULTURE

3.3.1. Ćelijske linije

Za istraživanje su korišćene sledeće ćelijske linije: humane mikrovaskularne endotelske ćelije (HMEC, od engl. *human microvascular endothelial cells*) obezbeđene ljubaznošću Dr. C. Bernabeu (CIB, CSIC, Španija); mioblasti C2C12 i ćelije adenokarcinoma prostate, PC-3 (American Type Culture Collection, ATCC, CRL-1772 odnosno CRL-1435). MMĆ su izolovane iz humanog pupčanika metodom eksplanta i iz periferne krvi zdravih osoba centrifugiranjem na gradijentu gustine.

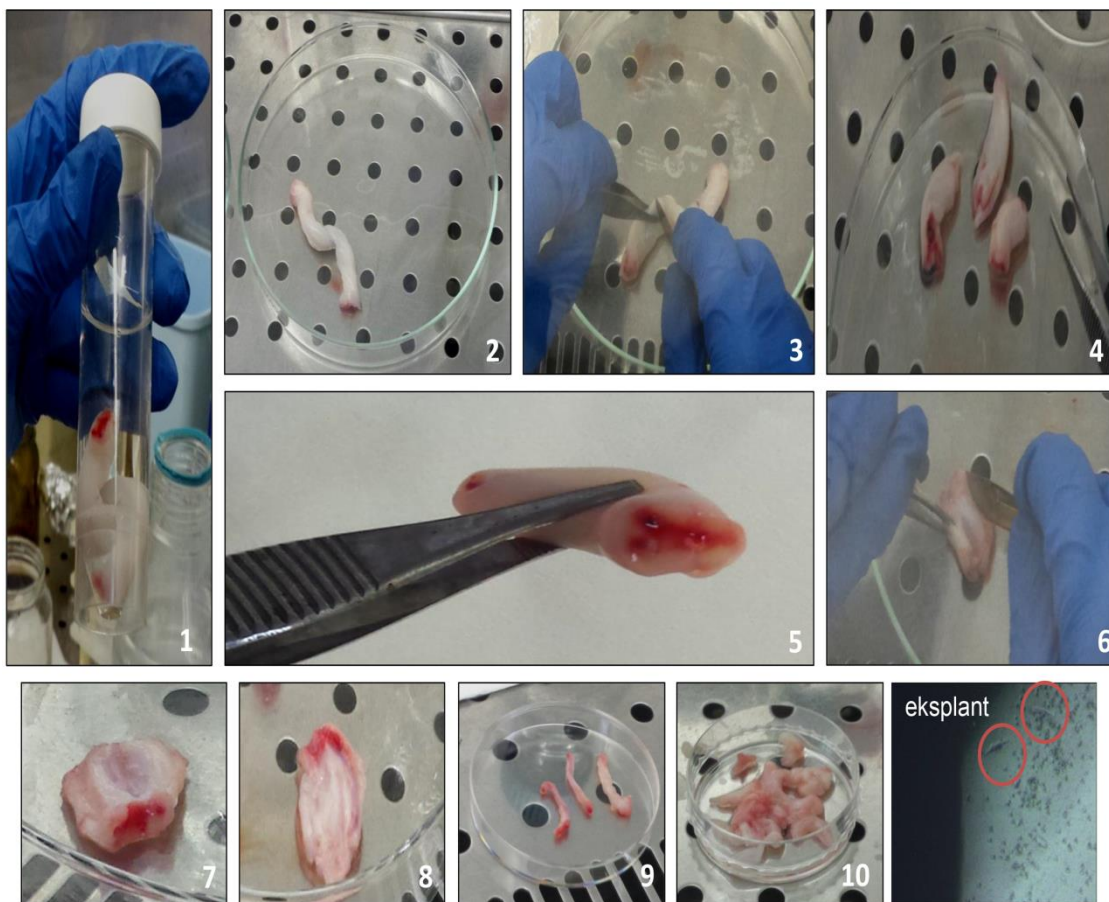
3.3.2. Izolacija mezenhimskih matičnih ćelija

3.3.2.1. Izolacija PK-MMĆ

Mezenhimske matične ćelije izolovane su iz mononuklearnih ćelija periferne krvi koja je dobijena u saglasnosti sa pravilima Etičkog odbora Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu i uz pismenu saglasnost svakog donora, na prethodno opisan način (*Trivanović i sar., 2013*). Ukratko, mononuklearne ćelije su izolovane centrifugiranjem na gustinskom gradijentu 1,077 g/ml (Lymphocyte Separation Medium 1077, PAA Laboratories, Linz, Austrija). Pre dodavanja na gradijent, puna krv razblažena je u istoj zapremini sa RPMI-1640 medijumom (Sigma-Aldrich) i centrifugirana na 30 minuta na $400 \times g$ na sobnoj temperaturi bez kočnice. Mononuklearne ćelije su pažljivo sakupljane iz interfaznog sloja i isprane od gradijenta centrifugiranjem 10 minuta na $800 \times g$. Potom su dodatno isprane dva puta i resuspendovane u standardnom medijumu koji je menjan svakog drugog dana. Nakon dve nedelje, uočavane su prve kolonije ćelija sličnih fibroblastima, a neadherentne ćelije su eliminisane. Nakon postizanja veličine od oko 5 cm^2 , adherentne ćelije su odlepljene sa plastike i ponovo postavljene u novi flask. U proseku oko desetog dana dostignuta je konfluentnost. Iako je za izolaciju PK-MMĆ korišćeno 10 početnih uzoraka mononuklearnih ćelija periferne krvi zdravih donora, MMĆ su dobijene samo iz jednog uzorka periferne krvi, čije su karakteristike ranije opisane (*Trivanović i sar., 2013*). Za potrebe ove disertacije svi testovi vezani za karakterizaciju ovih ćelija su ponovljeni.

3.3.2.2. Izolacija VS-MMC

Mezenhimske matične ćelije izolovane su metodom eksplanata iz pihtijastog vezivnog tkiva humanog pupčanika, tzv Vartonove sluzi (engl. *Wharton's jelly*) (**Slika 9.**) na ranije opisan način (*Trivanović i sar., 2013*). Za potrebe ove disertacije deset novih pupčanika dužine oko 20 cm dobijeno je sa Klinike za Ginekologiju i Akušerstvo Kliničkog centra Srbije uz prethodno dobijenu saglasnost pacijentkinja. Uzorci su prikupljeni nakon normalnog vaginalnog porođaja ili carskog reza i čuvani u hladnom fosfatnom puferu (PBS, od engl. *Phosphate buffer saline*) sa 100 µg/ml penicilin/streptomicina i 2,5 µg/ml amfotericina B (oba od PAA Laboratories) na 4°C, do transporta u laboratoriju i izolacije ćelija (4-24h od uzorkovanja). Pupčanici su u sterilnim uslovima isprani PBS-om nekoliko puta (**Slika 9.1**) i u staklenim petrijevim posudama podeljeni na sitne komade dužine 2-3 cm (**Slika 9.3-5**), koji su potom skalpelom logitudinalno zasečeni kako bi se uočili krvni sudovi (**Slika 9.6-8**). Dve arterije i vena su odstranjeni iz vezivnog tkiva pupčanika (**Slika 9.9**), čime je ogoljeno pihtijasto tkivo-Vartonova sluz, koje je potom usitnjeno na deliće zapremine oko 2-3 mm³ (**Slika 9.10**). Ovakvi fragmenti tkiva pupčanika postavljeni su u petrijeve posude tako da budu okrenuti unutrašnjom površinom na dole, sa malom količinom standardnog medijuma za kultivaciju ćelija kako bi se tkivo zalepilo za plastiku, a nakon par sati, fragmenti tkiva su potpuno prekriveni medijumom koji je menjan svakog drugog dana. Oko desetog dana, primećene su prve ćelije, a u proseku 20 dana nakon postavljanja eksplanata, ćelije su iz istih migrirale i zalepile se za plastiku. Ostaci tkiva su uklonjeni, a ćelije inkubirane u standardnim uslovima do postizanja subkonfluentnosti (80% prekrivenosti površine plastike ćelijama). Ćelije su potom presađene u T-25 flask (prva pasaža, P1) i pasažirane nakon postizanja subkonfluentnosti. Mezenhimske matične ćelije Vartonove sluzi, VS-MMC (engl. *Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells*, WJ-MSc) uspešno su izolovane iz tri od ukupno dobijenih deset uzoraka pupčanika.



Slika 9. Izolacija MMC iz humanog pupčanika. 1. Ispiranje pupčanika u PBS-u; 2,3,4. Isecanje pupčanika na fragmente dužine 2-3cm. 5. Identifikovanje krvnih sudova pupčanika. 6. Logitudinalno zasecanje fragmenata pupčanika; 7,8. Pažljivo uklanjanje krvnih sudova kako bi se oslobodila pihijasta masa-Vartonova sluz. 9. Krvni sudovi pupčanika; 10. Vartonova sluz iseckana na sitne komadiće; prikazana je reprezentativna fotografija prvih migrirajućih ćelija koje izlaze iz eksplanta.

3.3.3. Kultivacija ćelija

Mezenhimske MĆ i C2C12 ćelije su inkubirane u standardnom medijumu za kultivaciju ćelija *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) sa glukozom, koji sadrži 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, od engl *Fetal Bovine Serum*, PAA Laboratories) i 100 jedinica/ml penicilin/streptomicina, u standardnim uslovima na temperaturi od 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti vazduha. Za potrebe eksperimenata sa VS-MMC koncentracija O₂ podešavana je na 21% ili 3% O₂. (Proox Culture Chamber sa regulatorima za O₂ i CO₂, BioSpherix, Ltd., Redfield, Njujork, SAD). Standardni medijumi menjani su svakog drugog dana. HMEC su kultivisane u medijumu za endotelske ćelije (EM) koji sardži 50% DMEM,

MATERIJAL I METODE

50% Ham's F12 (Sigma-Aldrich), 1 μ M hidrokortizona (Galenika, Beograd, Srbija), 20 ng/ml EGF (Ri D Systems) i 5 μ l/ml suplementa za rast endotelskih ćelija (ECGS, od engl *endothelial cell growth supplement*; Sigma-Aldrich) u flaskovima čija je podloga pokrivena sa 0,2% želatinom. PC-3 ćelije kultivisane su u medijumu koji sadrži Ham's F12 i DMEM u odnosu 1:1 obogaćenim sa 10% seruma.

Nakon postizanja adekvatne gustine u T-25 flasku (25 cm²), medijum je odlivan, a ćelije ispirane PBS-om i potom odlepljivane od plastične podloge rastvorom 0,25% tripsina u 1mM EDTA na 37 °C u toku 5 minuta. Zaustavljanje aktivnosti tripsina postignuto je dodavanjem standardnog medijuma za kultivaciju i centrifugiranjem odlepljenih ćelija 10 minuta na 1400 x g, a talog je resuspendovan u svežem medijumu za kultivaciju ćelija.

Ćelije su zamrzavane nakon svakog pasažiranja u koncentraciji od 1 x 10⁶ ćelija u mililitru medijuma za zamrzavanje koji se sastojao od 10% DMSO/FBS. Ćelije zamrznute na ovaj način skladištene su na -70 °C i u tečnom azotu (-196 °C).

3.3.4. Određivanje broja i vijabilnosti ćelija

Za određivanje ukupnog broja ćelija i broja mrtvih ćelija, korišćen je rastvor boje tripan plavo. Ova metoda zasniva se na činjenici da mrtve ćelije usled narušene membrane postaju propustljive za boju tripan plavo, dok žive ćelije ostaju nebojene. Ćelije su mešane sa bojom u razblaženju 1:9 i potom nanošene na Bürker-Türk pločicu sa ugraviranim poljima. Broj ćelija u milionima po mililitru računat je prema formuli:

$$\text{broj ćelija/ml} = \frac{\text{broj ćelija}}{\text{broj polja}} \times (\text{razblaženje ćelija u boji}) \times 10^4$$

Nakon određivanja broja vijabilnih ćelija, MMC su ponovo postavljane u određenoj gustini prema potrebama eksperimenata.

3.4. ANALIZA ĆELIJSKIH FUNKCIJA

3.4.1. Analiza proliferacije ćelija

3.4.1.1. MTT test

Proliferacija i vijabilnost ćelija analizirane su MTT testom. MMC su postavljane u standardnom medijumu u pločama sa 96 otvora u gustini od 5×10^3 ćelija po otvoru. Nakon inkubacije ćelija u vremenskom periodu i uslovima prema dizajnu eksperimenta, ćelijama je dodavan 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid (MTT), koncentracije 0,5 mg/ml. Ćelije su potom inkubirane dva sata na temperaturi od 37 °C u inkubatoru. Kristali formazana karakteristično ljubičaste boje, nastali u živim ćelijama na ovaj način, rastvarani su izopropanolom nakon čega je merena optička gustina na talasnoj dužini od 540 nm pomoću eliza čitača za mikrotitarske ploče (Labsystems Multiskan PLUS, Finska).

3.4.1.2. Ćelijska proliferacija u kratkotrajnim kulturama

Za određivanje proliferativnog potencijala VS-MMC u kratkoročnim kulturama, ćelije su postavljane u ploče sa šest otvora u duplikatima u gustini od 1×10^4 ćelija po otvoru i inkubirane u standardnom medijumu na 21% O₂ odnosno 3% O₂ na temperaturi od 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti vazduha. Ćelije su trećeg, petog i sedmog dana odlepljivane sa podloge rastvorom tripsin/EDTA, prikupljane, i potom brojane u rastvoru tripan plavog.

3.4.1.3. Ćelijska proliferacija u dugotrajnim kulturama

Kako bi se odredio proliferativni potencijal VS-MMC u dugoročnim kulturama i odredilo vreme potrebno za dupliranje broja ćelijske populacije, ćelije su postavljane u ploče sa šest otvora u gustini od 25×10^4 ćelija po otvoru i inkubirane na temperaturi od 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti vazduha na 21% odnosno 3% O₂. Nakon dostizanja konfluentnosti, ćelije su odlepljivane rastvorom tripsin/EDTA, brojane pomoću tripan plavog i ponovo postavljane u inicijalnoj gustini. Postupak je ponavljan

MATERIJAL I METODE

pri svakoj pasaži tokom 24 dana. Vreme potrebno za dupliranje ćelijske populacije (PDT, od engl. *population doubling time*) izračunavano je prema formuli:

$$PDT = (T - T_0) \frac{\lg 2}{(\lg N_t - \lg N_0)}$$

gde je T_0 vreme početka, a T vreme kraja kultivacije, a N_0 i N_t broj ćelija na početku odnosno kraju svake kultivacije.

3.4.1.4. Analiza klonogenog potencijala, CFU- F test

Klonogeni potencijal VS-MMĆ određivan je CFU-F testom. VS-MMĆ su postavljane u ploče sa šest otvora u gustini od 10, 50 i 100 ćelija po otvoru u duplikatima i kultivisane u standardnom medijumu na temperaturi od 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti vazduha na 21% odnosno 3% O₂. Nakon 14 dana kultivacije, ćelije su isprane PBS-om, fiksirane hladnim metanolom i potom bojene 15 minuta u 0,3% *crystal violet* boji. Ćelije su na kraju isprane destilovanom vodom i pod invertnim mikroskopom brojane su vidljive kolonije sa 50 i više ćelija. Efikasnost formiranja kolonija određivana je kao procenat odnosa broja kolonija i inicijalnog broja zasađenih ćelija.

3.4.2. Diferencijacija ćelija

Kako bi se ispitao diferencijacioni potencijal, ćelije su postavljane u ploče sa 48 otvora u gustini od 10 x 10³ ćelija po otvoru odnosno u ploče sa 96 otvora u gustini od 5 x 10³ ćelija po otvoru i kultivisane u standardnom medijumu na temperaturi od 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti vazduha do postizanja subkonfluentnosti, i potom izložene odgovarajućem diferencijacionom medijumu, kako bi se indukovala diferencijacija ćelija ka odgovarajućoj ćelijskoj lozi mezodermnog porekla. Kao kontrola, korišćene su ćelije koje su kultivisane u standardnom medijumu. Za potrebe ispitivanja uticaja različitih koncentracija O₂ na diferencijacioni potencijal ćelija, ćelije su inkubirane u diferencijacionim medijumima paralelno u uslovima na 21% odnosno 3% O₂. Diferencirane ćelije su nakon inkubacije fiksirane 3,7% formaldehidom u PBS-u i bojene odgovarajućim histohemijskim bojenjem i potom posmatrane i slikane na svetlosnom mikroskopu (Olympus BX51, Olympus DP25 kamera, Japan)

3.4.2.1. Osteogena diferencijacija

Za potrebe indukcije osteogene diferencijacije, ćelije su nakon postizanja subkonfluentnosti inkubirane u osteogenom diferencijacionom medijumu koji se sastojao od 10 nM deksametazona (Sigma- Aldrich), 50 µg/ml askorbinske kiseline (Sigma-Aldrich), 10 mM β-glicerofosfata (Appllichem, Gmbh, Darmštad, Nemačka) i 10% FBS u DMEM-u. Medijum je menjan tri puta nedeljno tokom nedelju dana. Rana osteogeneza analizirana je detekcijom aktivnosti alkalne fosfataze (ALP) histohemijskim bojenjem pomoću homogena za ALP- BICP/NBT (*5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/p-nitroblue tetrazolium chloride*, Sigma-Aldrich), kao i kolorimetrijski pomoću p-nitrofenil fosfata (pNPP). Aktivnost ALP dokumentovana je slikanjem svetlosnim mikroskopom, a merena je na talasnoj dužini od 450 nm na eliza čitaču. Dodatno, osteogena diferencijacija određivana je bojenjem depozita kalcijuma i vančelijske mineralizacije *Alizarin red* bojom. U ove svrhe, ćelije su kultivisane u osteogenom medijumu tri nedelje uz promenu medijuma svakog drugog dana. Nivo mineralizacije određivan je rastvaranjem boje u 10% rastvoru cetil piridinijum- hlorida u 10mM natrijum-fosfatu 30 minuta, nakon čega je apsorbanca merena na 540 nm.

3.4.2.2. Adipogena diferencijacija

Da bi se indukovala adipogena diferencijacija, ćelije su inkubirane u adipogenom diferencijacionom medijumu koji se sastojao od 100 µg/ml 3-izobutil-1-metilksantina (IBMX, od engl. *isobutyl-methylxanthine*, Sigma-Aldrich), 1 µM deksametazona, 10 µg/ml insulina (Sigma- Aldrich), 1µM roziglitazona i 10% FBS u DMEM-u. Ćelije su inkubirane 21 dan tokom kojih je medijum menjan tri puta nedeljno. Adipogena diferencijacija dokazana je prisustvom unutarćelijskih lipidnih kapi, koje su potvrđene bojenjem *Oil Red O* (Merck, Darmstadt, Germany) i posmatranjem na svetlosnom mikroskopu. Efikasnost adipogene diferencijacije određena je rastvaranjem *Oil red* bojom-obojenih kapljica u izopropanolu i čitanjem apsorbanca na 540 nm. Adipogeneza je dodatno pokazana i bojenjem lipidnih kapi fluorescentnom probom *Nile red* (Santa Cruz Biotechnology) i posmatranjem na epi-fluorescentnom mikroskopu (Olympus, Japan). Kako bi se odredila efikasnost diferencijacije u medijum je pored *Nile red* boje dodat i Hoechst 33258 (Sigma-

MATERIJAL I METODE

Aldrich), do finalne koncentracije 5 µg/ml. Nakon inkubacije u trajanju od 15 minuta u inkubatoru, medijum je uklonjen i ćelije su isprane fosfatnim puferom. Potom su ćelije lizirane RIPA puferom za lizu, u mraku na sobnoj temperaturi 30 minuta. RIPA se sastojao od 0,5% TritonX, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 1% NP-40 i 1% natrijum deoksiholata u TBS-u. Ćelijski lizati su potom preneti u tamnu mikrotitarsku ploču sa koje je očitavana fluorescencija na Wallac 1420 Victor2 Microplate čitaču (PerkinElmer, Finska) uz upotrebu 531/615 setova filtera za *Nile red* i 355/460 za Hoechst 33258. Srednja vrednost očitanih fluorescencija za sve replikate je izračunata za obe boje i potom je određen odnos *Nile red*: *Hoetsch* boja.

3.4.2.3. Hondrogena diferencijacija

Kako bi se usmerile ka hondrogenoj diferencijaciji, ćelije su inkubirane u hondrogenom diferencijacionom medijumu koji je sadržao 5 ng/ml TGF-β1 (Ri D systems), 50 µg/ml askorbinske kiseline, 10 nM deksametazona i 10% FBS u DMEM-u. Inkubacija ćelija duga 21 dan sa promenom medijuma tri puta sedmično prekinuta je bojenjem proteoglikana *Safranin O* i *Alcian blue* bojama. Hondrogena diferencijacija ćelija analizirana je na svetlosnom mikroskopu, a efikasnost diferencijacije određena je rastvaranjem *Alcian blue* u 6M guanidin-hloridu dva sata i potom merenjem apsorbance na talasnoj dužini od 630 nm.

3.4.3. Analiza ćelijske mobilnosti

3.4.3.1. Analiza ćelijske migracije *Scratch* testom

Migratorni potencijal MMC ispitivan je *in vitro* pomoću *scratch* testa. Ćelije su postavljane u gustini od 1×10^4 ćelija po otvoru u duplikatima u ploči sa 24 otvora u standardnim uslovima. Po dostizanju konfluentnosti, monosloj ćelija zagreban je vrhom nastavka za pipetu od 200 µl pri čemu je formirana ravna linija bez ćelija u sredini otvora. Ćelije su potom isprane PBS-om, nakon čega su dodatno kultivisane 24h u specifičnom medijumu i/ili uslovima prema dizajnu eksperimenta. Nakon perioda za migraciju, ćelije su fiksirane ledenim metanolom i obojene 0,1 % *crystal violet* bojom. Migracija ćelija u prethodno zagrebanu površinu zabeležena je slikanjem pod mikroskopom, a procenat ćelija koje su migrirale određen je TScratch softverom

(Computational Science and Engineering Laboratory, Swiss Federal Institute of Technology, ETH Zurich, Ciriš, Švajcarska).

3.4.3.2. Analiza ćelijske migracije zasnovane na *Boyden*-komori

Hemotaksija. Migratorni potencijal MMC analiziran je dodatno i pomoću eseja zasnovanog na *Boyden* komori (Costar, Cambridge MA) sa polikarbonatnim filterima sa porama od 8,0 μm (Collaborative Research, Bedford, MA). MMC su obeležene sa PKH26 (*PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling*, Sigma-Aldrich), prema uputstvima proizvođača i postavljene u gornju komoru (10×10^4 ćelija/ insertu) u 100 μl standardnog medijuma. U donju komoru je dodato 0,5 ml standardnog medijuma, sa dodatkom ili bez IL-17 kao hemoatraktantnog faktora, i odgovarajućeg inhibitora prema dizajnu eksperimenta. Nakon 16h, ćelije koje nisu migrirale su iz gornjeg odeljka uklonjene vrhom štapića sa vatom dok su ćelije koje su se zakačile na dno inserta fiksirane 3,7% formaldehidom u PBS-u. Nakon ispiranja, inserti su okrenuti na dole, montirani pomoću medijuma za montiranje na ljustice kako bi ćelije mogle da se posmatraju na epi-fluorescentnom mikroskopu. Crveno obojene ćelije su izbrojane pomoću NIH-ImageJ sofvera u osam nasumičnih polja po insertu.

Transćelijska migracija. Za potrebe ispitivanja transendotelske migracije, HMEC su postavljene u inserte u gustini od 6×10^5 ćelija u EM medijumu i inkubirane u standardnom uslovima u vlažnoj atmosferi preko noći. PK-MMC su obeležavane PKH26 bojom i postavljene preko HMEC (10×10^4 ćelija/insertu) u 100 μl EM sa ili bez BC11 (50 μm). U donju komoru ispod inserta dodavan je EM sa IL-17 (0 i 50 ng/ml) u prisustvu ili odsustvu BC11 (50 μm). Ćelije su potom inkubirane u standardnim uslovima 30h kako bi se omogućila transmigracija PK-MMC kroz monosloj HMEC. Inserti su isprani PBS-om tri puta, a ćelije koje nisu migrirale su iz gornjeg odeljka uklonjene vrhom štapića sa vatom. Ćelije zalepljene za dno inserta su fiksirane rastvorom 3,7% formaldehida/PBS. Nakon ispiranja, inserti su okrenuti na dole, montirani na predmetna stakla i ćelije su posmatrane na epi-fluorescentnom mikroskopu.

3.4.3.3. Analiza ćelijske mobilizacije iz kolagena

Za potrebe ispitivanja mobilizacije MMC iz kolagena, iz tetiva repova pacova izolovan je kolagen tip I u 0,2% sirćetnoj kiselini pri čemu je dobijen rastvor koncentracije 4,4 mg/ml. Rastvoru koji sadrži 20% 5 x koncentrovanog DMEM-a, 10% FBS-a, 10% NaHCO₃, 2% destilovane vode i 17,6% ćelijske suspenzije dodato je 40% kolagena. Pipetiranjem zapremine 25 µl, od radnog rastvora formirane su kolagenske kapi koje sadrže 1 x 10⁵ VS-MMC, odnosno 1,2 x 10⁶ PK-MMC i postavljane u ploče sa 24 otvora. Nakon 1h inkubacije na 37 °C kolagenske kapi su očvrstnule i potom su kultivisane u odgovarajućem medijumu i/ili uslovima, a prema dizajnu eksperimenta. Nakon perioda inkubacije praćena je mobilizacija ćelija u okolnu površinu pomoću fazno-kontrastnog mikroskopa. Po završetku eksperimenta, kolagenske kapi su fiksirane rastvorom 3,7% formaldehida/PBS i bojene *crystal violet* bojom i slikane.

3.4.4. Analiza ćelijske adhezije

Adhezija za endotel. Kako bi se proverio efekat IL-17 na adheziju PK-MMC za endotel, HMEC su postavljene na staklene ljustice prekrivene 0,2% želatinom u gustini od 10⁵ ćelija/ljustici i inkubirane 48h u standardnim uslovima do postizanja konfluentnosti. Ćelije su potom obojene 4',6-diamidin-2-fenilindolom (DAPI, Sigma-Aldrich) za bojenje ćelijskog jedra 15 minuta na sobnoj temperaturi i isprane PBS-om 2 puta. Istovremeno su PK-MMC postavljene u ploče sa 6 otvora u gustini od 4 x 10⁵ ćelija/otvoru i inkubirane u standardnim uslovima preko noć i potom tretirane bez ili sa 50 ng/ml IL-17 u toku 24h. Nakon tretmana, PK-MMC su odlepljene sa 1 mM EDTA i obeležene PKH26. Tako obeležene MMC su postavljene preko HMEC (10 x 10⁴ ćelija/ljustici) i inkubirane u standardnim uslovima 30 minuta. U drugoj eksperimentalnoj postavci, umesto PK-MMC, HMEC su tretirane bez ili sa 50 ng/ml IL-17. Nakon inkubacije, ljustice su isprane dva puta PBS-om, ćelije fiksirane rastvorom 3,7% formaldehid/ PBS i montirane na predmetna stakla. Uzorci su posmatrani i fotografisani epi-fluorescentnim mikroskopom pri čemu su 8-10 nasumićnih polja na svakoj ljustici fotografisana i crveno obojene ćelije izbrojane.

Adhezija za podendotel. Da bi se ispitali efekti IL-17 na sposobnost PK-MMC da se veže za fibronektin, prvobitno su ploče sa 24 otvora oblagane 10 µg/ml

MATERIJAL I METODE

fibronektinom (Sigma-Aldrich) u toku 24h na 4 °C i blokirane 1% rastvorom albumina goveđeg seruma (BSA, od engl. *Bovine serum albumine*; Sigma-Aldrich) u PBS-u tokom 1h na 37 °C. PK-MMC su tretirane IL-17 (50 ng/ml) tokom 24h, odlepljene sa 1 mM EDTA/PBS i resuspendovane u 0,5% FBS/DMEM i pretretirane antitelom za uPA (10 µg/ml) ili BC11 (50 µM) 1h u standardnim uslovima. Potom je 10×10^4 ćelija postavljeno u ploče obložene fibronektinom i inkubirano 30 minuta. Otvori sa ćelijama blokiranim samo sa BSA/PBS korišćeni su kao kontrola za bazalnu adheziju. Nakon inkubacije, ćelije koje se nisu vezale su otklonjene ispiranjem PBS-om, a adherirane ćelije izbrojane su MTT testom.

3.4.5. Analiza ćelijskog ciklusa

Analiza profila ćelijskog ciklusa vršena je pomoću protočne citometrije čime je omogućeno razlikovanje različitih faza ćelijskog ciklusa zahvaljujući sposobnosti korišćenog propidijum- jodida (PI, od engl. *Propidium Iodide*, Molecular Probes, Life Technologies, OR, SAD) da se interkalira u dvostruki heliks DNK. Za potrebe ovog eksperimenta ćelije su postavljane u ploče sa šest otvora i kultivisane u standardnom medijumu na 21% odnosno 3% O₂ u periodu od 24, 48 i 72 sata. Nakon svakog od perioda inkubacije ćelije su odlepljivane od plastike, ispirane u PBS i alikvoti sa 2×10^5 ćelija su fiksirani u hladnom apsolutnom etanolu 15 minuta na ledu. Potom su ćelije ispirane dva puta u PBS-u centrifugiranjem na 1600 rpm 8 minuta, nakon čega su resuspendovane u rastvoru PBS-a sa 0,1% Triton X detergenta (Serva Electrophoresis GmbH, Hajdelberg, Nemačka) koji sadrži PI (50 µg/ml) i RNAzu (ThermoFisher Scientific, SAD) (0,1 mg/ml). Nakon inkubacije u mraku na 37 °C u trajanju od 40 minuta merena je crvena fluorescencija na protočnom citometru CyFlow CL (Partec, Münster, Nemačka). Intenzitet fluorescencije obojenih ćelija koreliše sa količinom DNK koje one sadrže, te je stoga moguće razvrstati ćelije po fazama ćelijskog ciklusa. Rezultati su analizirani upotrebom programa WinMDI.

3.4.6. Analiza ćelijske smrti

U svrhu ispitivanja ćelijske smrti protočnom citometrijom, korišćeno je dvostruko bojenje aneksin/propidijum-jodid (Ann V-FITC/ PI). Glavno obeležje rane apoptoze jeste translokacija fosfatidilserina sa unutrašnje na spoljašnju stranu membrane što je moguće detektovati bojenjem pomoću Annexin V-FITC (Molecular Probes), koji se u prisustvu kalcijumovih jona sa visokim afinitetom vezuje za fosfatidilserin, a konjugovanje FITC-om omogućava fluorescentnu detekciju. Propidijum-jodid pak zbog svoje osobine da se veže za dvostruki heliks DNK, korišćen je da bi se razlikovale ćelije koje su ušle u kasnu fazu apoptoze, s obzirom da im je permeabilitet narušen i da je tako omogućen ulazak ove boje u ćeliju. Za potrebe ovog eksperimenta ćelije su postavljane u ploče sa šest otvora i uzgajane u standardnom medijumu na 21% odnosno 3% O₂. Nakon 24, 48 i 72 sata inkubacije ćelije su odlepljivane od plastike, ispirane u hladnom rastvoru PBS-a dva puta centrifugiranjem. Alikvoti koji sadrže 2 x 10⁵ ćelija resuspendovani su u rastvoru 1X Annexin V-vezujućeg pufera (Molecular Probes) i obeležavani sa Ann V-FITC i PI (100 µg/ml) prema uputstvu proizvođača. Kao kontrole, korišćene su neobojene ćelije, ćelije obojene samo sa Annexin V-FITC i ćelije obojene samo sa PI. Prekidanje reakcije postignuto je nakon inkubacije ćelija na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta i to dodavanjem 1X Annexin-vezujućeg pufera. Ćelije su držane na ledu do analiziranja na protočnom citometru. Ćelije koje se nalaze u ranoj apoptozi detektovane su kao ^{aneksin +}/_{propidijum-jodid -}, dok su dvostruko pozitivne ćelije kasno apoptotične ili sekundarno nekrotične ćelije.

3.5. ANALIZA PROTEINA

3.5.1. Protočna citometrija

Kako bi se izolovane ćelije okarakterisale, njihov mezenhimski fenotip određen je protočnom citometrijom. Mezenhimske MĆ su pripremane za analizu ekspresije karakterističnih proteinskih markera postavljanjem u ploču sa 24 otvora u gustini 3 x 10⁴ ćelija po otvoru. Nakon kultivacije u standardnim uslovima na 21% (za VS-MMĆ i PK-MMĆ) i 3% O₂ (za VS-MMĆ) i dostizanja konfluentnosti, ćelije su odlepljivane sa

MATERIJAL I METODE

plastike pomoću 1mM EDTA. Čelijske suspenzije sa 2×10^5 ćelija isprane su dva puta u hladnom PBS-u sa 0,5% BSA centrifugiranjem, i potom resuspendovane u 100 μ l istog pufera na sobnoj temperaturi 10 minuta kako bi se blokiralo nespecifično vezivanje. Nakon toga, primarna antitela za površinske markere konjugovana sa specifičnim fluorescentnim markerima (**Tabela 1.**), dodavana su ćelijama u zapremini od 5 μ l. Nakon inkubacije ćelija sa antitelima u mraku na 4 °C u trajanju od 30 minuta, ćelije su isprane od viška antitela centrifugiranjem u hladnom PBS-u sa 0,5% BSA. Izotipska kontrolna antitela (**Tabela 2**) dodavana su kako bi se odredilo nespecifično vezivanje, ćelijske suspenzije su isprane, a potom i resuspendovane u hladnom PBS-u i analizirane na protočnom citometru.

3.5.2. Imunofluorescenca

U svrhu imunofluorescentnog obeležavanja, ćelije su postavljane preko okruglih staklenih ljušpica u gustini 25×10^3 ćelija po ljušpici u ploču sa 24 otvora. Nakon završetka odgovarajućih eksperimentalnih inkubacija, ćelije su isprane dva puta u PBS-u a potom fiksirane u rastvoru 3,7 % formaldehida/ PBS u trajanju od 5-10 minuta. Za potrebe obeležavanja struktura unutar ćelije vršena je permeabilizacija sa rastvorom 0,1% TritonX u PBS-u. Nakon ispiranja PBS-om, ćelije su inkubirane u rastvoru 1% BSA u PBS-u kako bi se blokiralo nespecifično vezivanje. Potom su dodata odgovarajuća razblaženja primarnih antitela (**Tabela 1.**) u rastvoru 1% BSA/PBS i ćelije su inkubirane na sobnoj temperaturi uz mešanje u trajanju od 1h. Nakon ispiranja u PBS-u dodata su sekundarna antitela konjugovana odgovarajućim fluorescentnim bojama (**Tabela 2.**) kao i DAPI za bojenje ćelijskog jedra. Inkubacija je trajala 1h u mraku. Ljušpice sa ćelijama su finalno ispirane nekoliko puta u PBS-u i destilovanom vodom, a potom montirane na predmetno staklo pomoću DPX medijuma. Uzorci su posmatrani odmah ili nakon čuvanja na 4°C u mraku na epifluorescentnom mikroskopu.

3.5.3. *Western blot* analiza ekspresije proteina

Izolacija proteina. Čelije su postavljane u ploče sa šest otvora u gustini od 1×10^5 ćelija po otvoru i kultivisane prema dizajnu eksperimenta. Nakon odgovarajućeg perioda, ćelije su isprane PBS-om i potom su uz primenu RIPA pufera za lizu u toku 30 minuta, uz mešanje na ledu, izolovani ćelijski proteini. Neposredno pre početka rada u

MATERIJAL I METODE

hladan pufer za lizu dodavani su inhibitori proteaza i fosfatasa: natrijum-ortovanadat (200 mM), koktel inhibitora proteaza (Fermentas, MD, SAD), PMSF (100 mM), ϵ -amino kapronska kiselina (EACA) (1M). Čelijski lizati su centrifugirani na 4°C na 10 000 x g, 20 minuta, nakon čega su supernatanti čuvani na -20 °C do upotrebe. Koncentracija proteina određivana je komercijalnim BCA testom (Serva).

Elektroforeza i elektrotransfer. Liziranim uzorcima dodavan je redukcionu pufer za pripremu uzoraka koji sadrži 0,2 M Tris pH 6,9, 4% SDS, 40% glicerol, 400 mM 2-merkaptotanol i 0,02% bromfenol plavog. Nakon petominutnog kuvanja u ključaloj vodi, jednake količine uzoraka (10 μ g) nanošene su na gel sa 10% poliakrilamida debljine 1 mm. Proteini su razdvajani SDS-poliakrilamidnom gel elektroforezom (SDS-PAGE, od engl. *Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*), tokom 90 minuta, na konstantnoj struji od 150 mA. Razdvojeni proteini su potom putem elektrotransfera na 110 mA u trajanju od 90 minuta, prenošeni na nitroceluloznu membranu čija je veličina pore 0,45 μ m (Applichem). Provera transfera vršena je bojenjem Ponso S (Merck).

Imunoblot. Membrane su nakon transfera isprane i nespecifična vezivanja blokirana su u 4% rastvoru mleka u 0,5% Tween-20 u TBS-u (TTBS) u toku 1 sata. Membrane su potom inkubirane u odgovarajućim razblaženjima primarnih antitela (**Tabela 1.**) u 4% mleku/TTBS na rotacionom šejkeru, preko noći na 4 °C. Nakon tri petominutna ispiranja u TTBS, usledila je inkubacija sa sekundarnim antitelom konjugovanim peroksidazom rena (HRP, od engl. *horseradish peroxidase*) (**Tabela 2.**) razblaženim u 4% mleku/TTBS na sobnoj temperaturi u toku 90 minuta. Membrane su zatim isprane tri puta po 5minuta u rastvoru TBS/Tween, i finalno 10 minuta u TBS-u.

Detekcija proteina. Antitelima obeleženi proteini koji se nalaze na membranama, vizuelizovani su zahvaljujući inkubaciji sa sistemom reagenasa za pojačanu hemiluminiscencu (ECL, od engl. *enhanced chemiluminescence reagent system*; Serva) koji sadrži supstrat enzima peroksidaze luminol. Proteini su detektovani na autoradiografskom filmu, i veličina traka određena je na osnovu proteinskog markera *Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder* (ThermoFisher Scientific), a intenzitet traka nakon primene denzitometrije pomoću programa NIH-ImageJ i Total Lab v1.11 software (Amersham, Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska)

3.5.4. Analiza aktivnosti proteina zimografijom

Za potrebe analiziranja aktivnosti enzima VCM, ćelije su postavljane u ploče sa 24 otvora i pripremane za metodu zimografije. Nakon dostizanja 80% konfluentnosti, ćelije su isprane PBS-om i potom inkubirane u standardnom medijumu bez seruma, u specifičnim uslovima prema eksperimentalnom dizajnu. Nakon odgovarajućeg inkubacionog perioda, supernatanti (kondicioni medijumi) su sakupljeni u sterilne tubice i sačuvani na -20°C ili su mešani sa neredukujućim puferom za uzorkovanje (0,125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, 0,02% bromfenol plavo, pH 6,8) i odmah je analizirana aktivnost urokinaze i MMP.

Za određivanje aktivnosti uPA, proteini iz supernatanata razdvajani su neredukujućom 10% SDS-PAGE, a za analizu MMP, proteini su razdvajani neredukujućom 8% SDS-PAGE sa 0,1% želatina. Nakon elektroforeze, gelovi su ispirani dva puta u trajanju od pola sata u 2,5% Triton X-100 na sobnoj temperaturi uz konstantno mešanje i potom isprani destilovanom vodom. Gelovi sa proteinima za analizu aktivnosti utrokinaze nanošeni su na gelove sa 1% agaroze koji sadrže 0,5% kazeina, 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 1 M Tris-HCl pH 6,8, 10 mM CaCl₂ i 1 µg/ml plazminogena, i inkubirani su na 37°C 24 sata u vlažnoj atmosferi. Aktivnost uPA je potom detektovana u vidu jasnih tamnih traka na agaroznom gelu mlečno bele boje na mestu proteolize plazminogena. Gelovi za analizu MMP su nakon ispiranja inkubirani 24 h na 37°C u puferu koji sadrži 50 mM Tris pH 7,5 i 10 mM CaCl₂, a aktivnost MMP je zaustavljena bojenjem gela bojom Komazi plavo (0,25% *Coomasie Blue R* u rastvoru koji sadrži 50% metanola i 10% sirćetne kiseline) u trajanju od 20 minuta. Konačno, transparentne proteolitičke trake detektovane su nakon obezbojavanja plavih gelova rastvorom koji sadrži 2% metanola i 5% sirćetne kiseline. Kvantifikacija traka urokinaze i MMP analizirana je denzitometrijom pomoću NIH-Image J i Total Lab v1.11 softvera a na osnovu specifičnog proteinskog markera.

3.6. ANALIZA EKSPRESIJE GENA

Ekspresija gena od interesa određivana je nakon izolovanja informacione RNK (iRNK) iz ćelija i dobijanja komplementarne DNK (cDNK, od engl. *complementary DNA*).

Izolacija RNK. U svrhu određivanja ekspresije gena, ćelije su postavljane u ploče sa šest otvora u koncentraciji od 2×10^5 ćelija po otvoru. Nakon odgovarajućeg perioda u tretmanima i uslovima prema dizajnu eksperimenta, medijum je odlivan, ćelije ispirane PBS-om i vršena je homogenizacija uzoraka u 1 ml Trizol reagensa (Ambion Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD). Nakon liziranja ćelija propuštanjem Trizola kroz nastavak pipete, ćelijski lizati su prenošeni u tubice od 1,5 ml i inkubirani na sobnoj temperaturi 5 minuta i potom je dodato 200 μ l hloroforma kako bi se razdvojile nukleoproteinske faze. Nakon kratkog snažnog mućkanja i inkubacije na sobnoj temperaturi tokom 2-3 minuta, uzorci su spuštani u centrifugi na 12000 x g, na temperaturi od 4°C, u trajanju od 15 minuta. Na ovaj način postignuto je razdvajanje u tri faze-donju crvenu fenol-hloroform fazu koja sadrži proteine, belu interfazu sa DNK, i gornju vodenastu bezbojnu fazu koja sadrži RNK. Vodena faza sa RNK je pažljivo izolovana i prenošena u novu epruvetu u koju je zatim dodavano 0,5 ml 100% izopropanola. Nakon desetominutne inkubacije na sobnoj temperaturi, uzorci su centrifugirani na 12000 x g, 10 minuta na 4°C i potom je odlivan supernatant. Na taj način u tubi je ostao beli talog sa RNK koji je ispiran u 75% etanolu centrifugiranjem na 7500 x g, 5 minuta na 4°C. Supernatant je odlivan, RNK talog sušen na vazduhu 5 minuta i potom rastvoren u vodi prečišćenoj od nukleaza. Koncentracija RNK u uzorcima određivana je pomoću spektrofotometra NanoDrop (Implen, Minhen, Nemačka). Uzorci sa RNK čuvani su na -70°C do momenta pristupanja reverzno-transkriptaznoj polimeraznoj lančanoj reakciji, RT-PCR (od engl. *Reverse-transcriptase Polymerase chain reaction*) u cilju dobijanja komplementarne DNK.

Reverzna transkripcija. Ukupna RNK izolovana iz ćelija prevođena je u formu komplementarne DNK na osnovu oligo dT prajmera koji omogućava reverznu transkripciju samo iRNK, pomoću komercijalnog kita za reverznu transkripciju *RevertAid™ H minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific). Prema uputstvu proizvođača, smeša sa 2 μ g RNK, 1 μ l oligo dT prajmera i vode bez nukleaza

MATERIJAL I METODE

do ukupne zapremine od 12,5 μ l inkubirana je na 65°C u trajanju od 5 minuta nakon čega je temperatura spuštana na 25°C, i dodavana im je osnovna mešavina koja se sastojala od: 1 μ l *RevertAid* reverzne transkriptaze, 2 μ l smeše nukleotida (dNTP miksa) i 0,5 μ l inhibitora ribonukleaze rastvorenih u 4 μ l pufera za reverznu transkripciju. Ovako pripremljena smeša inkubirana je 60 minuta na 42°C a potom 10 minuta na 70°C u termobloku aparata Mastercycler personal (Eppendorf, Nemačka). Dobijeni cDNA produkti čuvani su na -20°C ili se odmah nakon reakcije pristupalo PCR-u ili kvantitativnom PCR-u u realnom vremenu (q- RT- PCR, od engl. *quantitative real time PCR*).

Reakcija lančanog umnožavanja, PCR. Produkti polimerazne lančane reakcije dobijeni su umnožavanjem cDNA koncentracije 2,5 ng pomoću 10 μ M prajmera za željeni gen i radnog rastvora koji se sastojao od smeše nukleotida (dNTP, 500 μ M), 2 x koncentrovanog pufera za PCR sa solima Mg i Taq DNK polimeraze (50 U/ml).

Osnovni program reakcije sastojao se od:

5 minuta na temperaturi od 94°C , inicijalno zagrevanje reakcije

20-40 ciklusa $\left\{ \begin{array}{l} 45 \text{ sekundi na na temperaturi od } 94^{\circ}\text{C, denaturacija DNK} \\ 30 \text{ sekundi na temperaturi od } 52^{\circ}\text{C, vezivanje prajmera za DNK lance} \\ 1,5 \text{ minuta na temperaturi od } 72^{\circ}\text{C, elongacija lanaca} \end{array} \right.$

10 minuta na temperaturi od 72°C, finalna elongacija

Sekvence prajmera, temperature za vezivanje specifične za svaki prajmer kao i veličina produkta prikazani su u **Tabeli 4**. Temperatura topljenja, kao i broj ciklusa lančanih reakcija je korigovan u zavisnosti od prajmera koji je korišćen i nivoa ekspresije gena. Glicerinaldehid 3-fosfat dehidrogenaza (*GAPDH*) je amplifikovan kao kontrola količine cDNK u svakom uzorku.

Elektroforeza i vizuelizacija PCR produkata. Dobijeni PCR produkti detektovani su nakon razdvajanja na 1,5% agaroznom gelu (Lonza, Rockland, ME, SAD) sa 0,01% etidijum-bromida (Sigma-Aldrich) u Tris-acetatnom-EDTA (TAE; Serva) puferu na 100 V i 400 mA u trajanju od 40 minuta. Vizuelizacija traka vršena je pomoću osvetljavanja gela UV svetlošću i u programu BioDoc Analyze (Analytik Jena Group, Nemačka). Na osnovu markera koji u sebi sadrži boju i fragmente u veličini od 100-1000 baznih parova (ThermoFisher Scientific), određivana je pozicija i broj baznih

parova dobijenog produkta. Relativna ekspresija iRNK određivana je normalizacijom vrednosti dobijenih denzitometrijom pomoću softvera Image Master total lab i NIH-ImageJ a u odnosu na vrednosti *GAPDH house keeping* gena.

Kvantitativni PCR. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu izvedena je na Mic qPCR cycler (BioMolecular systems, Australija) uz korišćenje 2,5 µg cDNA uzorka, 0,3-0,5 µM prajmera iz **Tabele 4.** i *FastGreen* kita (Applied Biosystems, Kalifornija, SAD). Relativna ekspresija iRNK određivana je uporednom $\Delta\Delta C_t$ metodom uz korišćenje *GAPDH* kao referentnog gena.

3.7. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA

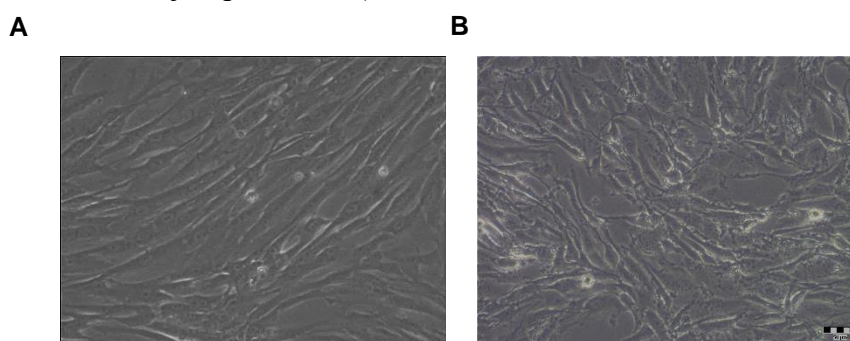
Svi eksperimenti ponovljeni su najmanje tri puta, a rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost \pm standardna greška (SEM). Statistička poređenja su vršena pomoću studentovog t-testa, i jednosmerne analize varijanse (*one way ANOVA*) sa Holm-Sidak višestrukim poređenjima sa nivoom značajnosti α postavljenim na 0,05. p vrednosti su smatrane značajnim za * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Za analizu i grafičku prezentaciju podataka korišćen je GraphPad Prism 7 software (GraphPad, San Diego, Kalifornija, SAD).

4. *REZULTATI*



4.1. IZOLACIJA, KULTIVACIJA I KARAKTERIZACIJA MMC

Izolacija i kultivacija. Mezenhimske MĆ su izolovane metodom eksplanta iz strome humanih pupčanika, dok su MMC iz periferne krvi izolovane centrifugiranjem u gradijentu gustine, a nakon dobijanja odobrenja lokalnog etičkog komiteta i uz prethodnu saglasnost pacijenata. Eksplanti pupčanika i ćelije periferne krvi su postavljani u plastične laboratorijske flaskove za ćelijsku kulturu u standardnom medijumu sa serumom. Primećeno je da je prvim ćelijama humanog pupčanika bilo potrebno oko 10 dana da migriraju u okolni medijum iz eksplanata koji su uklonjeni oko 20 dana nakon postavljanja. Posmatranjem izolovanih ćelija pod fazno-kontrastnim mikroskopom uočena je heterogena grupa ćelija, koju su pored adherentnih ćelija vretenastog oblika činile i sferične neadherentne ćelije koje su eliminisane višestrukim ispiranjima. Ćelije nalik fibroblastima sa sposobnošću adhezije za plastiku prvobitno su formirale pojedinačne kolonije 14 dana nakon postavljanja ćelija periferne krvi, odnosno 20 dana nakon postavljanja eksplanata pupčanika. Spajanje takvih pojedinačnih kolonija je, nakon oko 10 dana, rezultiralo dostizanjem oko 80% prekrivenosti površine plastičnog flaska (subkonfluentnost) što se smatralo nultom pasažom. Tada su ćelije odlepljivane i pripremane za pasažiranje. Ovakva vretenasta morfologija slična fibroblastima kao i adhezivnost za plastiku zadržali su se kod VS-MMC i PK-MMC u daljim pasažama (**Slika 10**).

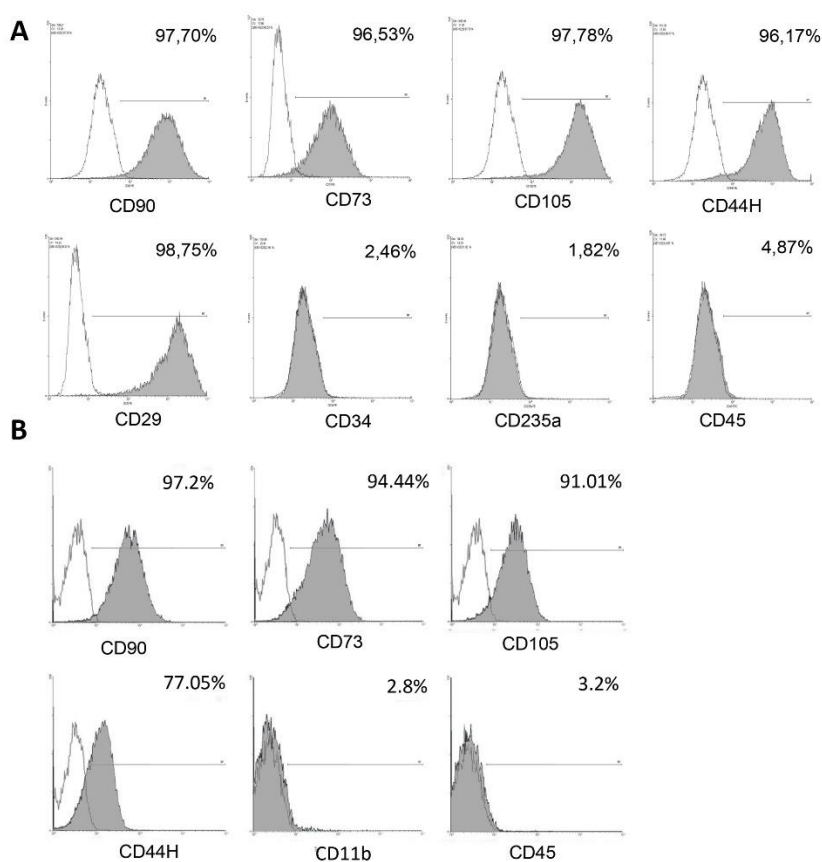


Slika 10. Morfologija MMC izolovanih ih iz A) pupčanika i B) periferne krvi. Slikano na invertnom mikroskopu. Uveličanje 100x.

Imunofenotip. Pored sposobnosti adhezije za plastiku određivan je imunofenotip, tj ekspresija specifičnih površinskih antigena. Ćelije su obeležene antitelima za specifične površinske markere i analizirane protočnom citometrijom. Dobijeni rezultati

REZULTATI

pokazali su prisustvo mezenhimskih površinskih markera kod VS-MMĆ uz istovremeno odsustvo hematopoetskih površinskih markera (**Slika 11.A**). Name, više od 90% ćelija eksprimira CD29, CD44H, CD73, CD90 i CD105, dok manje od 10% ćelija eksprimira hematopoetske površinske markere CD34, CD45 i CD235a. Slični rezultati dobijeni su za sve ispitane donore. Preko 90% ćelijske populacije PK-MMĆ je bilo pozitivno za CD90, CD73 i CD105, 77% za CD44, a mali broj ćelija za ekspresiju hematopoetskih markera CD45 i CD11b (**Slika 11. B**).

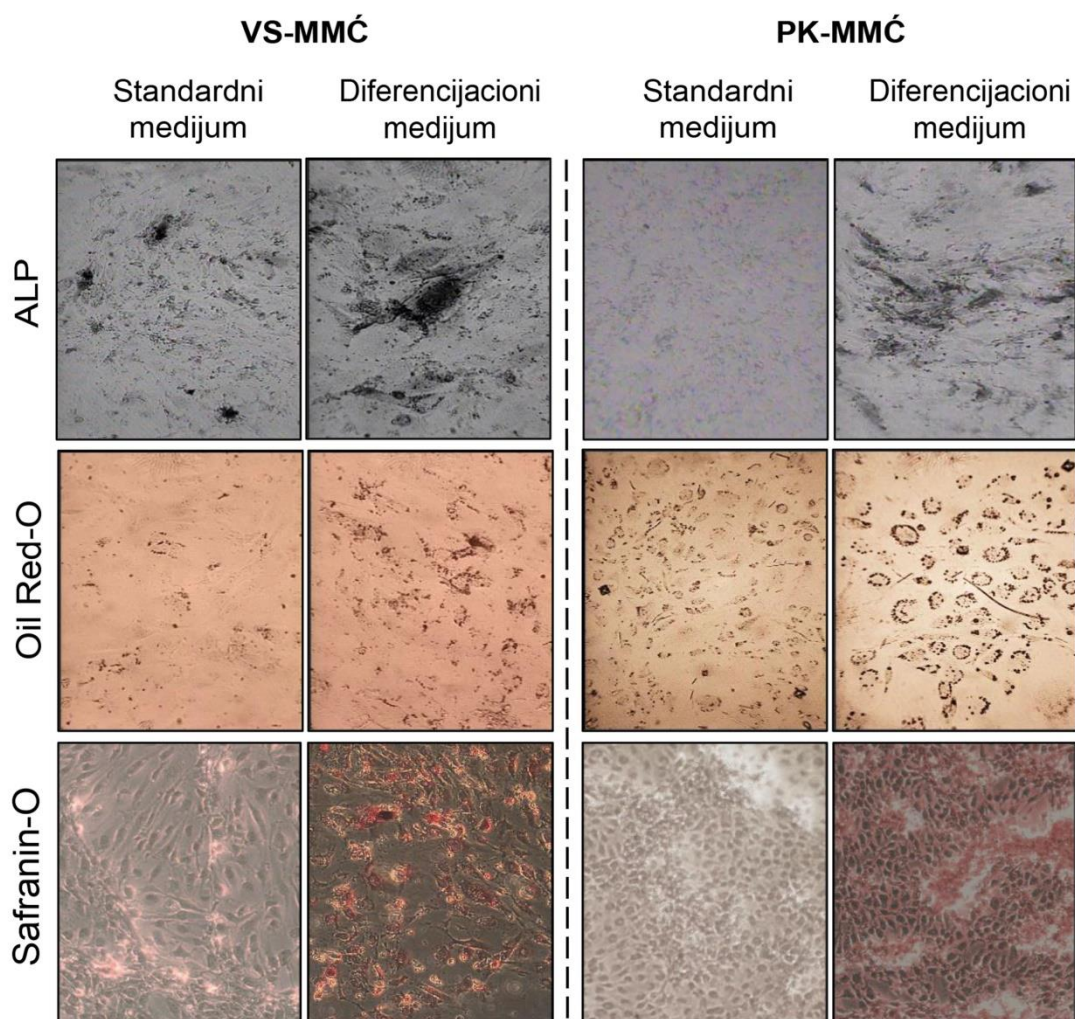


Slika 11. Imunofenotip MMĆ. A) Imunofenotipska karakterizacija VS-MMĆ. Na reprezentativnim histogramima predstavljena je ekspresija mezenhimskih antigena CD90, CD73, CD105, CD44H, CD29 i hematopoetskih antigena CD34, CD235a i CD45 u poređenju sa izotipskom kontrolom (beli histogrami). B) Imunofenotipska karakterizacija PK-MMĆ. Na reprezentativnim histogramima predstavljena je ekspresija mezenhimskih antigena CD90, CD7, CD105 i CD44h i hematopoetskih antigena CD11b i CD45 u poređenju sa izotipskom kontrolom (beli histogrami).

REZULTATI

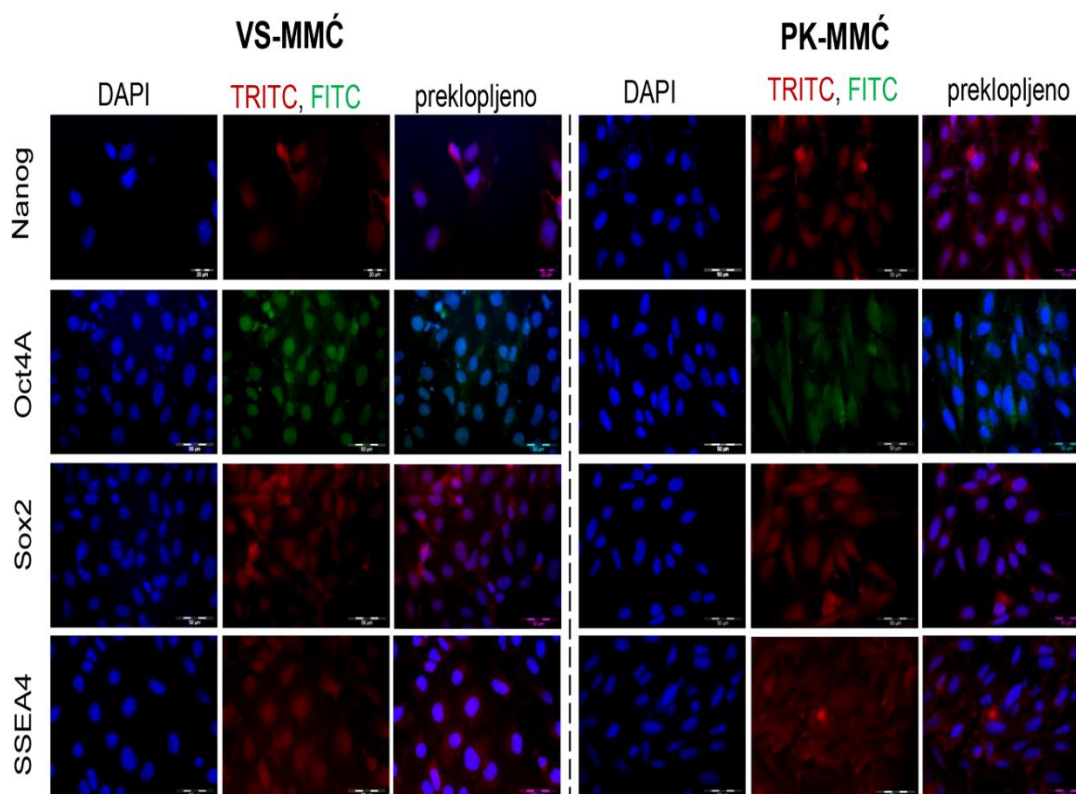
Diferencijacioni potencijal. Sa ciljem dalje karakterizacije izolovanih ćelija određen je njihov multipotentni potencijal diferencijacije, kao funkcionalni test za potvrdu identiteta MMĆ. Funkcionalna karakteristika MMĆ jeste njihova sposobnost diferencijacije u najmanje tri ćelijske loze mezodermskog porekla, te su u te svrhe ćelije kultivisane u specifičnim diferencijacionim medijumima u odgovarajućem vremenskom periodu, nakon čega su diferencijacione promene određivane histohemijskim bojenjem. Dobijeni rezultati pokazali su da su se VS-MMĆ i PK-MMĆ diferencirale u ćelije osteogene, adipogene i hondrogene loze (**Slika 12**). Osteogena diferencijacija dokazana je detekcijom aktivnosti ranog markera diferencijacije - ALP, bojenjem supstratom za alkalnu fosfatazu nakon sedam dana kultivacije ćelija u osteogenom medijumu. Uočeno je da su se VS-MMĆ, za razliku od PK-MMĆ, čak i spontano diferencirale u osteoblaste, s obzirom da je aktivnost ALP uočena i kod kontrolnih ćelija koje su kultivisane u standardnom medijumu. Ipak, intenzitet bojenja ALP-a bio je manji u odnosu na ćelije kod kojih je osteogeneza indukovana. Sposobnost diferenciranja MMĆ u adipocite potvrđena je bojenjem lipidnih kapi *Oil red O* bojom, nakon 21 dana kultivacije u adipogenom medijumu. Prisustvo lipidnih kapi uočeno je i kod kontrolnih VS-MMĆ i PK-MMĆ, kultivisanih u standardnom medijumu. Hondrogena diferencijacija određena je prisustvom proteoglikana koji su detektovani zahvaljujući bojenju *Safranin O* bojom.

REZULTATI



Slika 12. Diferencijacija VS-MMĆ i PK-MMĆ. Čelije su gajene u indukcionim medijumima za osteogenu, adipogenu i hondrogenu lozu i efikasnost diferencijacije je praćena histoheimijskim bojenjem specifičnih diferencijacionih markera. Potencijal MMĆ za osteogenu diferencijaciju potvrđen je bojenjem na aktivnost ALP; adipogenu diferencijaciju potvrđen je bojenjem unutarćelijskih lipidnih kapi i hondrogenu diferencijaciju bojenjem proteoglikana. Prikazane su reprezentativne fotografije. Uveličanje 100x.

Ekspresija faktora pluripotentnosti. Dodatno je kod ovih ćelija analizirana ekspresija markera pluripotentnosti (embrionalnih markera) imunofluorescentnim obeležavanjem. VS-MMĆ i PK-MMĆ obeležene su primarnim antitelima za transkripcione faktore NANOG, OCT4a, SOX2 i SSEA4. Dodatnim bojenjem sekundarnim antitelom konjugovanim sa crvenom TRITC bojom, potvrđena je ekspresija NANOG, SOX2 i SSEA4, dok je antitelom konjugovanim sa zelenom FITC bojom potvrđena ekspresija OCT4 proteina (**Slika13.**)



Slika 13. Ekspresija embrionalnih markera kod VS-MMĆ i PK-MMĆ. Imunofluorescentnim bojenjem ćelije su obeležene antitelima za NANOG, OCT-4, SOX2 i SSEA4 i odgovarajućim sekundarnim antitelima konjugovanim TRITC (crveno) i FITC (zeleno) fluorohromom. Nukleusi su obeleženi DAPI fluorescentnom bojom (plavo). Prikazane su reprezentativne fotografije sa epi-fluorescentnog mikroskopa. Uveličanje 400x.

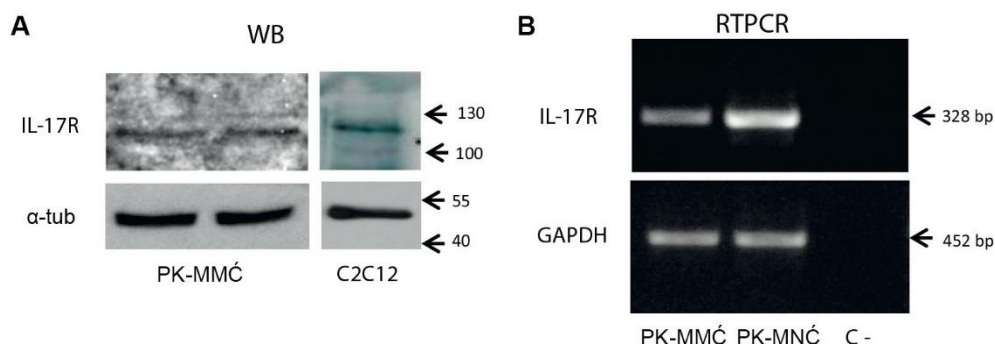
4.2. EFEKTI MIKROSREDINE NA FUNKCIONALNA SVOJSTVA MMĆ

Mezenhimske MĆ izolovane iz periferne krvi primenjene su kao model migratornih ćelija za analizu uticaja proinflamatorne mikrosredine na regulaciju/modulaciju migratornog potencijala MMĆ. U te svrhe određivan je uticaj IL-17, kao hemotaktičnog faktora, na pokretljivost i funkcije MMĆ tokom inflamatornih procesa. S druge strane, efekti fiziološke (3%) i „laboratorijske“ (21%) koncentracije O₂ analizirani su na VS-MMĆ kao tipu ćelija koje se *in vivo* nalaze u hipoksičnoj mikrosredini reproduktivnog trakta, u cilju standardizovanja uslova kultivacije i umnožavanja MMĆ za njihovu potencijalnu primenu.

4.2.1. EFEKTI I MEHANIZMI DELOVANJA IL-17 NA MULTIPOTENTNE MEZENHIMSKE MATIČNE ĆELIJE IZ PERIFERNE KRVI

4.2.1.1. Ekspresija receptora za IL-17 na PK-MMĆ

U skladu sa predmetom istraživanja efekata IL-17 na funkcije PK-MMĆ, na početku je ispitana ekspresija receptora za IL-17 na ovim ćelijama. *Western blot* analizom pokazano je prisustvo receptora za IL-17 na PK-MMĆ, a kao pozitivna kontrola korišćene su C2C12 ćelije. (Slika 14.A). Ekspresija IL-17R je takođe potvrđena i RT-PCR metodom pri čemu su se kao pozitivna kontrola koristile mononuklearne ćelije periferne krvi (PK-MNĆ), a kao negativna kontrola PCR reakcija bez komplementarne DNK (Slika 14.B).



Slika 14. Ekspresija receptora za IL-17 kod PK-MMĆ. A) ekspresija IL-17R određena *western blot* metodom pri čemu je α -tubulin korišćen kao kontrola. B) ekspresija iRNK za IL-17R određena PCR metodom. GAPDH korišćen je kao kontrola za istu količinu cDNK; Prikazani su reprezentativni gelovi. Molekulske mase proteina izražene su u kDA, a dužine amplikona u baznim parovima i odgovarajuća pozicija na gelu obeležena je strelicom.

4.2.1.2. Efekat IL-17 na migratorni kapacitet PK-MMĆ

Scratch esej. Sa ciljem da se ispita da li IL-17 moduliše migraciju PK-MMĆ postavljen je *scratch esej* u kojem su ćelije migrirale u periodu od 24 časa u medijumima u koje su dodate različite koncentracije ovog citokina. Rezultati su pokazali da je migratorni kapacitet ovih ćelija značajno povećan u prisustvu IL-17 u koncentracijama od 25 i 50 ng/ml (Slika 15.A). Pored toga, primećeno je da povećanje stepena migracije PK-MMĆ koreliše sa povećanjem koncentracije IL-17 s obzirom da je stimulisano skoro

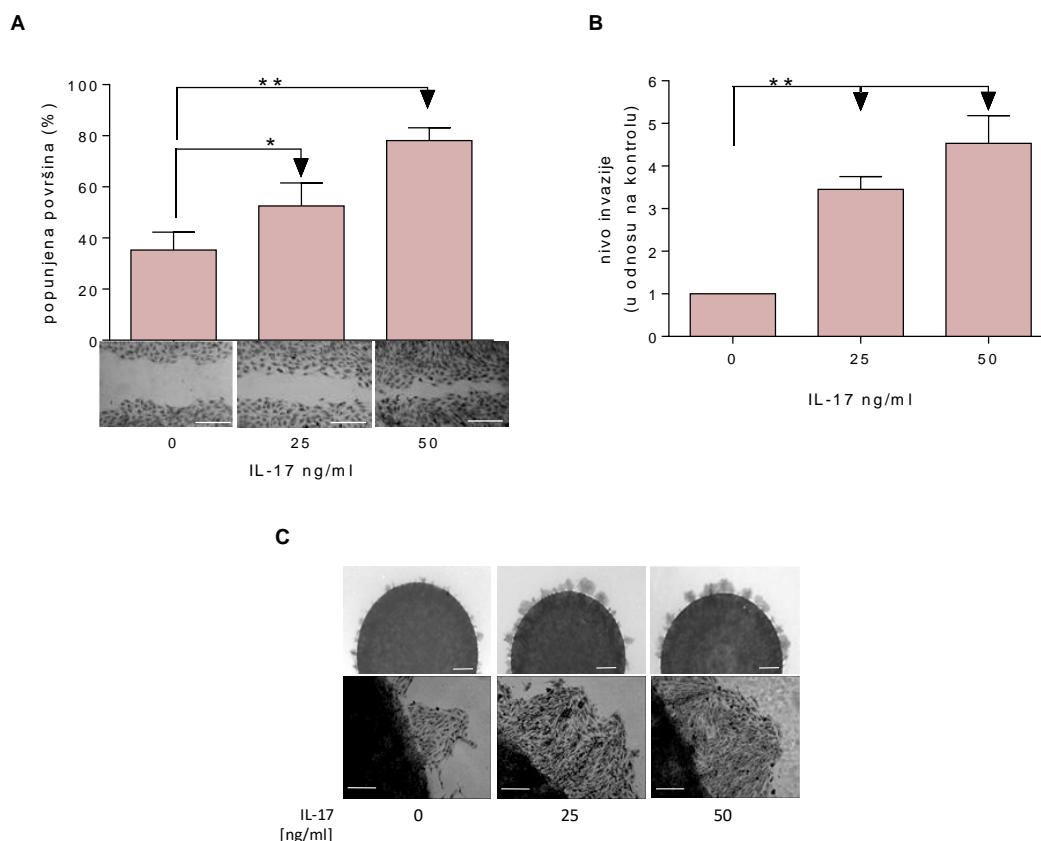
REZULTATI

kompletno popunjavanje zagrebanog prostora (oko 90%) pri većoj koncentraciji ovog citokina.

Test hemotaksije. Kako bi se podržali rezultati dobijeni u *Scratch* eseju, efekat IL-17 na migratorni kapacitet PK-MMĆ ispitan je i testom hemotaksije baziranom na *Boyden* komori. Dobijeni rezultati ukazali su da je prisustvo IL-17 (u koncentracijama od 25 i 50 ng/ml) u donjem odeljku stimulisalo migraciju PKH26-obeležanih PK-MMĆ iz gornjeg odeljka kroz pore u donji odeljak. Stepen migracije PK-MMĆ u donju komoru stimulisane interleukinom-17 bio je značajno veći u poređenju sa kontrolnim uslovima gde su ćelje spontano migrirale ka odeljku bez citokina (**Slika 15.B**).

Mobilizacija iz kolagena. U svrhe ispitivanja efekta IL-17 na mobilizaciju PK-MMĆ iz kolagena, ćelije su postavljane unutar kolagenskih kapi i inkubirane u prisustvu različitih koncentracija IL-17. Rezultati su pokazali da su obe koncentracije IL-17 (25 i 50 ng/ml) stimulisale izlazak ćelija iz kolagenskih kapljica i zabeleženo je da je nivo mobilizacije bio povećan u poređenju sa kontrolnim ćelijama u uslovima bez IL-17 (**Slika 15.C**) Primećeno je da su PK-MMĆ migrirale iz kolagenskih kapi kolektivno u grupi, pre nego pojedinačno.

REZULTATI

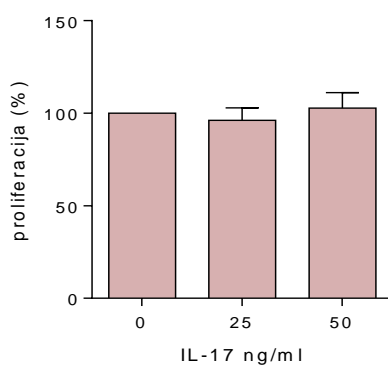


Slika 15. Efekat IL-17 na migraciju PK-MMĆ. *A)* Nakon zagrebavanja monosloja ćelija, ćelije su tretirane bez ili sa IL-17 i potom je migracija ćelija analizirana nakon 24h na svetlosnom mikroskopu i predstavljena u vidu procenta zagrebane površine pokrivena migrirajućim ćelijama. Uveličanje 100x. *B)* Ćelije obeležene PKH26 postavljene su u gornju komoru, a IL-17 (50 ng/ml) dodat je u donju komoru. Ćelije koje su prošle membranu nakon 16h fiksirane su, zabeležene epi-fluorescentnim mikroskopom. Ćelije prebrojane u 10 nasumičnih polja predstavljene su u vidu stubića. *C)* PK-MMĆ postavljene u kolagenske kapi tretirane su sa ili bez IL-17 tokom 5 dana. Nakon fiksiranja i bojenja kapi su slikane. Uveličanje kapljice $\times 20$, uveličanje ćelija $\times 100$; Prikazani su rezultati 3 nezavisna eksperimenta izvedenih u triplikatu. Grafici predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije): * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

4.2.1.3. Efekat IL-17 na proliferaciju PK-MMĆ

Kako bi se utvrdilo da li je uočena migracija posledica povećane proliferacije ćelija usled stimulacije interleukinom-17, PK-MMĆ su tretirane istim koncentracijama IL-17 kao u prethodnom eksperimentu i proliferacija je analizirana MTT testom nakon tri dana. Rezultati su pokazali da IL-17 nije uticao na umnožavanje ćelija (**Slika 16.**), što ukazuje na to da ovaj citokin ne deluje kao mitogen već kao faktor mobilnosti za MMĆ, te da povećanje intenziteta migratornih procesa PK-MMĆ nije posledica stimulacije ćelijske proliferacije.

REZULTATI

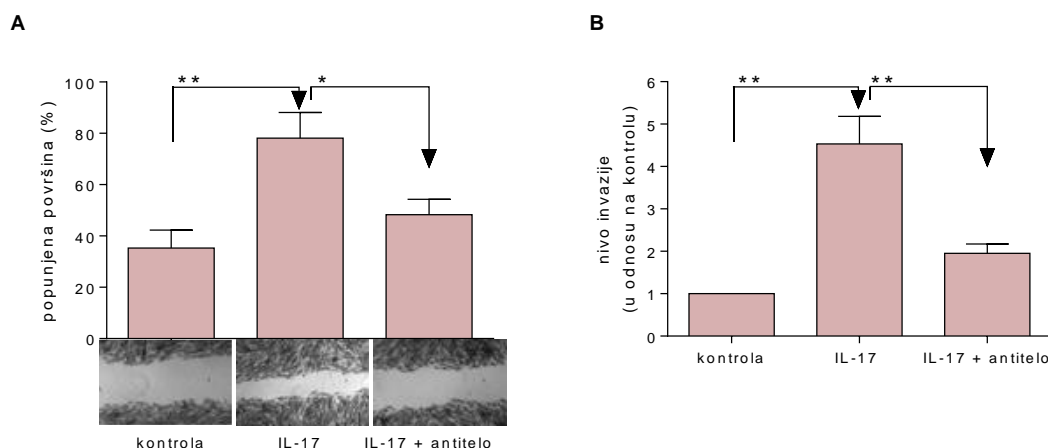


Slika 16. Efekat IL-17 na proliferaciju PK-MMĆ. Proliferacija PK-MMĆ merena je MTT testom nakon 24h inkubacije u standardnom medijumu bez ili sa IL-17 (0, 25 i 50 ng/ml). Rezultati su predstavljeni relativnim indeksom proliferacije kao % od kontrole (netretirane ćelije). Grafici predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM 3 nezavisna eksperimenta postavljena u triplikatu.

4.2.1.4. Specifičnost uloge IL-17 u migraciji PK-MMĆ

Da bi se odredilo da li je uloga IL-17 u migraciji PK-MMĆ direktna, *Scratch* esej i test hemotaksije su dodatno modifikovani tako što su efekti IL-17 blokirani specifičnim antitelom za ovaj citokin. Naime, dobijeni rezultati su pokazali da je migratorni kapacitet PK-MMĆ u prisustvu antitela za IL-17 umanjen u oba testa (**Slika 17.**) što upućuje na činjenicu da je IL-17 primarni faktor koji indukuje povećanu mobilnost ćelija u ovim eksperimentima.

REZULTATI



Slika 17. A) Migracija PK-MMĆ analizirana scratch esejem. Nakon zagrebavanja monosloja ćelija, ćelije su kultivisane sa ili bez IL-17 (50 ng/ml) u prisustvu ili odsustvu antitela za IL-17 (4 µg/ml). Stubići predstavljaju procenat površine popunjene ćelijama nakon 24h, a prikazane su reprezentativne slike uveličanja $\times 40$. B) Za test hemotaksije ćelije obeležene PKH26 postavljene su u gornji odeljak, a IL-17 (50 ng/ml), sa ili bez antitela za IL-17 dodat je u donji odeljak. Nakon 16h ćelije koje su prošle membranu fiksirane su, i pobrojane u 10 nasumičnih polja epifluorescentnim mikroskopom.; Grafici predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije): * $p < 0,05$ i ** $p < 0,01$.

4.2.1.5. Efekat IL-17 na remodelovanje VĆM tokom migracije PK-MMĆ

Kako je jedan od ključnih događaja tokom ćelijske migracije proizvodnja vanćelijskih proteinaza koje obezbeđuju ćelijama remodelovanje VĆM ili direktno pojačavaju njihovu mobilnost, eksperimenti koji su usledili imali su za cilj da odrede da li IL-17 modifikuje kapacitet PK-MMĆ da produkuje uPA i MMP.

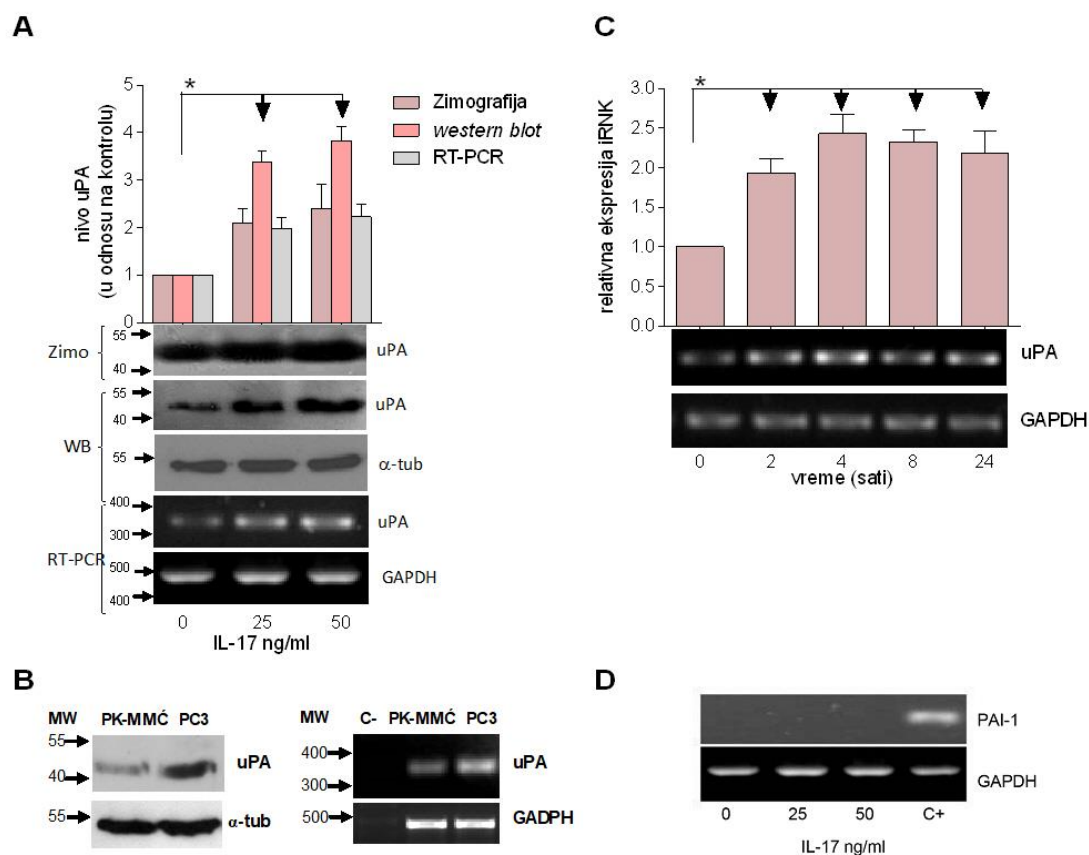
4.2.1.5.1. Efekat IL-17 na ekspresiju uPA kod PK-MMĆ

Ćelije su kultivisane u prisustvu 25 i 50 ng/ml IL-17 u medijumu bez seruma 24 h kako bi se odredila ekspresija i aktivnost uPA, pri čemu su za kontrolu korišćeni uzorci koji nisu tretirani ovim citokinom. *Western blot* metodom određivana je ekspresija uPA kod PK-MMĆ, dok je zimografijom određivana aktivnost uPA koja je sekretovana u okolni medijum. Dobijeni rezultati pokazali su da su primenjene koncentracije IL-17 značajno povećale produkciju i aktivnost uPA kod PK-MMĆ što je potvrđeno i na transkripcionom nivou, RT-PCR analizom (**Slika 18.A**). Kao pozitivna

REZULTATI

kontrola za ekspresiju ove humane iRNK i proteina korišćene su PC3 ćelije (**Slika 18.B**). Povećanje ekspresije uPA indukovano interleukinom-17 bilo je brzo, sa značajnim povećanjem vidljivim nakon dva sata od početka tretmana, i u svim ispitanim vremenskim periodima do 24h uočena je dvostruko veća ekspresija enzima u odnosu na kontrolu bez IL-17 (**Slika 18.C**). Dodatno je RT-PCR analizom pokazano i da IL-17 nije indukovao ekspresiju fiziološkog inhibitora urokinaze - PAI-1 (od engl. *plasminogen activator inhibitor-1*), pri čemu su se kao pozitivna kontrola koristile PC3 ćelije tretirane TGF- β (**Slika 18.D**). Ovi rezultati sugerišu da IL-17 direktno modulise ekspresiju uPA kod PK-MMĆ.

REZULTATI



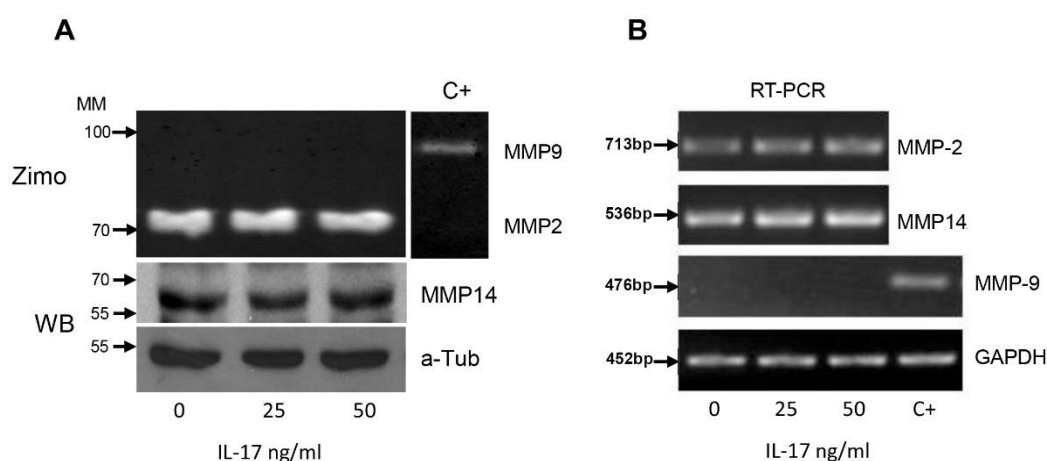
Slika 18. Efekat IL-17 na ekspresiju uPA kod PK-MMĆ. A) PK-MMĆ su inkubirane u medijumu bez seruma tokom 24h sa 0, 25 i 50 ng/ml IL-17. Aktivnost uPA je analizirana zimografijom, a ekspresija RT-PCR i western blot (WB) metodom. Rezultati su normalizovani u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije). B) Ekspresija uPA kod PK-MMĆ u poređenju sa ekspresijom kod PC3 ćelija korišćenih kao pozitivna kontrola, potvrđena WB metodom (levo) i RT-PCR (desno). C) Vremenska ekspresija iRNAK za uPA indukovanu IL-17 (50 ng/ml) određena RT-PCR metodom. Izražena je relativna ekspresija iRNAK za uPA u odnosu na ekspresiju GAPDH i normalizovana u odnosu na kontrolu (0 h). D) Efekat IL-17 (0, 25 i 50 ng/ml) na ekspresiju PAI-1 određen RT-PCR metodom. PC3 ćelije tretirane TGF- β (10 ng/ml) korišćene su kao pozitivna kontrola; Stubići predstavljaju srednju vrednost 3 nezavisna eksperimenta \pm SEM. Statistička značajnost u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$. α -tubulin i GAPDH korišćeni kao kontrole za iste količine proteina odnosno cDNK. Molekulska masa za proteine izražena je u kDa, a za gene u bp.

4.2.1.5.2. Efekat IL-17 na ekspresiju MMP kod PK-MMĆ

S obzirom da su pored uPA u ćelijsku migraciju MMĆ uključene i MMP, u istoj eksperimentalnoj postavci ispitivan je efekat IL-17 na ekspresiju MMP kod PK-MMĆ. Rezultati su pokazali da PK-MMĆ ekspimiraju MMP-2 i MT1-MMP/MMP14, pri čemu ekspresija, ali ni aktivnost MMP-9 nije detektovana (Slika 19.A). Primećeno je da IL-17 ni u jednoj koncentraciji ne utiče na aktivnost MMP-2 što je potvrđeno i na nivou

REZULTATI

genske ekspresije RT-PCR analizom. Dodatno, *western blot* i RT-PCR analizom pokazano je da proteinska i genska ekspresija MT1-MMP/MMP14 kod ovih ćelija takođe nije modulirana interleukinom-17 (**Slika 19.B**). PC-3 ćelije tretirane aktivatorom plazminogena (TPA, od engl. *tissue plasminogen activator*) tokom 24 h kao i njihov kondicioni medijum su korišćeni kao pozitivna kontrola za ove analize.



Slika 19. Efekat IL-17 na ekspresiju MMP kod PK-MMĆ. A) aktivnost MMP-2 i MMP-9 određena zimografijom i ekspresija MMP-14 određena wsetern blot (WB) metodom kod PK-MMĆ tretiranih IL-17 (0, 25 i 50 ng/ml) u medijumu bez seruma. Medijum TPA (100 ng/ml)-tretiranih PC3 ćelija korišćen je kao kontrola za zimografiju, a ekspresija α -tubulina za wb. B) ekspresija iRNK za MMP-2, MMP-14 i MMP-9 određena RT-PCR metodom pri čemu je GAPDH služio kao kontrola; Prikazani su reprezentativni gelovi. Molekulska masa za proteine izražena je u kDa, a za gene u bp.

4.2.1.5.3. Uloga uPA u migraciji indukovanoj interleukinom-17

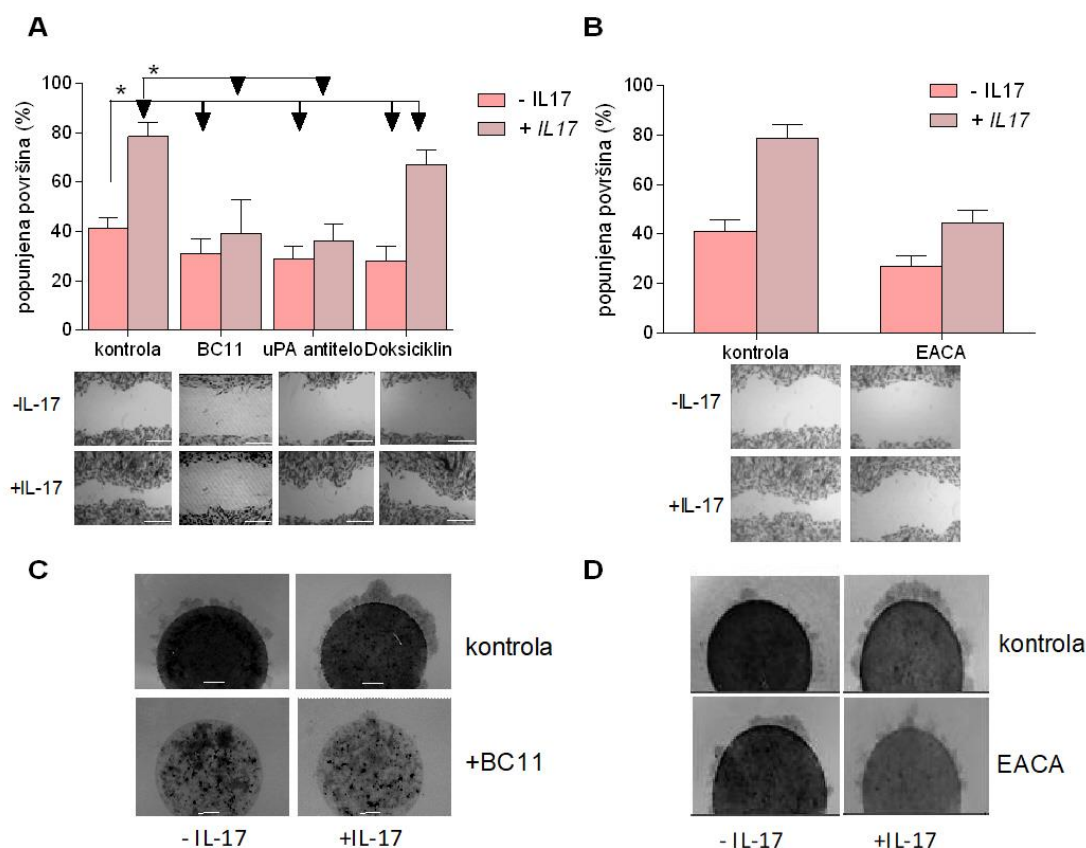
Scratch esej. Sa ciljem da se ispita da li je uPA uključena u migraciju indukovanu interleukinom-17 postavljen je *scratch* esej u kome su korišćeni selektivni inhibitor uPA, BC11 hidrobromid, kao i antitelo za uPA. Dobijeni rezultati pokazali su da su pored bazalne migracije oba agensa redukovala i migraciju stimulisanu interleukinom-17 (**Slika 20.A**). Kako bi se dodatno potvrdilo da je migracija koju stimuliše IL-17 posredovana samo urokinazom, u ovim eksperimentima korišćen je i MMP inhibitor širokog spektra, doksiciklin. Uočeno je da iako je doksiciklin smanjio bazalni nivo migracije PK-MMĆ, njegov efekat na migraciju ovih ćelija stimulisanu interleukinom-

REZULTATI

17 nije bio značajan (**Slika 20.A**). Pored toga, migracija PK-MMĆ bila je inhibirana usled delovanja EACA, agensa koji blokira mesta visokog afiniteta vezivanja za lizin na plazminu neophodnim za aktivaciju urokinazom (Z. Sun i sar., 2002) (**Slika 20.B**). Ovi rezultati ukazuju da je povećanje uPA odgovorno za povećanje nivoa migracije PK-MMĆ koje indukuje IL-17.

Mobilizacija iz kolagena. Kako bi se utvrdilo učešće uPA u procesu mobilizacije PK-MMĆ iz kolagena indukovane interleukinom-17, i u ovom eksperimentu efekti uPA su blokirani inhibitorom BC11. Primećeno je da je prisustvo BC11 izazvalo jaku inhibiciju mobilizacije ćelija iz kolagenskih kapi na bazalnom nivou kao i u prisustvu IL-17 (**Slika 20.C**). Mobilizacija PK-MMĆ je takođe bila inhibirana u prisustvu EACA (**Slika 20.D**). Ovi rezultati navode na zaključak da uPA posreduje i u mobilizaciji ćelija iz kolagena indukovanoj interleukinom-17.

REZULTATI



Slika 20. Uloga uPA u migraciji indukovanoj interleukinom-17. A) U *scratch* eseju PK-MMĆ su tretirane sa 50 ng/ml IL-17 u toku 24h u prisustvu ili odsustvu uPA inhibitora BC11 (50 μ M), antitela za uPA (5 μ g/ml) ili doksiciklina (1 μ g/ml). B) U *scratch* eseju PK-MMĆ su tretirane sa 50 ng/ml IL-17 u toku 24h u prisustvu ili odsustvu EACA. C) PK-MMĆ postavljene unutar kolagenskih kapi tretirane su sa ili bez IL-17 u prisustvu ili odsustvu 50 μ M BC11 i nakon 5 dana kapi su fiksirane i obojene. D) Mobilizacija PK-MMĆ iz kolagenskih kapi kolagen tretiranih sa ili bez IL-17 u prisustvu ili odsustvu EACA.; Grafici predstavljaju srednju vrednost \pm SEM procenta površine pokrivene migrirajuim ćelijama. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije): * $p < 0,05$. Prikazane su reprezentativne, uvećanje $\times 40$.

4.2.1.6. Molekularni mehanizmi uključeni u migraciju PK-MMĆ stimulisanu interleukinom-17

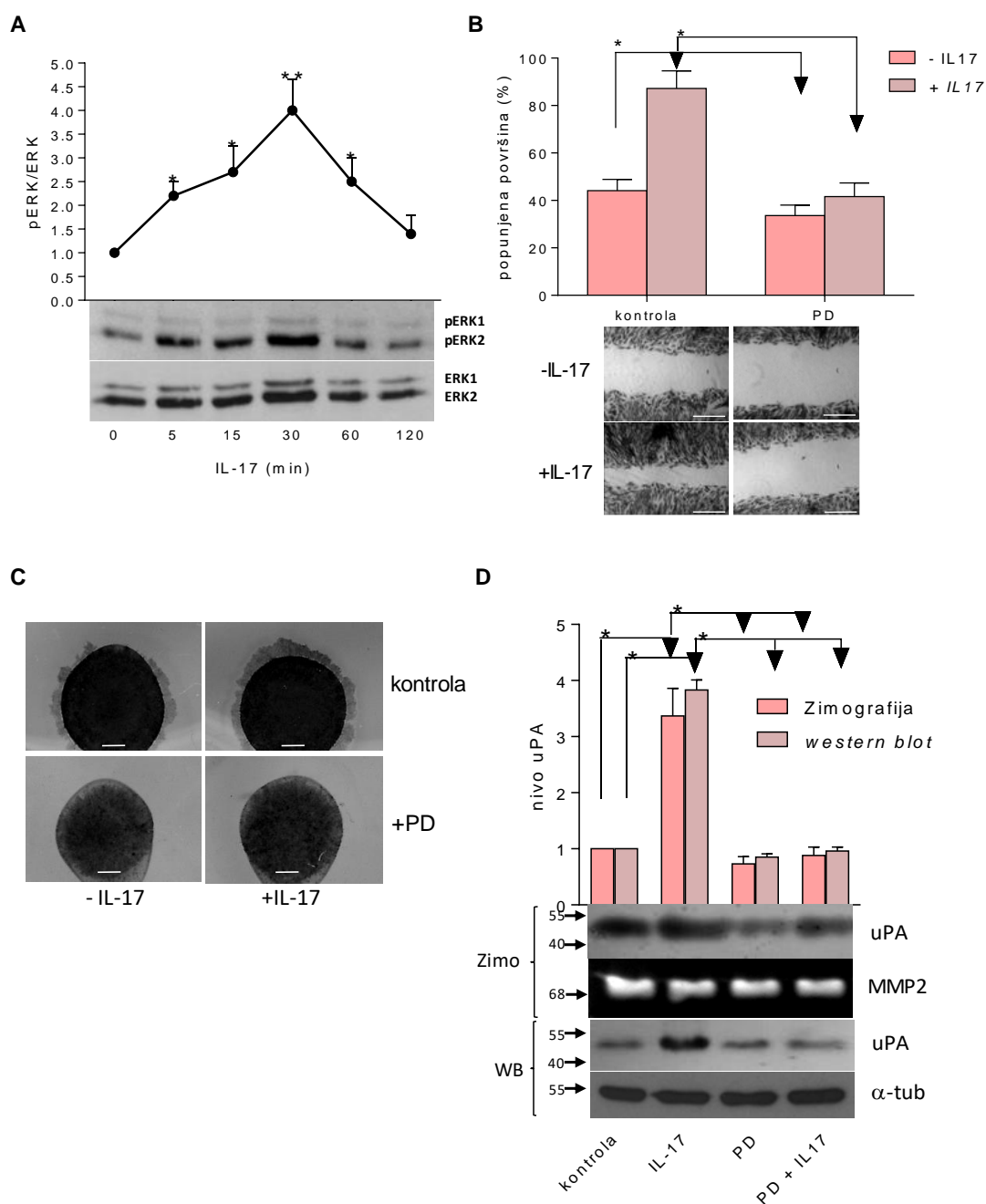
Da bi se ispitalo učešće MAPK signalnog puta u stimulaciji migracije PK-MMĆ interleukinom-17, u *scratch* eseju i eseju mobilizacije korišćeni su MAPK inhibitori PD-98059 i SB-203580 u prisustvu i odsustvu IL-17. U te svrhe, prvobitno je analizirana aktivacija ERK1/2 i p38 *western blot* metodom. Rezultati su pokazali da je IL-17 u koncentraciji od 50 ng/ml izazvao brzu aktivaciju ERK1/2 koja je uočljiva čak

REZULTATI

pet minuta nakon tretmana, a koja dostiže svoj maksimum nakon 30. minuta i naknadno se smanjuje do bazalnog nivoa (**Slika 21.A**). Uočeno je da je ERK1/2 inhibitor, PD-98059 redukovao bazalnu migraciju ovih ćelija i jako smanjio nivo njihove migracije i mobilizacije u prisustvu IL-17 (**Slika 21.B i C**). Sa ciljem da se utvrdi učešće ovog signalnog puta u stimulaciji povećanja ekspresije uPA interleukinom-17, 30 minuta pre dodavanja citokina, u kondicioni medijum bez seruma dodavani su MAPK inhibitori. Nakon 24 časa analizirana je ekspresija i aktivnost uPA *western blot* metodom i zimografijom. Kao kontrola za *western blot* korišćen je konstitutivno prisutni protein α -tubulin, dok je kao pozitivna kontrola za zimografiju praćena aktivacija MMP-2. Rezultati su pokazali da je PD-98059 inhibitor jako redukovao povećanje ekspresije uPA stimulisano interleukinom-17, kao i količinu sekretovane uPA u medijumu (**Slika 21.D**). Istovremeno, efekat inhibitora u prisustvu IL-17 na aktivnost MMP-2 nije uočen.

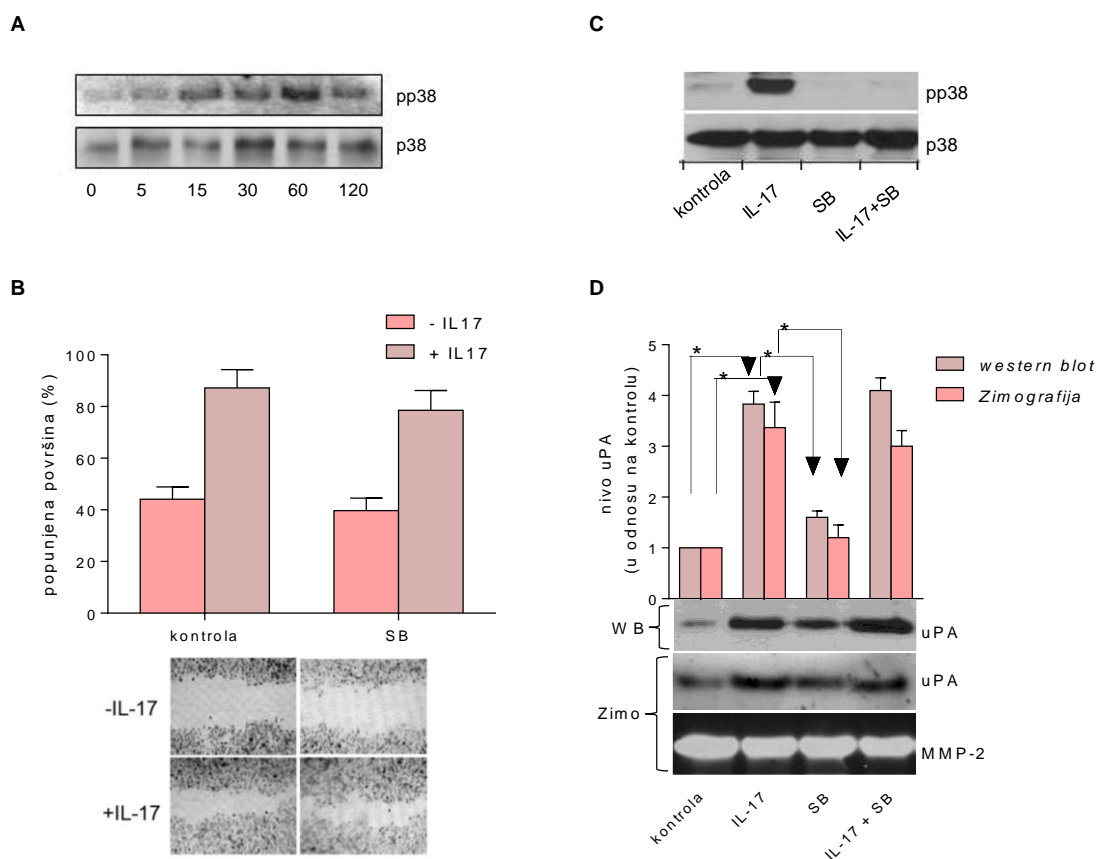
Iako su rezultati pokazali da IL-17 aktivira p38 kod PK-MMC' (**Slika 22.A i C**), prisustvo inhibitora SB-203580 nije imalo značajnog efekta na stimulaciju ćelijske migracije (**Slika 22.B**) i povećanja ekspresije uPA ovim citokinom (**Slika 22.D**).

REZULTATI



Slika 21. Molekularni mehanizmi uključeni u migraciju PK-MMĆ stimulisanu Interleukinom-17. A) Aktivacija ERK1/2 interleukinom-17 kod PK-MMĆ. PK-MMĆ su kultivisane u medijumu bez seruma sa ili bez 50 ng/ml IL-17 tokom naznačenih vremenskih perioda. Fosforilacija ERK1/2 određena je western blot (wb) metodom. Odnos gustine traka fosforilisane i totalne forme ERK1/2 određen je za svako odgovarajuće vreme, normalizovan u odnosu na kontrolu (0 h) i predstavljen u vidu stubića; Čelije su tretirane sa ili bez 50 ng/ml IL-17 u prisustvu ili odsustvu 25 μ M PD-98059 i praćena je: B) migracija PK-MMĆ u prisustvu MAPK inhibitora scratch esejem i izražena kao procenat površine pokrivena migrirajuim ćelijama, C) mobilizacija PK-MMĆ iz kolagenskih kapi i D) određena je aktivnost uPA u medijumu bez seruma zimografijom, a njena ekspresija WB metodom. α -tubulin i aktivnost MMP-2 korišćeni su kao kontrole. Vrednosti su izražene u odnosu na ćelije netretirane inhibitorom, a molekulske mase proteina na reprezentativnim gelovima izražene su u kDa.;Grafici predstavljaju srednju vrednost \pm SEM 3 nezavisna eksperimenta u triplikatima. Statistička značajnost u odnosu na odgovarajuću kontrolu (0h, odnosno ćelije netretirane inhibitorom): * p <0.05. Reprerzentativne slike migracije i kolagenskih kapi su uveličane 40x.

REZULTATI



Slika 22. Molekularni mehanizmi uključeni u migraciju PK-MMC stimulisanu Interleukinom-17. A) Aktivacija p38 interleukinom-17 kod PK-MMC. PK-MMC su kultivisane u medijumu bez seruma i tretirane sa 50 ng/ml IL-17 tokom naznačenih vremenskih perioda. Fosforilacija p38 određena je western blot metodom (WB). Prikazani su reprezentativni gelovi. PK-MMC su tretirane sa ili bez 50 ng/ml IL-17 u prisustvu ili odsustvu 10 μ M SB-203580 i praćena je: B) migracija ćelija u prisustvu p38 MAPK inhibitora scratch esejem. Stubići predstavljaju procenat površine pokrivena migrirajućim ćelijama, C) fosforilacija p38 i D) određena je aktivnost uPA u medijumu bez seruma zimografijom, a ekspresija WB metodom pri čemu je aktivnost MMP-2 korišćena kao kontrola; Grafici predstavljaju srednju vrednost \pm SEM 3 nezavisna eksperimenta u triplikatima. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije): * $p < 0.05$. Ispod grafika prikazane su reprezentativne trake. Reprezentativne slike migracije i kolagenskih kapi su uveličane 40x.

4.2.1.7. Reorganizacija citoskeleta tokom migracije indukovane IL-17

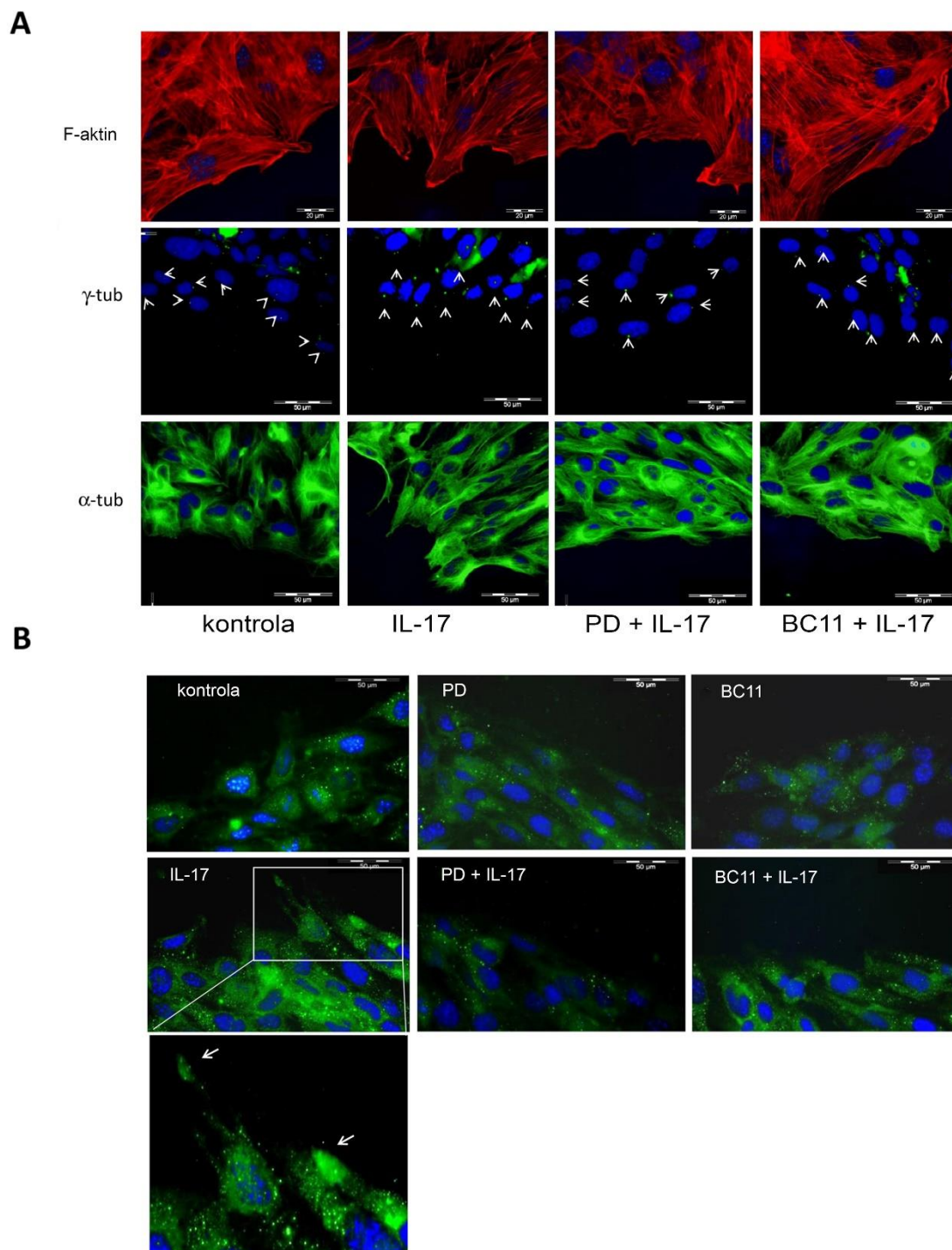
S obzirom da je jedan od glavnih mehanizama uključenih u ćelijsku migraciju reorganizacija citoskeleta, cilj narednog eksperimenta bio je ispitivanje eventualne uloge IL-17 u modulaciji organizacije citoskeleta i ćelijske polarizacije tokom migracije. U te svrhe postavljen je *scratch* esej gde su 30 minuta pre dodavanja IL-17 zagrebanom sloju PK-MMC, ćelije tretirane inhibitorima PD-98059 i BC11. Rezultati dobijeni imunofluorescentnim bojenjem pokazali su da je u prisustvu IL-17, F-aktin ovih ćelija u poređenju sa ćelijama bez IL-17 bio reorganizovan na taj način da su

REZULTATI

vlakna orijentisana ka zagrebanoj površini (**Slika 23.A**). Takođe, kod ćelija pozicioniranih uz samu ivicu zagrebane površine uočena je polarizacija centra organizacije mikrotubula (MTOC, od engl. *microtubule organizing center*) i to pomoću antitela za γ -tubulin, koji je većinom lokalizovan između nukleusa i ćelijskih nastavaka (**Slika 23.A**). Primećeno je da je usled dejstva ERK1/2 inhibitora, γ -tubulin zauzimao nasumičan raspored dok je F-aktin zauzimao poziciju paralelnu sa ivicom zagrebane površine, što ukazuje na to da PK-MMĆ gube svoj „mobilni“ fenotip u prisustvu ovog inhibitora. U uslovima delovanja uPA inhibitora, ćelijska migracija je bila inihibirana, a F-aktin je lokalizovan na ivici zagrebane površine. Međutim, efekat na polarizaciju ćelija indukovanu interleukinom-17 je slabiji u odnosu na inhibiciju koju ostvaruje PD-98059.

Pored toga, imunofluorescentnim bojenjem pokazano je da je uPA lokalizovana na samoj migrirajućoj površini grupe PK-MMĆ pokazujući „tačkasti“ obrazac (**Slika 23 B**). Kretanje ćelija indukovano interleukinom-17 praćeno je lokalizovanjem uPA u ćelijskim protruzijama (**Slika 23.B**) koje se pružaju na ivici zagrebane površine, što je u prisustvu ERK1/2 ili uPA inhibitora jako redukovano.

REZULTATI



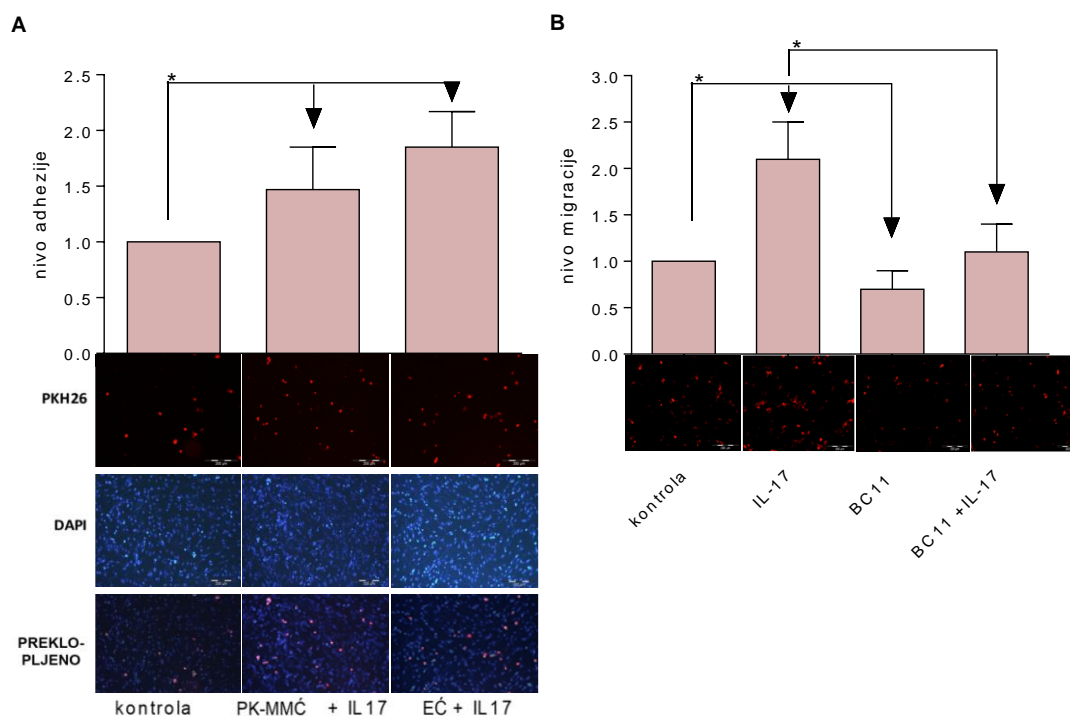
Slika 23. Reorganizacija citoskeleta tokom migracije indukovane IL-17. A) Čelije su migrirale u scratch eseju u prisustvu ili odsustvu 50 ng/ml IL-17, sa ili bez 50 μ M BC11 ili 25 μ M PD-98059 u toku 6 h. Nakon fiksiranja, obeležene su faloidinom konjugovanim sa TRITC za detekciju F aktina (crveno), antitelom za γ - tubulin za detekciju MTOC (u zelenom obeleženo strelicama) i DAPI (plavo) za nukleuse. Fotografisane su čelije na ivici zagrebane površine. Uveličanje za γ - i α -tubulin 400 \times , i za F-aktin 600 \times . B) Za detekciju uPA, PK-MMC su bojene antitelom za uPA i odgovarajućim sekundarnim antitelom konjugovanim sa FITC (zeleno) i DAPI (plavo) za nukleuse. Zumirana slika ukazuje na lokalizaciju uPA u čelijskoj protruziji čelija u tretmanu IL-17. Uveličanje 400 \times . Prikazane su reprezentativne slike 3 nezavisna eksperimenta.

4.2.1.8. Efekat IL-17 na adheziju i transendotelsku migraciju PK-MMĆ

Jedan od prvih koraka u odgovoru cirkulišućih MMĆ na signale iz oštećenih tkiva jeste adhezija za endotel i dijapedeza kroz endotelški monosloj. Kako bi se utvrdilo da li IL-17 reguliše adheziju PK-MMĆ na endotelški sloj ćelija, za potrebe međućelijskog adhezionog testa, PK-MMĆ i endotelške ćelije su prvobitno tretirane IL-17 u toku 24 časa. Primećeno je ne samo da je pretretman PK-MMĆ interleukinom-17 povećao kapacitet ovih ćelija za adheziju na endotelške ćelije, već i da je pretretman endotelških ćelija ovim citokinom ostvario isti efekat na PK-MMĆ (**Slika 24.A**). Ovi rezultati sugerišu da IL-17 reguliše adheziju MMĆ na endotelške ćelije delujući na oba tipa ćelija.

S obzirom da se nakon interakcije sa endotelškim ćelijama MMĆ integrišu u endotelšku barijeru i potom prolaze kroz istu, cilj daljeg istraživanja bio je da se utvrdi eventualni efekat IL-17 na transendotelsku migraciju PK-MMĆ, kao i učešće uPA u ovom procesu. U te svrhe odrađen je migracioni test hemotaksije baziran na *Boyden* komori, za koji su PK-MMĆ obeležene PKH-26 bojom postavljene u gornju komoru u prisustvu ili odusustvu uPA inhibitora BC11, dok je IL-17 dodat u donju komoru kao hemoatraktantni faktor. Dobijeni rezultati su pokazali da je u prisustvu IL-17 transmigracija ćelija bila povećana, dok je inhibicija uPA onemogućila taj efekat (**Slika 24.B**). Pored toga, inhibicija uPA uticala je na bazalni kapacitet ćelija da se kreću kroz endotelški sloj. Dobijeni rezultati ukazuju na to da IL-17 povećava međućelijsku adheziju istovremeno povećavajući transendotelsku migraciju PK-MMĆ na način zavisen od aktivnosti uPA.

REZULTATI



Slika 24. Efekat IL-17 na adheziju PK-MMĆ na endotel i transendotelisku migraciju PK-MMĆ. PK-MMĆ obeležene su PKH26 reagensom i primenjene A) u testu adhezije sa endoteliskim ćelijama obeleženim DAPI. Proverena je adhezija PK-MMĆ pretretiranih IL-17 (50 ng/ml, 24 h) za endoteliske ćelije kao i adhezija PK-MMĆ za endoteliske ćelije koje su pretretirane IL-17 (50 ng/ml, 24 h) i B) za transmigraciju kroz endoteliski monosloj postavljen u gornju komoru transwell sistema, pri čemu je u donju komoru dodat IL-17 (50 ng/ml) kao hemoatraktant, a BC11 inhibitor uPA (50 μ M) u obe komore; Grafići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM iz 3 nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije): * p < 0,05. Fluorescentno obeležene ćelije su fiksirane i zabeležene epi-fluorescentnim mikroskopom. Prikazane su reprezentativne fotografije, uveličanje 200 \times .

4.2.1.9. Efekat IL-17 na adheziju PK-MMĆ za fibronektin

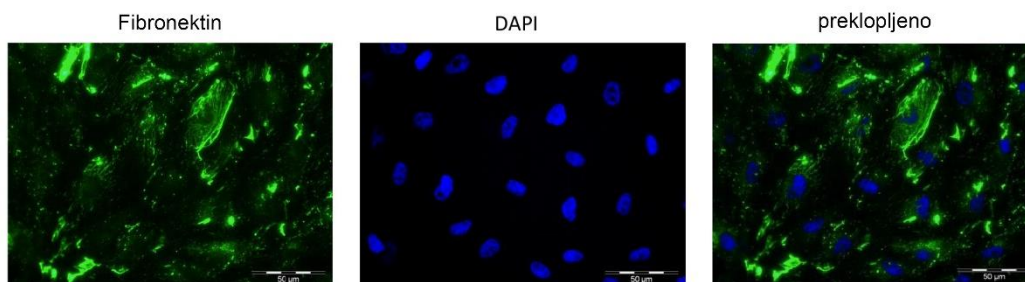
Kako bi se ispitaio kapacitet endoteliskih ćelija da proizvode i akumuliraju fibronektin, jednu od komponenti podendoteliske bazalne membrane koja je uključena u endotelisku propustljivost, ćelije su imunofluorescentno obeležene na fibronektin. Uočeno je da nepermeabilizovani endoteliski monosloj eksprimira fibronektin, koji se većinski akumulira oko ćelijske membrane (**Slika 25.A**). S obzirom da je neophodno da MMĆ interaguju sa podendoteliskim VĆM kako bi prošle kroz bazalnu membranu i migrirale do oštećenog tkiva ili tkiva pod inflamacijom, ispitano je da li IL-17 moduliše adheziju PK-MMĆ za fibronektin. U te svrhe primenjen je adhezioni test u kojem su

REZULTATI

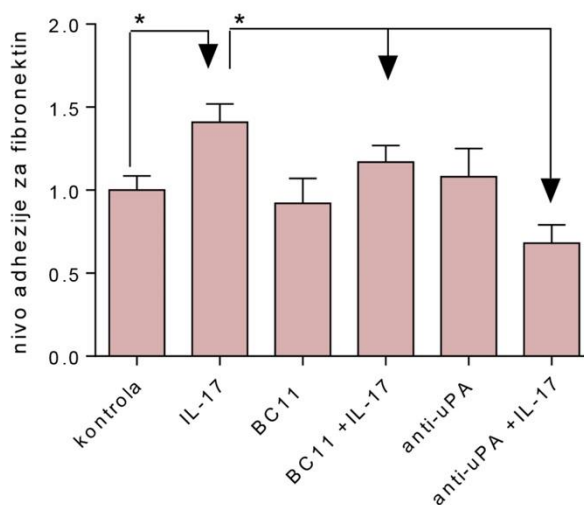
korišćene plastične ploče za kultivisanje ćelija prekrivene fibronektinom. Uočeno je da je preterman PK-MMĆ sa IL-17 povećao sposobnost vezivanja za fibronektin u poređenju sa netretiranim ćelijama, dok je prisustvo uPA inhibitora BC11, redukovalo taj efekat (**Slika 25.B**). Pored toga, prisustvo antitela za uPA koje inhibira ne samo vezivanje uPA za receptor, već i njenu aktivnost, dramatično je redukovalo adheziju ćelija za fibronektin, koju stimuliše IL-17 i to do nivoa nižeg od bazalne adhezije PK-MMĆ za fibronektin. Takođe, dobijeni rezultati su pokazali da inhibicija uPA BC11 inhibitorom, kao i inhibicija specifičnim antitelom, nije smanjila kapacitet PK-MMĆ za interakciju sa fibronektinom u odsustvu IL-17, što ukazuje na to da je bazalna komunikacija PK-MMĆ sa fibronektinom nezavisna od uPA.

REZULTATI

A



B

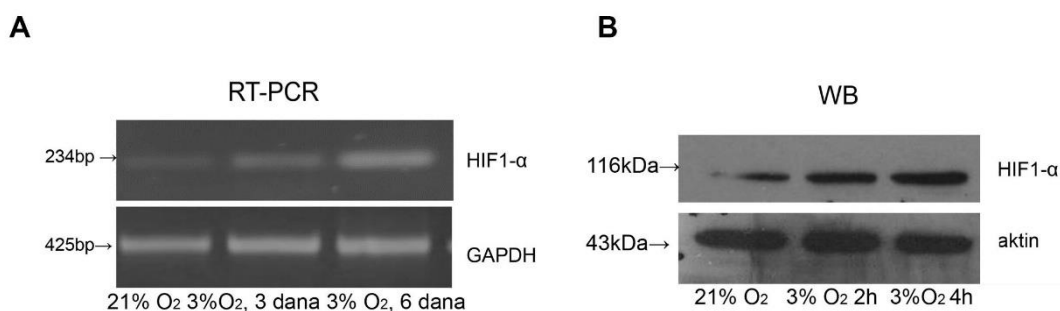


Slika 25. Efekat IL-17 na adheziju PK-MMĆ za fibronektin. A) Ekspresija fibronektina na endotelskim ćelijama određena je imunofluorescentnim obeležavanjem fibronektina (zeleno) i nukleusa DAPI (plavo). Prikazane su reprezentativne fotografije, uvećanje 400×. B) Adhezija PK-MMĆ na fibronektin. Ćelije su pretretirane IL-17 (50 ng/ml, 24 h) i izložene adheziji za ploče obložene fibronektinom u prisustvu uPA inhibitora BC11 ili antitela za uPA. Grafici predstavljaju srednju vrednost nivoa adhezije ± SEM iz 3 nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije): * $p < 0,05$.

4.2.2. EFEKTI IZMENJENE OKSIGENACIJE NA FUNKCIONALNA SVOJSTVA MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA IZ VARTONOVE SLUZI PUPČANIKA

4.2.2.1. Ekspresija HIF-1 α kod VS-MMĆ

S ciljem da se utvrdi efekat niskih koncentracija O₂ na svojstva VS-MMĆ, prvobitno je ispitana ekspresija glavnog regulatora odgovora ćelije na sistemske koncentracije O₂, HIF-1 α . Ćelije su kultivisane na 21% i 3% O₂ u određenim vremenskim periodima nakon čega je izolovana iRNK i analizirana genska ekspresija PCR metodom. Rezultati su pokazali da je ekspresija gena za HIF-1 α povećana pri kultivaciji VS-MMĆ na 3% O₂ tokom šest dana u odnosu na VS-MMĆ kultivisane na 21% O₂ (**Slika 26.B**). Ekspresija ovog faktora potvrđena je i na nivou proteina *western blot* metodom, pri čemu je, očekivano, ekspresija HIF-1 α povećana kultivacijom u hipoksiji.

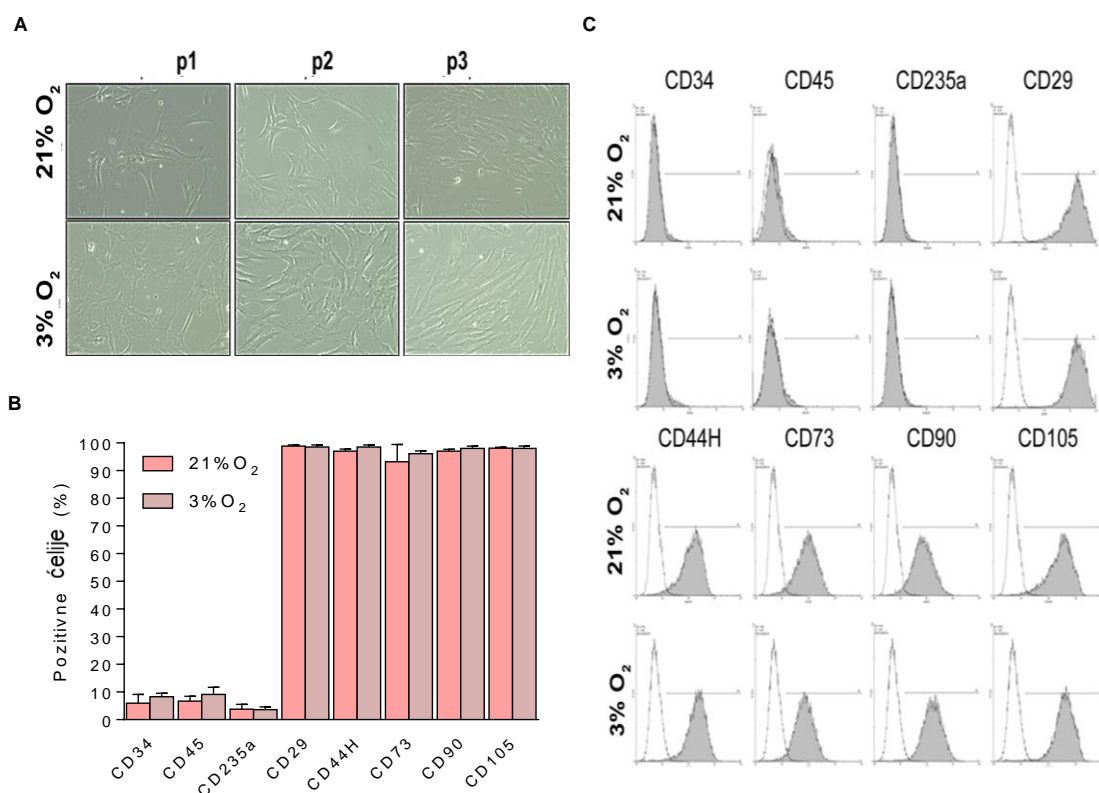


Slika 26. Ekspresija HIF-1 α kod VS-MMĆ. A) Ćelije su gajene na 21% i 3% O₂ i nakon 2 i 4 h praćena je ekspresija proteina *western blot* metodom B) a nakon 3 i 6 dana ekspresija iRNK za HIF1- α RT-PCR analizom. Aktin i GAPDH korišćeni su kao kontrole za istu količinu proteina odnosno cDNK. Prikazani su reprezentativni gelovi. Molekulske mase proteina izražene su u kDa, a dužine amplikona u baznim parovima i odgovarajuća pozicija na gelu obeležena je strelicom

4.2.2.2. Efekat 3% O₂ na mezenhimski fenotip VS-MMĆ

Kako bi se ispitali efekti hipoksije na fenotip izolovanih ćelija iz Vartonove sluzi, MMĆ su kultivisane na 21% i 3% O₂ tokom nekoliko pasaža pri čemu je praćena njihova morfologija. Dobijeni rezultati pokazali su da su ćelije ispoljavale morfologiju sličnu fibroblastima pri kultivaciji na obe koncentracije O₂ bez značajnih razlika (**Slika 27.A**). Efekat različitih koncentracija O₂ na imunofenotip VS-MMĆ analiziran je protočnom citometrijom. Primećeno je da ćelije kultivisane na 3% O₂ zadržavaju mezenhimski fenotip, što je dokazano pozitivnom ekspresijom mezenhimskih markera CD29, CD44H, CD73, CD90 i CD105 koje eksprimira preko 93% ćelijske populacije, a negativnom ekspresijom hematopoetskih ćelijskih markera CD34, CD45 i CD235a (**Slika 27.B i C**). Nije uočena statistički značajna razlika u ekspresiji ovih markera između ćelija kultivisanih na ovim koncentracijama O₂ te se stoga može zaključiti da 3% O₂ ne utiče na njihov imunofenotip.

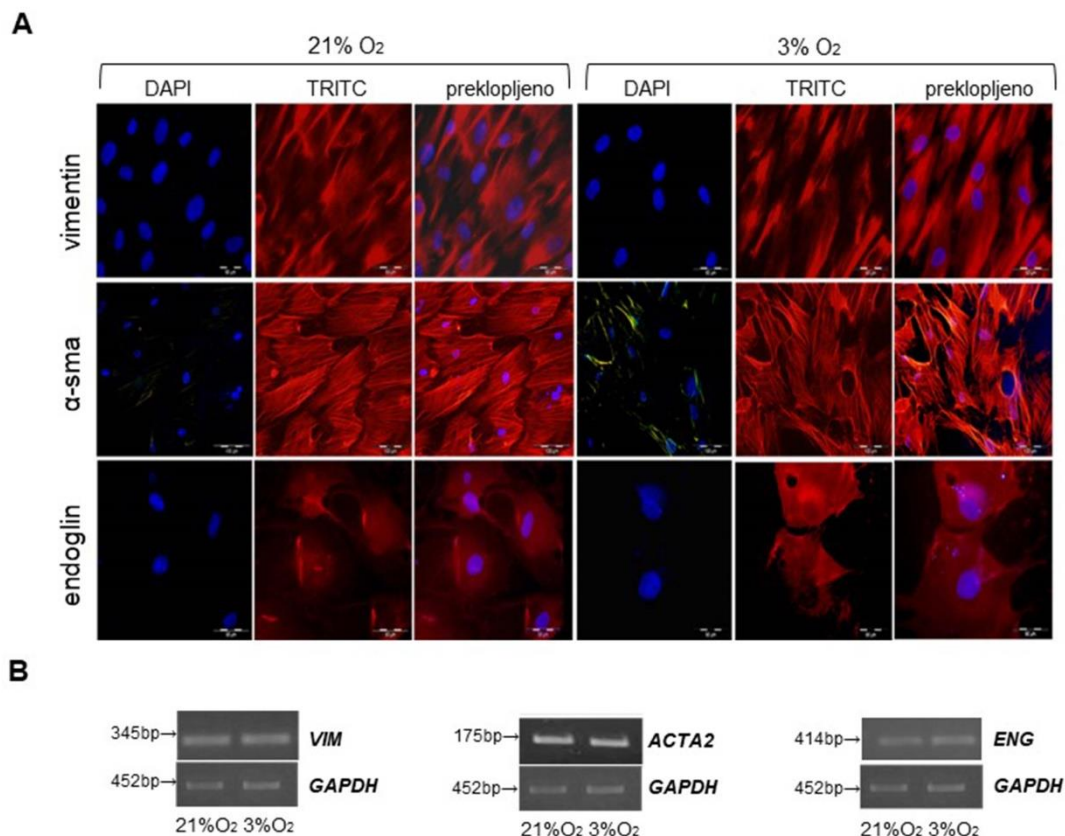
REZULTATI



Slika 27. Karakterizacija VS-MMĆ na različitim koncentracijama O₂. A) VS-MMĆ kultivisane na 21% i 3% O₂ pokazuju vretenastu morfologiju nalik fobroblastima koja se zadržava pri daljoj kultivaciji. Fazno-kontrastnim mikroskopom zabaležene su fotografije na pasaži 1, 2 i 3. B) VS-MMĆ su kultivisane na 21% i 3% O₂ i na trećoj pasaži protočnom citometrijom odrađena je imunofenotipska karakterizacija. Stubići pokazuju srednje vrednosti ± SEM procenta ćelija pozitivnih za ekspresiju CD markera. C) Na reprezentativnim histogramima predstavljena je ekspresija ispitivanih antigena (CD45, CD34, CD235a, CD29, CD44H, CD73, CD90 i CD105) u poređenju sa izotipskom kontrolom (beli histogrami)

Dodatno je imunofluorescentnim bojenjem praćen uticaj koncentracije O₂ na ekspresiju markera MMĆ kao što su α SMA, vimentin i endoglin (**Slika 28.A**). Uočeno je da pri kultivaciji ovih ćelija na niskoj koncentraciji O₂ ne dolazi do promene u ekspresiji ovih markera, i ovaj rezultat je potvrđen i na transkripcionom nivou RT-PCR metodom (**Slika 28.B**). Dobijeni rezultati ukazuju da pri kultivaciji na niskim koncentracijama O₂, VS-MMĆ zadržavaju svoje karakteristike.

REZULTATI



Slika 28. Mezenhimski fenotip VS-MMĆ na različitim koncentracijama O₂. A) Ekspresija markera MMĆ na 21% i 3% O₂ imunofluorescentnim obeležavanjem primarnim antitelom za vimentin, α-SMA i endoglin i sekundarnim antitelom konjugovanim sa TRITC (crveno). Nukleusi su obeležavani sa DAPI (plavo). B) reprezentativni gelovi ekspresije gena za vimentin (VIM), α-SMA (ACTA2) i endoglin (ENG) kod VS-MMĆ na 21% i 3% O₂. GAPDH korišćen je kao kontrola za istu količinu cDNK.

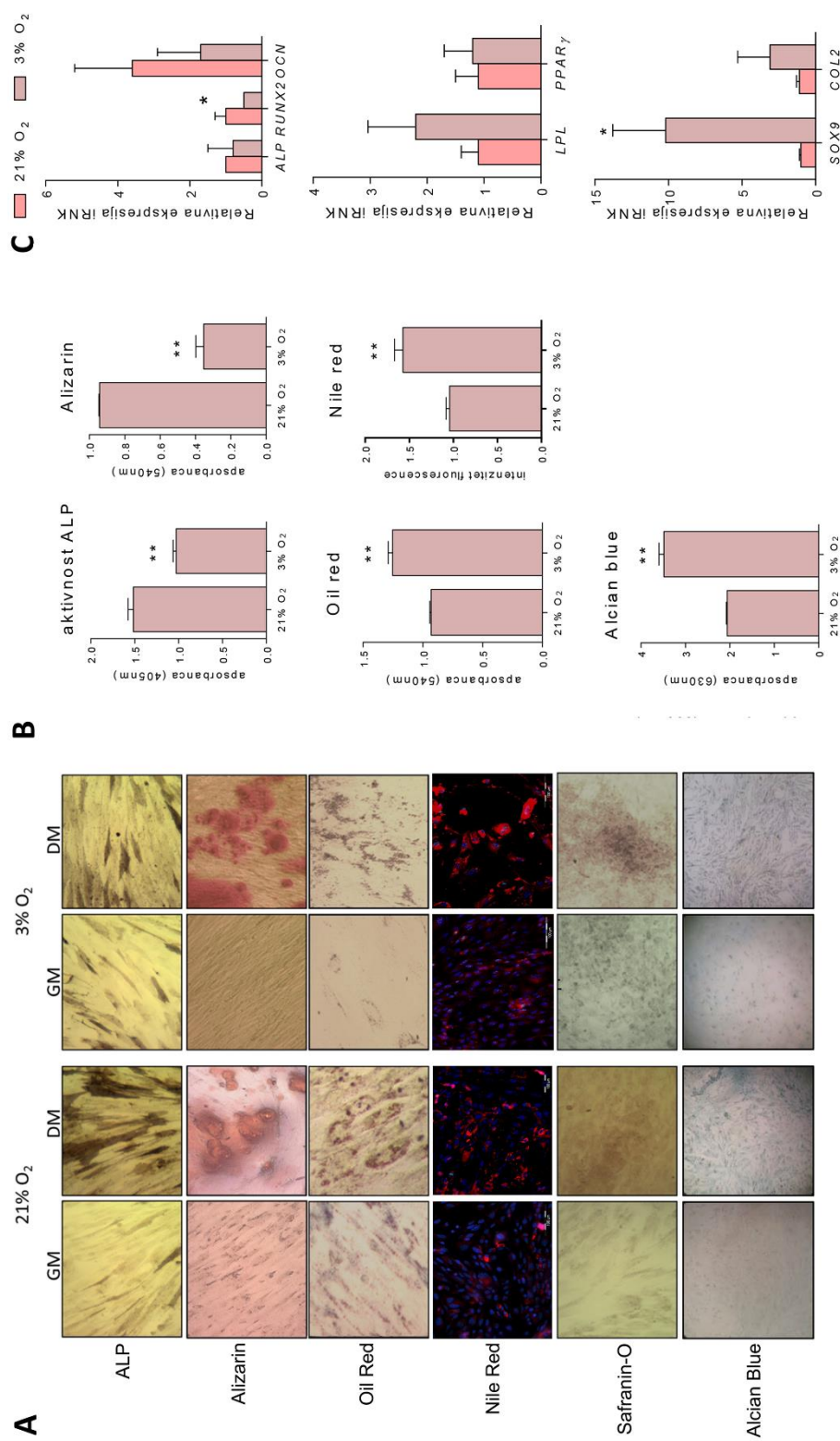
4.2.2.3. Efekat 3% O₂ na diferencijacioni potencijal VS-MMĆ

U cilju ispitivanja efekata različitih nivoa O₂ na diferencijacioni potencijal VS-MMĆ, ćelije su kultivisane u diferencijacionim medijumima na 21% i 3% O₂, i nakon odgovarajućeg perioda je diferencijacija u tri ćelijske loze analizirana specifičnim histohemijskim bojenjem i određivanjem ekspresije iRNK za specifične diferencijacione markere. Diferencijacioni potencijal VS-MMĆ potvrđen je na obe koncentracije O₂ (Slika 29.A). Vezano za osteogenu diferencijaciju, kod VS-MMĆ kultivisanih na 21% O₂ uočena je viša aktivnost ranog osteogenog markera ALP nakon nedelju dana kultivacije, i viši nivo mineralizacije nakon tri nedelje kultivacije u diferencijacionom medijumu. (Fig. 29.B). U skladu sa ovim rezultatima, ekspresija iRNK za gene relevantne za osteogenezu, ALP, RUNX2 (od engl. *Runt-related transcription factor 2*) i

REZULTATI

OCN (od engl. *Osteocalcin*) je takođe bila viša kada su VS-MMĆ kultivisane na 21% O₂ (**Slika 29.C**). Prilikom indukcije adipogene diferencijacije, broj lipidnih kapljica (**Slika 29.B**), kao i ekspresija iRNK za markere adipogene diferencijacije *PPAR* γ (od engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) i *LPL* (od engl. *Lipoprotein lipase*) su bili viši u uslovima kultivacije od 3% O₂ (**Slika 29.C**). Kod VS-MMĆ kultivisanih na 3% O₂ detektovan je viši nivo proteoglikana (**Slika 29.B**), a indukujući efekat 3% O₂ na hondroenu diferencijaciju podržan je i zabeleženom višom ekspresijom hondrogenih markera *SOX9* i *COL2* na 3% O₂ (**Slika 29.C**). Ovi rezultati ukazuju na to da 3% O₂ smanjuje osteogenu diferencijaciju i stimuliše adipogenu i hondroenu diferencijaciju VS-MMĆ.

REZULTATI

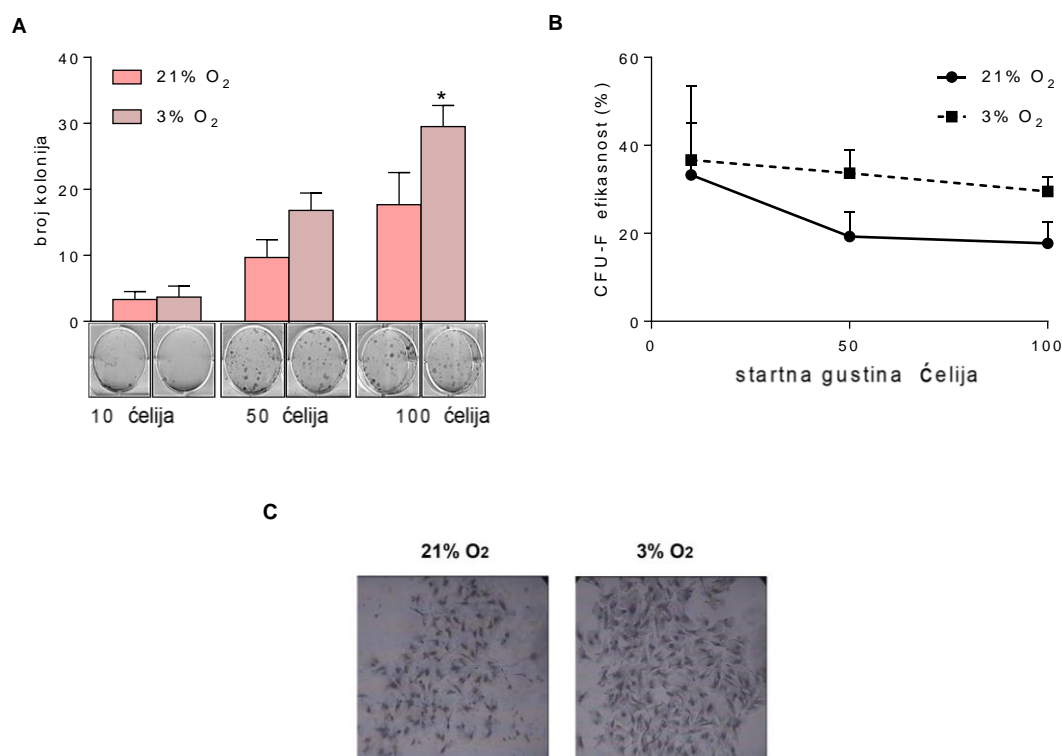


Slika 29. Diferencijacioni potencijal VS-MMC kultivisanih na 21% i 3% O₂. Nakon kultivacije VS-MMC na 21% i 3% O₂ u diferencijacionim medijumima u određenim vremenskim periodima potvrđena je A) osteogeneza pozitivnim bojenjem aktivnosti alkalne fosfataze (ALP) i mineralizacije alizarin red bojom, adipogeneza Oil red i Nile red bojenjem unutarćelijskih lipidnih kapi a hondrogeneza bojenjem proteoglikana safranin O i Alcian blue bojom; odrađena je B) kvantitativna analiza ALP, Alizarina, Oil red, Nile red i Alcian blue izražena apsorbancom ili intenzitetom fluorescencije i utvrđena C) ekspresija iRNK za ALP, RUNX2, OCN, LPL, PPAR γ , SOX9 i COL2 na 21% i 3% O₂ određena je Q-PCR analizom; Stubići predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM iz 3 nezavisna eksperimenta; Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (ćelije kultivisane na 21% O₂) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Reprezentativne slike uveličanja 100x

4.2.2.4. Efekat 3% O₂ na klonogeni potencijal VS-MMĆ

Kako bi se utvrdili efekti različitih koncentracija O₂ na klonogeni potencijal VS-MMĆ, praćena je sposobnost formiranja CFU-F kolonija. U te svrhe ćelije su zasejavane u koncentraciji od 10, 50 i 100 ćelija i kultivisane na 21% i 3% O₂ tokom 14 dana u standardnom medijumu. Rezultati su pokazali da su ćelije kultivisane na 3% O₂ formirale veći broj kolonija u odnosu na ćelije kultivisane na 21% O₂, sa statistički značajnim porastom broja kolonija pri inicijalnoj koncentraciji od 100 ćelija (**Slika 30.A**). Takođe, efikasnost VS-MMĆ da formiraju kolonije bila je obrnuto proporcionalna broju postavljenih ćelija i veća kod ćelija kultivisanih na 3% O₂ (**Slika 30.B**). Kvalitativna razlika kolonija na različitim koncentracijama O₂ nije uočena (**Slika 30.C**). Ovi rezultati sugerišu da 3% O₂ povećava klonogeni potencijal VS-MMĆ.

REZULTATI



Slika 30. Efekat 3% O₂ na klonogeni potencijal VS-MMĆ. A) Klonogeni kapacitet VS-MMĆ kultivisanih na 21% i 3% O₂ određen je kao broj kolonija u odnosu na inicijalni broj zasejanih ćelija. MMĆ su kultivisane na niskoj gustini od 10, 50 ili 100 ćelija/otvoru u standardnom medijumu 14 dana i CFU-F su bojene kristal violet bojom. B) Efikasnost formiranja kolonija nakon kultivisanja VS-MMĆ na različitim inicijalnim gustinama ćelija na 21% i 3% O₂ definisana je kao procenat odnosa broja kolonija i broja postavljenih ćelija; C) Izgled kolonija na 21% i 3% O₂. Vrednosti na graficima izraženi su kao srednja vrednost ± SEM iz 3 nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (ćelije kultivisane na 21% O₂): * $p < 0,05$.

4.2.2.5. Efekat 3% O₂ na vijabilnost i proliferaciju VS-MMĆ

Za potrebe ispitivanja efekata različitih koncentracija O₂ na vijabilnost VS-MMĆ, ćelije su kultivisane na 21% i 3% O₂ tri, pet i sedam dana i potom je primenjen MTT test. Rezultati su pokazali da do pet dana kultivacije ne postoji statistički značajna razlika u stepenu vijabilnosti ovih ćelija gajenih na različitim koncentracijama O₂. Međutim, nakon sedam dana, kultivacija na 3% O₂ značajno je povećala vijabilnost VS-MMĆ (Slika 31.A).

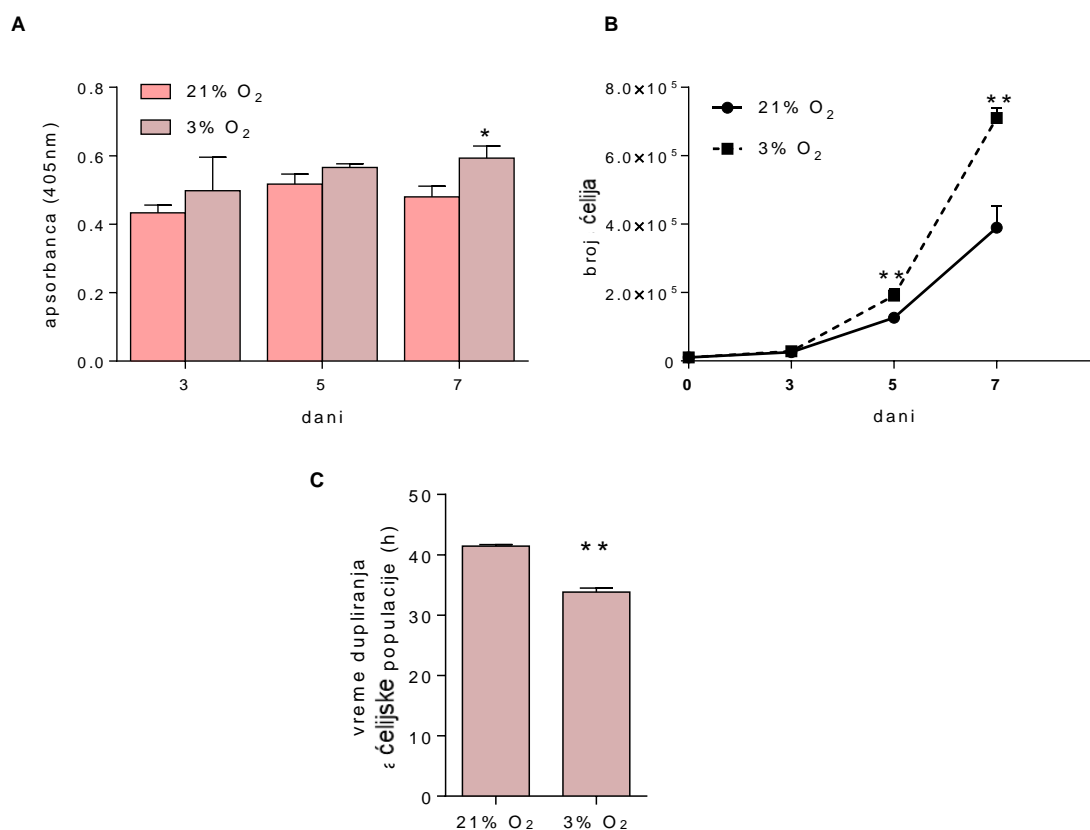
Efekat različitih koncentracija O₂ na proliferaciju VS-MMĆ praćen je u kratkotrajnim i dugotrajnim kulturama. Ćelije su kultivisane na 21% i 3% O₂ i nakon tri,

REZULTATI

pet i sedam dana odlepljivane su od plastike i brojane na hemocitometru. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da je kultivacija VS-MMĆ na 3% O₂ nakon pet i sedam dana statistički značajno povećala stepen proliferacije, te se zaključuje da u odnosu na kultivaciju ćelija na 21% O₂, kultivacija na 3% O₂ daje veći prinos ćelija (**Slika 31.B**).

Sa ciljem određivanja proliferativnog potencijala VS-MMĆ na različitim koncentracijama O₂ u dugotrajnim kulturama ćelija, VS-MMĆ su kultivisane na 21% i 3% O₂ tokom 24 dana pri čemu su nakon dostizanja konfluentnosti ćelije odlepljivane, brojane i ponovo postavljane u istoj početnoj koncentraciji i određeno im je vreme dupliranja ćelijske populacije. Rezultati ukazuju da VS-MMĆ proliferišu brže na 3% O₂, s obzirom da je njihovo prosečno vreme dupliranja populacije 33,8 h, dok je vreme dupliranja ćelija kultivisanih na 21% O₂ bilo 41,4 h (**Slika 31.C**).

REZULTATI

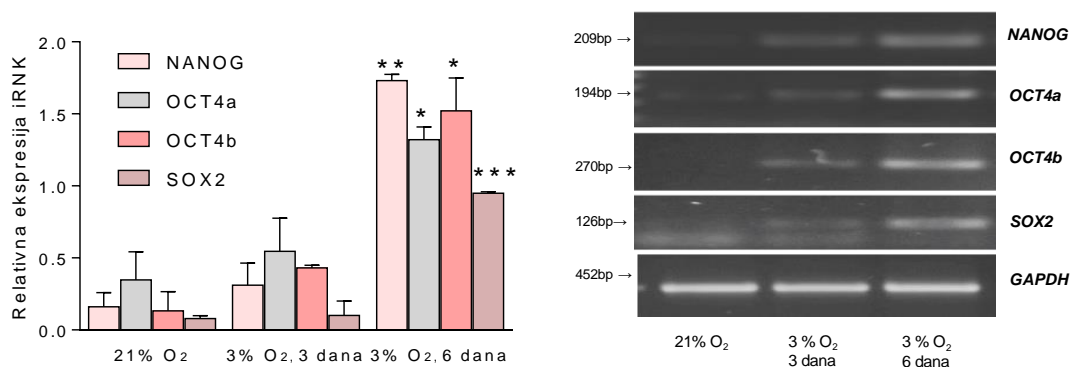


Slika 31. Efekat 3% O₂ na vijabilnost i proliferaciju VS-MMĆ. A) Vijabilnost VS-MMĆ određena je nakon 3, 5 i 7 dana kultivisanja ćelija na 21% i 3% O₂ MTT testom B) Proliferacija VS-MMĆ u kratotrajnim kulturama određena je nakon 3, 5 i 7 dana kultivacije ćelija na 21% i 3% O₂. C) Vreme dupliranja ćelijske populacije VS-MMĆ izračunato je nakon 24 dana u dugotrajnim kulturama ćelija na 21% i 3% O₂; Vrednosti na graficima izraženi su kao srednja vrednost ± SEM iz 3 nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (ćelije kultivisane na 21% O₂): **p* < 0,05, ***p* < 0,01.

4.2.2.6. Efekat 3% O₂ na ekspresiju markera pluripotentnosti VS-MMĆ

Efekti različitih koncentracija O₂ na „matičnost“ VS-MMĆ ispitani su analizom ekspresije genskih markera pluripotentnosti *NANOG*, *OCT4a*, *OCT4b* i *SOX2*. Ćelije su kultivisane na 21% i 3% O₂ u periodima od tri i šest dana nakon čega je izolovana iRNK i analizirana genska ekspresija PCR metodom. Uočeno je da je ekspresija sva četiri gena povećana nakon oba vremenska intervala na 3% O₂, sa statistički značajnim porastom ekspresije nakon šest dana (**Slika 32**).

REZULTATI



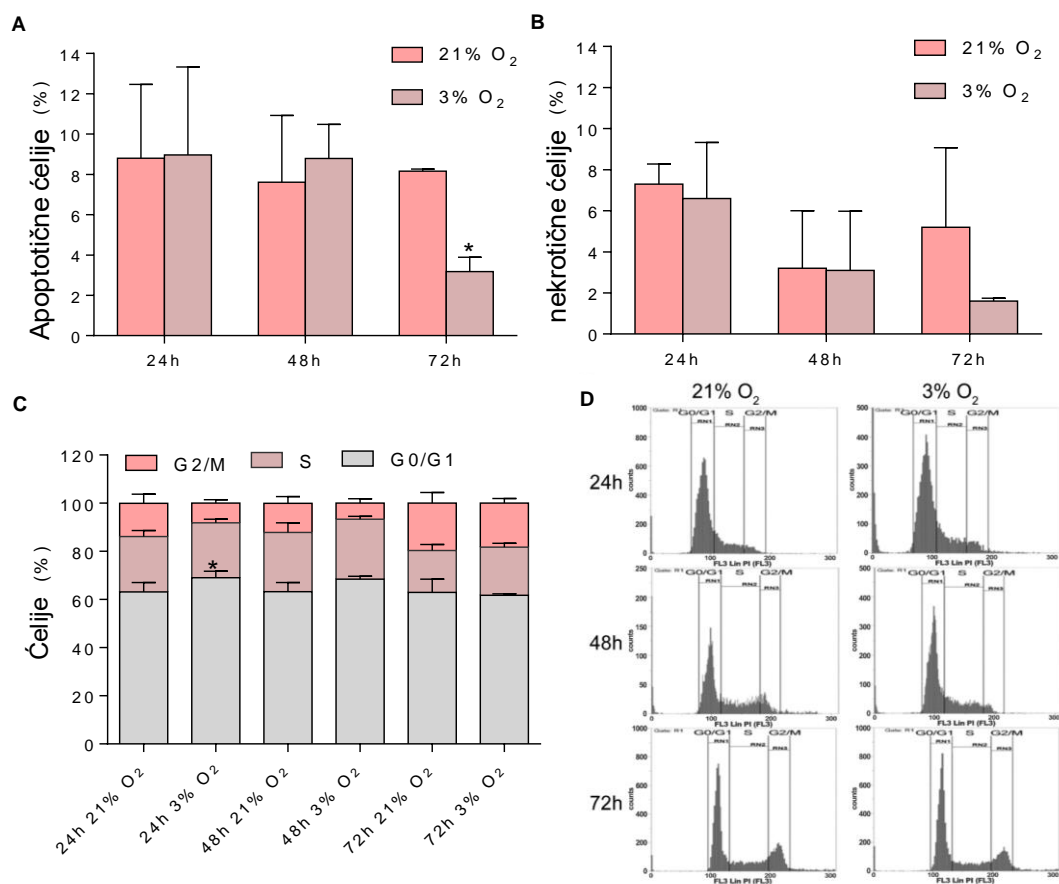
Slika 32. Efekat 3% O₂ na ekspresiju markera pluripotentnosti VS-MMĆ. Ekspresija iRNK za NANOG, OCT4a, OCT4b i SOX2 određena je RT-PCR metodom nakon kultivacije VS-MMĆ na 21% i na 3% O₂ u toku 3 i 6 dana. Stubići predstavljaju srednju vrednost relativnih ekspresija ispitivanih iRNK normalizovanih u odnosu na GAPDH ± SEM 3 nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (ćelije kultivisane na 21% O₂): *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001. Prikazani su reprezentativni gelovi, dužine amplikona izražene su u baznim parovima.

4.2.2.7. Efekat 3% O₂ na apoptozu i ćelijski ciklus VS-MMĆ

Efekat različitih koncentracija O₂ na ćelijsku smrt analiziran je protočnom citometrijom. VS-MMĆ su kultivisane na 21% i 3% O₂ u intervalima od 24, 48 i 72 časa i potom obeležene AnnexinV/PI. Sličan, mali broj apoptotičnih ćelija (oko 8%) uočen je nakon 24h i 48h kultivacije na obe koncentracije O₂ (**Slika 33.A**). Međutim, nakon 72h kultivacije, statistički značajno manji broj apoptotičnih ćelija uočen je kada su VS-MMĆ gajene na 3% O₂ u poređenju sa ćelijama gajenim na 21% O₂. Takođe, nakon 72h kod VS-MMĆ kultivisanih na 3% O₂ broj nekrotičnih ćelija je bio manji, ali ne statistički značajno (**Slika 33.B**).

Kako bi se ispitalo da li dolazi do promene profila ćelijskog ciklusa na različitim koncentracijama O₂, VS-MMĆ su kultivisane na 21% i 3% O₂ i nakon 24h, 48h i 72h obeležavane propidijum-jodidom i pripremane za analizu protočnom citometrijom. Prolazni porast u procentu ćelija u G₀/G₁ fazi uočen je nakon 24h kultivacije na 3% O₂ (**Slika 33.C i D**). Nakon 72h, procenat ćelija u G₀/G₁, S i G₂/M fazi, nije bio statistički značajno izmenjen ni na jednoj koncentraciji O₂. Ovi rezultati ukazuju da smanjenje nivoa O₂ ne menja značajno ćelijski ciklus VS-MMĆ i da štiti ćelije od ćelijske smrti.

REZULTATI



Slika 33. Efekat 3% O₂ na apoptozu i ćelijski ciklus VS-MMĆ. Ćelijska smrt VS-MMĆ kultivisanih na 21% i 3% O₂ analizirana je protočnom citometrijom obeležavanjem AnnexinV/PI. Stubići predstavljaju procenat A) apoptotičnih i B) nekrotičnih ćelija na ispitivanim koncentracijama O₂ nakon 24h, 48h i 72h. C) Efekat 3% O₂ na profil ćelijskog ciklusa VS-MMĆ obeleženih PI nakon 24h, 48h i 72h. Stubići predstavljaju procenat ćelija u G0/G1, S i G2/M fazi ćelijskog ciklusa. D) Reprezentativni histogrami pokazuju ćelijski ciklus VS-MMĆ na 21% i 3% O₂ nakon 24h, 48h i 72h; Svi rezultati prikazani su kao srednje vrednosti ± SEM 3 nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (ćelije kultivisane na 21% O₂): *p < 0,05.

4.2.2.8. Efekat različitih koncentracija O₂ na mobilnost VS-MMĆ

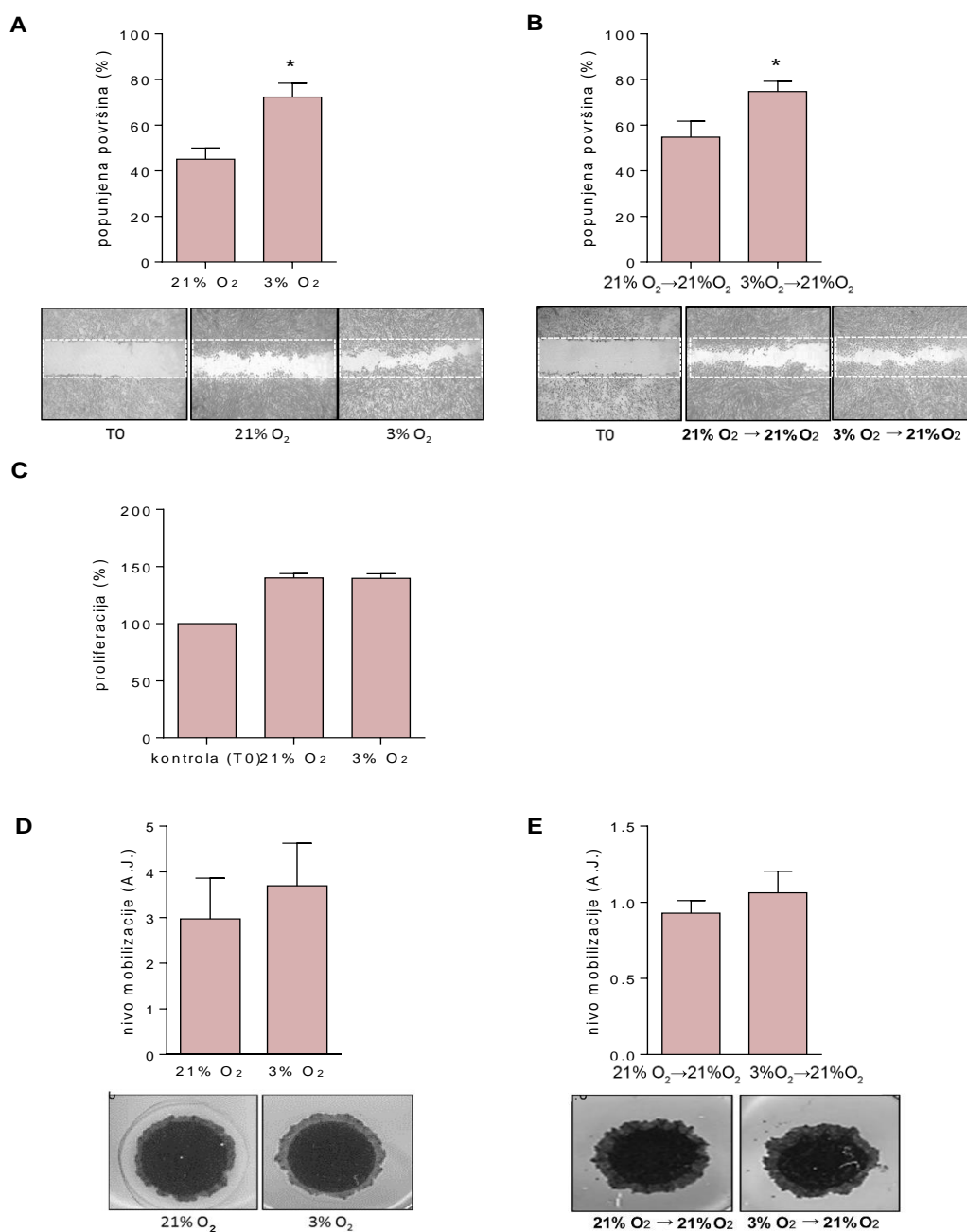
Migacija. Efekat različitih koncentracija O₂ na ćelijsku migraciju analiziran je *scratch* testom. U prvoj eksperimentalnoj postavci, VS-MMĆ su kultivisane do subkonfluentnosti u standardnim laboratorijskim uslovima na 21% O₂, a potom je monosloj ćelija zagreban i ćelije su migrirale na 21% ili 3% O₂ tokom narednih 24 časa. U drugoj eksperimentalnoj postavci, VS-MMĆ su prekulivisane do subkonfluentnosti na 21% ili 3% O₂, monosloj ćelija je zagreban i ćelije su potom migrirale u standardnim uslovima na 21% O₂. Uočeno je da je satistički značajan broj ćelija migrirao u

REZULTATI

zagrebanu zonu kada je nivo O_2 smanjen sa 21% na 3% (**Slika 34.A**), kao i da su VS-MMĆ koje su prekultivisane na 3% O_2 migrirale brže u odnosu na ćelije prekultivisane na 21% O_2 (**Slika 34.B**). Prethodni rezultati sa ovim ćelijama pokazali su da nije uočena razlika u njihovoj proliferaciji na različitim koncentracijama O_2 nakon 24h inkubacije, te se stoga dobijeni rezultati mogu pripisati samo migratornom kapacitetu ćelija (**Slika 34.C**).

Mobilizacija. Kako bi se ispitali efekti različitih koncentracija O_2 na mobilizaciju VS-MMĆ iz kolagena, ćelije su postavljane u kolagenske kapi i praćen je njihov stepen migracije iz kolagena u prisustvu određenih koncentracija O_2 . U te svrhe postavljena su dva nezavisna eksperimenta. Kao i za *scratch* esej, u jednoj postavci, kolagenske kapi sa VS-MMĆ su inkubirane na 21% i 3% O_2 u toku 72h nakon čega su fiksirane, bojene i merena je površina migracije ćelija iz kolagenske kapi. U drugoj postavci, pre postavljanja u kolagen, VS-MMĆ su prekultivisane na obe koncentracije O_2 u periodu od 72 časa. Zatim su kolagenske kapi kultivisane na standardnih laboratorijskih 21% O_2 kako bi se analizirao efekat prekultivacije na različitim koncentracijama O_2 na mobilizaciju ovih ćelija. Uočeno je da je niska koncentracija O_2 od 3% blago povećala mobilizaciju ćelija iz kolagenskih kapi, ali bez statističke značajnosti (**Slika 34.D**). Takođe, ćelije prekultivisane na 3% O_2 imale su neznatno veći kapacitet za migraciju iz kolagenskih kapi u odnosu na ćelije prekultivisane na 21% O_2 (**Slika 34.E**), ipak, uočena razlika nije statistički značajna. Ovi rezultati zajedno ukazuju na to da 3% O_2 poboljšava kapacitet za migraciju i mobilizaciju VS-MMĆ i taj trend je očuvan kada su ćelije ponovo kultivisane na 21% O_2 .

REZULTATI



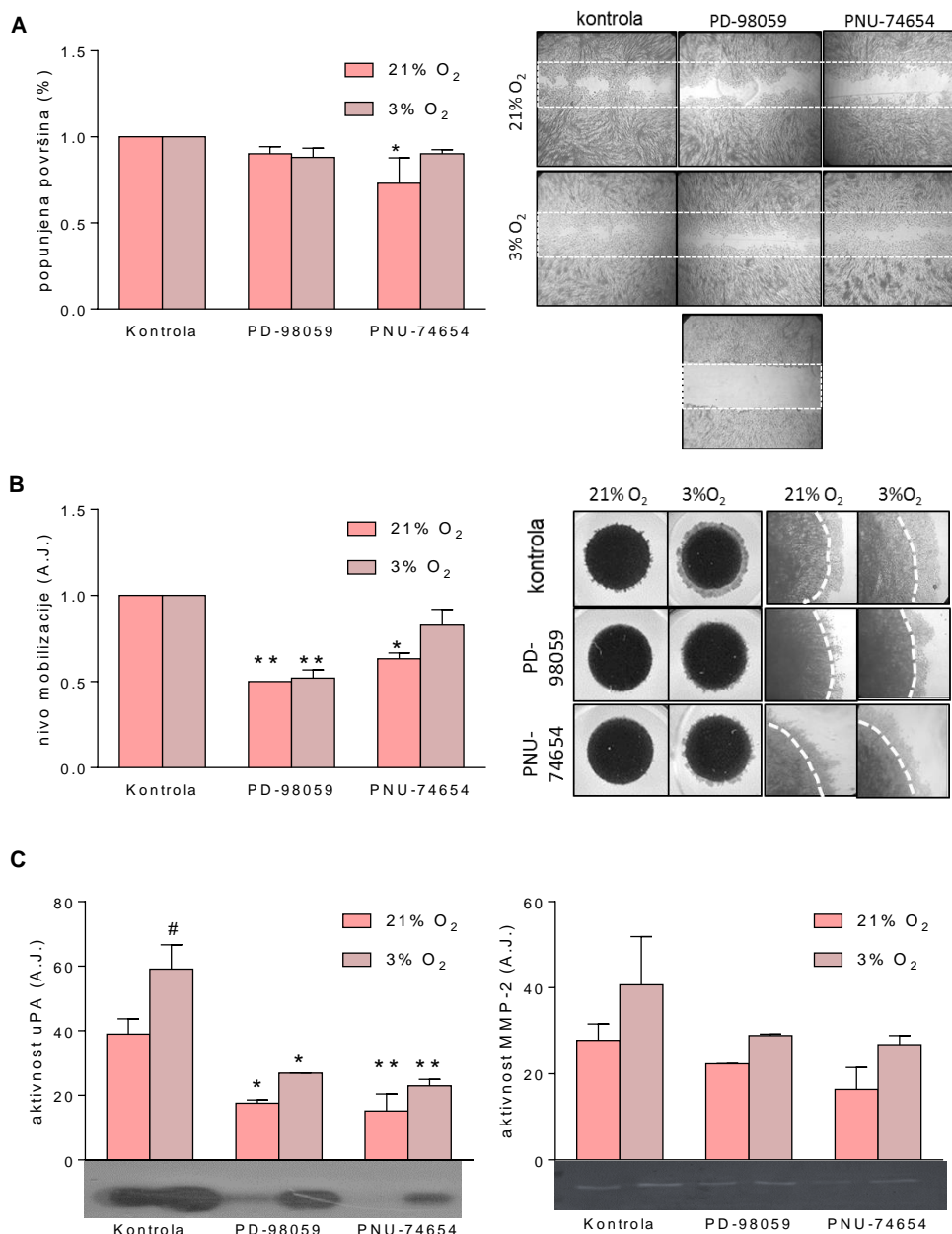
Slika 34. Efekat različitih koncentracija O₂ na mobilnost VS-MMC A) U scratch eseju su ćelije nakon zagrebavanja površine kultivisane na 21% i 3% O₂ tokom 24h i izračunat je procenat površine popunjene migrirajućim ćelijama. B) Nakon prekultivacije na 21% i 3% O₂ monosloj VS-MMC je zagreban i praćena je migracija na standardnih 21% O₂ tokom 24 h. Stubići predstavljaju procenat površine popunjene ćelijama. C) proliferacija VS-MMC na 3% i 21% O₂ nakon 24h. D) Mobilizacija VS-MMC je praćena nakon što su ćelije postavljene u kolagenske kapi inkubirane na 21% i 3% O₂ tokom 3 dana. Nakon fiksiranja i bojenja, kapi su slikane i izračunata je površina migrirajućih ćelija i predstavljena u vidu grafika. E) Nakon prekultivacije na 21% i 3% O₂ 3 dana, ćelije su postavljene u kolagen i kultivisane na standardnih 21% O₂ tokom 3 dana. Izračunata površina migrirajućih ćelija predstavljena je u vidu grafika.; Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SEM 3 nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (ćelije kultivisane na 21% O₂): *p < 0,05. Reprerzentativne fotografije migracije i kolagenskih kapi, uveličanje ×40 A.J. –arbitrarna jedinica.

4.2.2.9. Mehanizmi uključeni u migraciju i mobilizaciju VS-MMĆ na različitim koncentracijama O₂

Sa ciljem da se utvrde signalni putevi uključeni u migratorne procese VS-MMĆ kultivisanih na različitim koncentracijama O₂, korišćeni su specifični inhibitori signalnih puteva MAPK i *Wnt/β-catenin*. Za potrebe ovog eksperimenta *scratch* esej i esej mobilizacije iz kolagenskih kapi su modifikovani tako što su u standardni medijum dodati i PD-98059, inhibitor MAPK puta ili PNU-74654, inhibitor *Wnt/β-catenin* puta. Blago, ali statistički neznačajno smanjenje u migraciji ćelija uočeno je u prisustvu oba inhibitora na 3% O₂, dok je migracija ćelija na 21% O₂ bila značajno smanjena jedino u prisustvu PNU-74654 (**Slika 35.A**). Mobilizacija ćelija iz kolagena značajno je smanjena u prisustvu PD-98059 na obe koncentracije O₂, a u prisustvu PNU-74654 jedino u uslovima 21% O₂ (**Slika 35.B**).

Da bi se utvrdila aktivnost proteolitičkih enzima VCM kod VS-MMĆ kultivisanih na različitim koncentracijama O₂, postavljen je *scratch* esej u kome su ćelije migrirale na 21% i 3% O₂ u medijumu sa ili bez inhibitora PD-98059 i PNU-74654. Nakon 24h migracije, aktivnost preteolitičkih enzima uPA i želatinolitičkih MMP (MMP-2 i MMP-9) određena je metodom zimografije. Dobijeni rezultati su pokazali da su aktivnosti uPA i MMP-2 povišene kod ćelija kultivisanih na 3% O₂ u poređenju sa ćelijama kultivisanim na 21% O₂, mada je statistička značajnost zabeležena jedino u slučaju uPA (**Slika 35.C**). Aktivnost MMP-9 nije detektovana. Oba inhibitora su smanjila aktivnost ovih enzima bez obzira na koncentraciju O₂, s tim da je samo za smanjenje uPA uočena statistička značajnost. Utvrđeno je da su inhibitorni efekti PD-98059 i PNU-74654 izraženiji pri kultivaciji VS-MMĆ na 3% O₂.

REZULTATI



Slika 35. Mehanizmi uključeni u migraciju i mobilizaciju VS-MMĆ na različitim koncentracijama O₂. A) U scratch eseju VS-MMĆ su migrirale na 21% i 3% O₂ u prisustvu ili odsustvu MAPK inhibitora PD-98059 i Wnt/β-catenin inhibitora PNU-74654. Stubići predstavljaju procenat površine popunjene ćelijama. Vrednosti su normalizovane u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije). B) VS-MMĆ uronjene u kolagen su kultivisane na 21% i 3% O₂ u prisustvu ili odsustvu inhibitora. Grafici predstavljaju površinu migrirajućih ćelija normalizovanih u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije). C) Efekti inhibitora na aktivnost proteolitičkih enzima uPA i MMP-2 tokom migracije određena je zimografijom. Nakon što je površina monosloja ćelija zagrebana, VS-MMĆ su kultivisane u uslovima bez seruma na 21% i 3% O₂ u prisustvu ili odsustvu inhibitora; Rezultati su prikazani kao srednje vrednosti ± SEM 3 nezavisna eksperimenta. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (netretirane ćelije): *p < 0,05., **p < 0,01, i u odnosu na 21% O₂: #p < 0,05. Reprerzentativne slike zabeležene su mikroskopom, za migraciju uveličanjem ×40 a za kolagenske kapi uveličanjima ×40 i ×100. A.J-Arbitrarna jedinica

5. *DISKUSIJA*



DISKUSIJA

Saznanja o osobinama i efektima MMĆ, kao i poznavanje njihovog ukupnog potencijala, imaju za cilj njihovu praktičnu primenu u unapređenju aktuelnih ćelijskih terapija, poput efikasnije transplantacije ćelija i organa, ili *skrininga* terapeutika radi njihove bezbedne i efikasne upotrebe, kao i dostavljanja agenasa putem MĆ do mesta tumora, i drugo. Za razliku od EMĆ i IPMĆ, upotreba adultnih MMĆ se ne kosi sa zakonskim i etičkim pitanjima, a rizik za formiranje teratoma izostaje (*Lukomska i sar., 2019*). Invazivna metoda izolacije i relativno mali prinos ćelja izolovanih iz kostne srži, koje su dugo bile najproučavanije MMĆ, ustupaju mesto ćelijama iz drugih adultnih tkiva. Iako su MMĆ uspešno izolovane i okarakterisane iz velikog broja adultnih tkiva, osobine ovih ćelija poput kapaciteta samoobnove i potencijala usmerene diferencijacije, te prinosa prilikom izdvajanja, ne samo da se razlikuju u zavisnosti od izvora iz kog su izolovane, već i od uslova kultivacije.

Ova istraživanja su još uvek na početku, iako se MMĆ dobijene *in vitro* primenjuju na životinjskim modelima u prekliničkim ispitivanjima, i da se trenutno sprovode razne kliničke studije na pacijentima, od kojih je najveći broj u fazi I i II (*Galipeau i Sensébé, 2018; Squillaro i sar., 2016*). Većina pilot studija pokazala je da su MMĆ bezbedne *in vivo* ukoliko se adekvatno primene (*Lukomska i sar., 2019; Ren i sar., 2012*), ali da bi njihova upotreba rezultovala većim i sigurnijim doprinosom tkivnom inženjstvu, biotehnologiji i biomedicini uopšte, neophodna su, i dalje, detaljnija istraživanja kako same biologije MMĆ, tako i njihove kliničke primenjivosti. Međutim, pri ovim istraživanjima mora se uzeti u obzir da postoje biološka ograničenja koja nameću same MMĆ i njihova prirodna mikrosredina *in vivo*. Zahvaljujući dinamici i kompleksnosti niša u kojima MMĆ obitavaju, njihova sudbina je modulirana i regulirana mnogobrojnim ćelijskim i vanćelijskim faktorima udruženim sa brojnim spoljašnjim signalima. Veliki je broj literaturnih navoda koji sugerišu da istraživanja specifične mikrosredine MMĆ mogu da daju jasniji uvid u funkcije MMĆ i uključene regulatorne mehanizme, a sa ciljem optimizacije uslova za njihovu kultivaciju i potencijalnu primenu (*Vishwakarma i sar., 2017*). Međutim ova oblast je još uvek nedovoljno istražena. S tim u vezi, u ovoj disertaciji ispitivani su efekti mikrosredine na funkcionalna svojstva MMĆ izolovanih iz tkiva humanog pupčanika i periferne krvi, kao povoljnih izvora adultnih MMĆ sa potencijalnom terapijskom primenom. U okviru ispitivanja uloge proinflamatorne mikrosredine, određivan je uticaj IL-17 na migratorni

DISKUSIJA

kapacitet PK-MMĆ i molekularni mehanizmi koji su u to uključeni. Efekat različitih koncentracija O₂ analiziran je na MMĆ izolovanim iz tkiva pupčanika kao primeru ćelija koje se *in vivo* nalaze u hipoksičnoj miksredini reproduktivnog trakta, u cilju standardizovanja uslova kultivacije i umnožavanja MMĆ za njihovu potencijalnu primenu.

Ćelije izolovane iz periferne krvi i pupčanika pokazuju fenotip i karakteristike MMĆ

U istraživanjima obuhvaćenim ovom disertacijom MMĆ su izolovane iz humanog pupčanika i periferne krvi zdravih donora. Mezenhimske MĆ pupčanika su uspešno izolovane metodom eksplanta iz tri od ukupno 10 pupčanika, pri čemu nije uočena korelacija uspešnosti izolacije sa faktorima poput masivnosti tkiva, načina porođaja i karakteristika donora (majke). Svi uzorci uzimani su i izolovani nekoliko sati nakon porođaja i vreme izolacije u odnosu na porođaj nije beleženo, ali ranija zapažanja iz naše Laboratorije su ukazala da je uspeh izolacije VS-MMĆ zavisio od vremena proteklog između preuzimanja tkiva pupčanika iz bolnice do početka postupka izolacije (*Trivanović i sar., 2013*). U literaturi je zabeleženo da na prinos VS-MMĆ ima efekta težina novorođenčeta (*Rezniczek i sar., 2016*) (za šta podatke pri uzimanju tkiva nismo dobili u ovoj studiji). U jednom israživanju, na uzorku od šest pupčanika, uočen je veći prinos pri izolaciji MMĆ iz fetalnog i majčinskog segmenta u odnosu na središnji segment pupčanika te da je pupčanik većeg dijametara davao i veći prinos ćelija (*Lim i sar., 2016*). Ipak, opsežno ispitivanje na većem broju uzoraka je neophodno kako bi se pronašla korelacija između uspešnosti izolacije i parametara donora.

Mezenhimske MĆ poreklom iz periferne krvi, i pored velikog broja eksperimentalnih uzoraka, u našoj Laboratoriji uspešno su izolovane iz uzorka samo jednog donora (*Trivanović i sar., 2013*), što je u skladu sa literaturnim podacima u kojima se ističe da je zastupljenost MMĆ u perifernoj krvi izuzetno niska (*Hass i sar., 2011; Q. He i sar., 2007*), kao i da izolacija ovih ćelija nije standardizovana, te je zabeležena različita uspešnost izolacije u objavljenim istraživanjima (*Lin i sar., 2019; Wexler i sar., 2003; Zvaifler i sar., 2000*).

Izolovane ćelije su okarakterisane prema kriterijumima Društva za ćelijsku terapiju (*Dominici i sar., 2006*) s obzirom da su adherirale za plastičnu podlogu,

DISKUSIJA

ispoljile specifične površinske antigene glavnih mezenhimskih klastera uz istovremeno odsustvo površinskih markera hematopoetskih linija, kao i da su pokazale potencijal za diferencijaciju u tri ćelijske loze mezodermskog porekla. Ovi rezultati potvrdili su da su izolovane ćelije prečišćene do populacije ćelija nalik fibroblastima sa potencijalom za diferencijaciju u tkiva mezodermskog porekla.

Kada je reč o fenotipu, ćelije izolovane iz oba izvora morfološki su odgovarale osobinama MMĆ, s obzirom da su imale vretenasti oblik nalik fibroblastima i sposobnost adhezije za plastiku koja se zadržala kroz pasažiranje, što je uočeno i u ranijim studijama na ovim ćelijama (*Chong i sar., 2012; Ouryazdanpanah i sar., 2018; La Rocca i sar., 2009; Tondreau i sar., 2005; Trivanović i sar., 2013; H.-S. Wang i sar., 2004*). Imunofenotipska karakterizacija VS-MMĆ i PK-MMĆ je takođe u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima koji su pokazali da MMĆ iz periferne krvi i pučanika ispoljavaju u visokom procentu (preko 90%) markere karakteristične za MMĆ, uz minimalnu ekspresiju markera hematopoetskih ćelija (*Chong i sar., 2012; Musiał-Wysocka i sar., 2019; Ouryazdanpanah i sar., 2018; Trivanović i sar., 2013; H.-S. Wang i sar., 2004; Y.-N. Zhang i sar., 2009*). Multipotentni potencijal diferencijacije u ćelije osteogene, hondrogene i adipogene loze potvrđen je kod svih ispitivanih donora VS-MMĆ i PK-MMĆ, što je takođe u saglasnosti kako sa našim prethodnim (*Trivanović i sar., 2015*), tako i sa istraživanjima drugih autora (*Chong i sar., 2012; Ouryazdanpanah i sar., 2018; La Rocca i sar., 2009; Tondreau i sar., 2005; H.-S. Wang i sar., 2004; Y.-N. Zhang i sar., 2009*). Pojava lipidnih kapi kod oba tipa MMĆ, a aktivacije ALP kod VS-MMĆ, primećena je i pri kultivaciji ćelija u standardnom medijumu. Slična pojava spontane diferencijacije zabeležena je i ranije kod MMĆ (*Musina i sar., 2005*), mada tačan uzrok još uvek nije u potpunosti objašnjen. Dok *Pham* i saradnici ističu da se spontana diferencijacija uvek dešava u *in vitro* i *ex vivo* kulturama MMĆ (*Pham i Vu, 2016*), neka istraživanja isključuju konfluentnost MMĆ kao potencijalni uzrok (*Haack-Sørensen i sar., 2013*), a druga objašnjavaju da bi ta pojava mogla biti posledica epigenetičkih promena (*Z. Li i sar., 2011*). Stoga su dodatna istraživanja neophodna da bi se objasnila spontana diferencijacija kod ovih ćelija. Naša prethodna istraživanja pokazala su da MMĆ periferne krvi i pučanika karakteriše i visok kapacitet samoobnove s obzirom da se u kulturi održavaju čak i do 20 pasaža i da

DISKUSIJA

im je vreme dupliranja ćelijske populacije bilo 27 odnosno 35 sati (*Trivanović i sar., 2013*).

Dodatno je imunocitohemijskim obeležavanjem utvrđeno da VS-MMĆ i PK-MMĆ eksprimiraju markere pluripotentnosti NANOG, OCT4a, SOX2 i SSEA4, specifične za EMĆ što je u skladu sa prethodno objavljenim studijama (*Chong i sar., 2012; Gao i sar., 2013; Musiał-Wysocka i sar., 2019; Taghizadeh i sar., 2011; Tondreau i sar., 2005*). Transkripcioni faktori NANOG, OCT4a, SOX2 suštinski doprinose samoobnovi i pluripotentnom potencijalu EMĆ (*Boyer i sar., 2005*), a njihova ekspresija i regulacija „matičnosti“ zabeležena je u mnogim istraživanjima i kod MMĆ (*Riekstina i sar., 2009; C.-C. Tsai i Hung, 2012; T. Wang i sar., 2014*). Površinski marker SSEA-4 karakteriše nediferentovane EMĆ (*Adewumi i sar., 2007*), a koristi se i kao marker MMĆ (*Gang i sar., 2007*). Na ovaj način, dodatno je potvrđen mezenhimski fenotip ovih ćelija.

IL-17 stimuliše mobilnost i transendotelnu migraciju MMĆ iz periferne krvi posredstvom uPA

Literaturni podaci ukazuju da MMĆ u cirkulaciji uglavnom vode poreklo iz kostne srži odakle bivaju mobilisane usled oštećenja tkiva i hroničnih patoloških vaskularnih promena. Pod uticajem odgovarajućih signala iz specifične mikrosredine oštećenih ili upaljenih tkiva, MMĆ migriraju kroz endotel i bivaju regrutovane do ciljnog tkiva gde mogu da regulišu odgovor na inflamaciju i da se diferenciraju u tkivno-specifične ćelije (*Le Clainche i Carlier, 2008; Vallabhaneni i sar., 2011*). Pored njih, u oštećena tkiva bivaju regrutovane i ćelije adaptivnog i urođenog imunskog odgovora kako bi takođe učestvovala u odgovoru na inflamaciju i u regeneraciji tkiva. Produkcijom citokina i faktora rasta, imunske ćelije mogu da indukuju mobilizaciju, regrutovanje ćelija i stimulišu regenerativni kapacitet MMĆ (*Maxson i sar., 2012; Yi Liu i sar., 2012*). Skorija istraživanja, ističu značajnu ulogu Th17 ćelija u inflamaciji i zapaljenskim bolestima (*Maddur i sar., 2012*), a poznato je da se nivo njihovog produkta, citokina IL-17, povećava tokom inflamacije (*Tournadre i Miossec, 2012*). Jedan deo istraživanja u okviru ove disertacije obuhvatao je ispitivanja uloge IL-17 u migraciji i mobilizaciji PK-MMĆ.

DISKUSIJA

Receptor za IL-17 ubikvitarno je eksprimiran u tkivima, i njegova ekspresija zabeležena je i kod MMC (H. Huang i sar., 2009; Mojsilović i sar., 2011; Wilson A. Silva i sar., 2003). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju pokazali su da i PK-MMC eksprimiraju receptor za IL-17, ukazujući da i ove ćelije mogu biti regulisane ovim citokinom.

Stimulatorni uticaj IL-17 na migraciju PK-MMC *in vitro* pokazan je u *scratch* eseju i testu migracije baziranom na *Boyden* komori. Inhibicija ovog efekta u prisustvu antitela za IL-17, ukazala je na direktnu ulogu ovog citokina u mobilnosti PK-MMC. Ovi rezultati u saglasnosti su sa publikovanim zapažanjima da IL-17 stimuliše migraciju humanih MMC iz kostne srži (H. Huang i sar., 2009). U širem istraživanju naše grupe uočeno je da IL-17 inhibira migraciju MMC poreklom iz periodoncijuma zuba na dozno-zavisan način, i taj efekat pripisan je inhibiciji proliferacije stimulisane interleukinom- 17 (Okić-Dorđević i sar., 2016). Međutim, kako IL-17 nije uticao na proliferaciju PK-MMC, povećanje migracije kod ovih ćelija direktna je posledica delovanja IL-17 na ovaj proces. Pored toga, pokazano je da IL-17 stimuliše i mobilizaciju PK-MMC iz kolagenskih kapi, što sugerise da ovaj citokin povećava kapacitet ćelija da se kreću kroz mrežu VCM. S obzirom da su dobijeni rezultati implicirali mogućnost degradacije VCM proteolitičkim mehanizmom, ispitivani su i efekti IL-17 na ekspresiju proteolitičkih enzima. Pokazano je da je IL-17 indukovao ekspresiju urokinaze kod PK-MMC i to uglavnom putem aktivacije ERK1/2 MAPK. Urokinaza ima značajnu ulogu u regulaciji patofizioloških procesa prisutnih tokom remodelovanja tkiva nakon oštećenja (Binder i sar., 2007). Vezivanjem za svoj ćelijski receptor (uPA-R), ovaj enzim učestvuje u konverziji plazminogena u plazmin i stoga obezbeđuje vremenski i prostorno fino regulisanu proteolizu, olakšavajući ćelijama da migriraju kroz barijeru VCM (Blasi i sar., 1990). Pored toga, poznato je da u kompleksu sa receptorom, pored migracije, reguliše i adheziju, proliferaciju i diferencijaciju različitih tipova ćelija tokom regeneracije tkiva nezavisno od proteolitičkih procesa, a kroz aktivaciju unutarćelijske signalne transdukcije (Blasi i Carmeliet, 2002). U ranijim istraživanjima naše laboratorije pokazano je da IL-17 inhibira ekspresiju uPA i migraciju ćelijske mioblastne linije C2C12 posredstvom p38 kinaze (Kocić i sar., 2013).

DISKUSIJA

U ovom istraživanju je takođe pokazano da povećanje ekspresije uPA posreduje povećanoj migraciji indukovanoj interleukinom-17, s obzirom da je u prisustvu antitela za urokinazu, kao i njenog specifičnog inhibitora, i blokatora mesta vezivanja na plazminu, migracija indukovana ovim citokinom bila smanjena. Noviji rezultati ističu da vezivanjem za svoj receptor, uPA pojačava migraciju i mobilizaciju MMĆ iz kostne srži, doprinoseći migraciji u oštećeno tkivo i posledično regeneraciji tkiva (*Vallabhaneni i sar., 2011*). Takođe, pokazano je da uPA ima ulogu u kretanju MMĆ ka solidnim tumorima, kao i da usled ekspresije uPA kod MMĆ dolazi do povećanja migracije ovih ćelija ka tumorima (*Abedin i sar., 2004; Chronopoulos i sar., 2011; Gutova i sar., 2008; Neuss i sar., 2009; Pulukuri i sar., 2010*). Dobijeni rezultati sugerišu da IL-17 koji se produkuje u oštećenom tkivu, može da poveća mobilizaciju i migraciju MMĆ indukujući ekspresiju uPA, posredovanu aktivacijom ERK1/2 MAPK.

Pored uPA, MMĆ eksprimiraju i MMP koje su takođe uključene u njihovu migraciju, poput MMP-2 i MT1-MMP/MMP14 (*Ries i sar., 2007; Son i sar., 2006*), mada ima rezultata da MMP9 ne učestvuje u migraciji MMĆ (*A. De Becker i sar., 2007*). Naši rezultati pokazali su da MMP imaju ulogu u ćelijskoj migraciji na bazalnom nivou, ali da IL-17 ne modifikuje ekspresiju MMP-2 i MMP-14 kod PK-MMĆ. Ovo implicira da je ekspresija uPA indukovana interleukinom-17 kritična za migraciju PK-MMĆ indukovanu ovim citokinom. Dodatno, iako je pokazano da kod nekoliko ćelijskih tipova IL-17 indukuje ekspresiju MMP-9 (*Tournadre i Miossec, 2012*), kod PK-MMĆ tretiranih interleukinom-17 nije detektovana ekspresija na transkripcionom nivou, kao ni aktivnost MMP-9 proteina.

Reorganizacija aktinskih filamenata i tubulina, uglavnom preko fine regulacije i koordinisane lokalizacije MTOC (*Ridley i sar., 2003; Schmidt i sar., 2006; Z. Sun i sar., 2002*), je jedan od glavnih mehanizama uključenim u ćelijsku migraciju. Tokom migracije, ćelije postaju polarizovane i moguće je razlikovati dva pola, a MTOC koji sadrži γ -tubulin orijentisan je ka „putanji kretanja“ ćelije. Dobijeni rezultati u okviru ove disertacije pokazali su da je u prisustvu IL-17 došlo do reorganizacije aktina, sa akumulacijom ćelijskih lamelopodija, i povećane perinuklearne lokacije MTOC ka ivici zagrebane površine, uz istovremene promene u tubulinskom citoskelu. Utvrđeno je da su ovi efekti posredovani ERK1/2 MAPK, s obzirom da ćelije nisu reagovalе kroz promene u citoskelu na delovanje IL-17 u prisustvu specifičnog inhibitora za ERK1/2.

DISKUSIJA

Takođe, inhibicija aktivnosti urokinaze poništava je promene u reorganizaciji aktina koju je indukovao IL-17, iako nije značajno uticala na polarizaciju ćelija. Jedno od mogućih objašnjenja je da s obzirom da korišćeni inhibitor (BC11) utiče na aktivnost uPA ali ne ometa njenu interakciju sa receptorom, inhibicija aktivnosti uPA mogla je da izazove unutarćelijsku signalizaciju neophodnu za ćelijsku polarizaciju. Dodatno, rezultati su ukazali da IL-17 indukuje akumulaciju uPA u protruzijama PK-MMC, što može da doprinese povećanju migracije.

Osnovni mehanizam kojim IL-17 indukuje reorganizaciju aktina i MTOC u cilju povećanja migracije još uvek nije objašnjen. Jedna od sugerisanih mogućnosti je da IL-17 može da reguliše Rho GTP-azu kod MMC, familiju proteina koja je kritičan regulator ćelijske migracije i polarizacije, s obzirom da su RhoA i Rac1, redom, neophodni za fokalnu adheziju i ćelijske protruzije, a Cdc42 za filopodije i polarizaciju ćelije (Hall, 2005; Ridley i sar., 2003). Ovu pretpostavku bi mogle podržati prethodne studije koje ukazuju na aktivaciju Rac1 interleukinom-17 sa ciljem indukcije ćelijske migracije, i ekspresije Rho i aktivnosti RhoA kinaze kod endotelskih ćelija (Moran i sar., 2011; Nguyen i sar., 2013). Neophodno je detaljno ispitati koliko je Rho protein neophodan za migraciju i polarizaciju PK-MMC koju indukuje IL-17.

Poznato je da se, kako spoljno aplikovane, tako i endogene cirkulišuće MMC, preferencijalno usaduju na mesta inflamacije *in vivo* (Teo i sar., 2012). Kako bi izašle iz cirkulacije, MMC migriraju kroz endotelsku barijeru u odgovoru na signale iz upaljenog tkiva, koje iniciraju faktori rasta, citokini i hemokini, regulišući funkcije MMC na različite načine (English, 2013; Vallabhaneni i sar., 2011). Međutim, proces i mehanizmi kojim PK-MMC migriraju kroz endotel ka mestima inflamacije još uvek nisu u potpunosti razjašnjeni. Jedan od prvih koraka u odgovoru cirkulišućih MMC na signale iz oštećenih tkiva jeste adhezija za endotel i dijapedeza kroz endotelski monosloj (DiMarino i sar., 2013). S obzirom da se nakon interakcije sa endotelskim ćelijama MMC integrišu u endotelsku barijeru i potom prolaze kroz istu (Schmidt i sar., 2006), kako bi migrirale ka oštećenim ili tkivima pod upalom, MMC moraju da interaguju sa podendotelskim VCM da prođu kroz bazalnu membranu (Steingen i sar., 2008). Iako inflamatorni citokini mogu da stimulišu transendotelsku migraciju MMC (Teo i sar., 2012), uloga IL-17 u ovom procesu ostaje nepoznata. U ovom istraživanju uočeno je da je pretretman interleukinom-17, kako MMC tako i endotelskih ćelija,

DISKUSIJA

povećao međucelijsku adheziju, što ukazuje na to da su oba tipa ćelija ciljne ćelije delovanja IL-17. IL-17, kao hemoatraktantni faktor, povećao je transendotelnu migraciju MMĆ na način zavisen od uPA. Kako je uPA uključena u paracelularnu transmigraciju neutrofila *in vivo* (Reichel i sar., 2011), moguće je da ima slične funkcije i kod MMĆ. Povećavajući uPA, IL-17 može da poveća razgradnju endoteljskih ćelijskih veza, kao i proteolitičkom degradacijom perivenularne bazalne membrane da poveća endotelnu permeabilnost.

Pokazano je da MMĆ migriraju kroz endotelnu barijeru i transćelijskim mehanizmom povezanim sa VCAM-1 (Teo i sar., 2012), što sugerise dinamične međucelijske interakcije koje mogu aktivno da učestvuju u ubrzanju transendotelne migracije ćelija ka oštećenim tkivima. U budućim studijama, bilo bi značajno odrediti da li IL-17 može da regulise transćelijsku migraciju MMĆ u endotelu putem regulacije ekspresije uPA. Pokazano je takođe da IL-17 zajedno sa TNF- α utiče na aktivaciju endoteljskih ćelija, i povećava transmigraciju neutrofila i ekspresiju adhezivnih molekula i hemokina kod hUVEC ćelija (od engl. *human umbilical vein endothelial cell*), što sugerise da IL-17 indukuje inflamaciju endotela olakšavajući ćelijsku transendotelnu migraciju (Griffin i sar., 2012; Xing i sar., 2013).

Kako bi nakon što prođu endotelnu barijeru došle do tkiva pod upalom, MMĆ interaguju sa podendoteljskim VCM i indukuju degradaciju proteina (Schmidt i sar., 2006). Poznato je da endotelne ćelije proizvode fibronektin (Mettouchi, 2012), i rezultati dobijeni u ovom istraživanju pokazali su da je tretman PK-MMĆ interleukinom-17 povećao ćelijsku adheziju za prečišćeni fibronektin i to na način zavisen od uPA. Interakcija uPA-uPAR sa $\alpha 5$ - $\beta 1$ integrinom, glavnim receptorom za fibronektin, moduliše ćelijsku adheziju za VCM zavisnu od integrina, i ove interakcije aktivno učestvuju u proteolitičkoj regulaciji invazivne ćelijske migracije (Bass i Ellis, 2009; Yue i sar., 2012). Ipak, nije isključeno da su aktivirani i drugi mehanizmi poput povećanja ekspresije integrinskog receptora usled dejstva IL-17. Rezultati dobijeni u eksperimentima inhibicije antitelom za uPA, sugerisu da aktivnost uPA i njena interakcija sa ćelijskom površinom, posreduju sposobnosti IL-17 da poveća adheziju PK-MMĆ za fibronektin.

DISKUSIJA

Prekomerna ekspresija IL-17 uključena je u inflamatornu patologiju autoimunskih bolesti, i smanjivanje nivoa IL-17 jedna je od terapijskih strategija, testirana u kliničkim studijama za nekoliko humanih autoimunskih bolesti (*Miossec, 2017*). Dobijeni rezultati sugerišu da IL-17 može da bude regrutujući signal za PK-MMĆ da migriraju i usade se u tkivo pod upalom. Dodatno, veruje se da MMĆ nisu spontano imunosupresivne, već da zahtevaju „licenciranje“ ili aktivaciju kako bi ostvarile imunosupresivne efekte (*English, 2013*), te stoga možemo pretpostaviti da IL-17 može takođe da moduliše imunomodulatorne kapacitete MMĆ. Ipak, rezultati pokazuju da same MMĆ redukuju kapacitet Th1 i Th17 ćelija da produkuju IFN- γ i IL-17, redom (*L. Wang i sar., 2012*). Stoga, visoki nivoi IL-17 u oštećenim tkivima mogu da služe kao signal za regrutovanje MMĆ, koje onda regulišu proizvodnju IL-17, što deluje kao negativna povratna sprega za kontrolu prekomerne inflamacije. Sličan mehanizam kojim usađene MMĆ mogu za uzvrat da regulišu ekspresiju IL-17 u mikrosredini mišića, uočen je kod inflamatornih miopatija (*Miossec i Kolls, 2012*), obnavljajući nivo mioblasta koji ekspimiraju uPA i dozvoljavajući regeneraciju mišića nakon oštećenja. Ipak, dalje studije su neophodne da bi se odredilo da li PK-MMĆ mogu da regulišu ekspresiju i funkciju IL-17 u inflamatornim miopatijama.

Hipoksični uslovi od 3% O₂, utiču na diferencijacioni potencijal VS-MMĆ, poboljšavaju njihovu „matičnost“ i pojačavaju migratorni potencijal

Uslovi za izolaciju i kultivaciju MMĆ *in vitro* su od posebne važnosti za dalju primenu MMĆ, vezano za ciljeve istraživanja ili očekivani ishod terapije. S jedne strane, uslovi kultivacije se mogu prilagoditi na taj način da odgovaraju *in vivo* mikrosredini, čime se obezbeđuju postavke za istraživanja koje su fiziološki relevantnije. S druge strane, pri primeni u terapiji, MMĆ neizbežno ulaze u sredinu sa niskom koncentracijom O₂ kojoj treba da se prilagode i na koju treba da reaguju (*Ferro i sar., 2019*). Stoga, menjanje *in vitro* uslova kultivacije otvara mogućnost predviđanja ponašanja ćelija *in vivo* ili pripreme MMĆ za posebne potrebe (*Ferro i sar., 2019; Foyt i sar., 2019*). U perinatalnim tkivima, kakva je pupčana vrpca, niske koncentracije O₂ predstavljaju značajan regulatorni faktor mikrosredine i u humanom pupčaniku izmerena je koncentracija O₂ od 2-3% (*Carreau i sar., 2011*). Stoga je drugi deo ovog istraživanja obuhvatio ispitivanje da li VS-MMĆ pokazuju različite funkcionalne osobine pri kultivaciji na 3% O₂ umesto standardnih, laboratorijskih 21% O₂, sa ciljem

DISKUSIJA

podražavanja prirodne mikrosredine ovih ćelija i analize osobina koje su važne za njihovu potencijalnu primenu.

Poznato je da hipoksični nivoi O_2 regulišu mnoge funkcije MMC^ć putem transkripcionog faktora HIF-1 α (*Buravkova i sar., 2014*), i očekivano utvrđeno je da je ekspresija iRNK za HIF-1 α , kao i HIF-1 α proteina značajno povećana kod VS-MMC^ć na 3% O_2 u poređenju sa 21% O_2 .

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da su pri kultivaciji na 3% O_2 , VS-MMC^ć zadržale svoju morfologiju, što je u saglasnosti sa prethodno publikovanim rezultatima sa VS-MMC^ć kultivisanim na 5% O_2 (*Drela i sar., 2014*). Niska koncentracija O_2 nije modifikovala ni imunofenotip VS-MMC^ć, s obzirom da nisu uočene razlike u ekspresiji površinskih molekula tokom kultivacije ćelija na 3% i 21% O_2 . Ovaj rezultat je takođe u skladu sa prethodnim istraživanjima koja su pokazala da ne postoji značajana razlika u ekspresiji CD markera kod VS-MMC^ć kultivisanih na 2% O_2 (*Drela i sar., 2014; Nekanti, Dastidar, i sar., 2010*) i 5% O_2 (*Lopez, 2011*), u poređenju sa ćelijama kultivisanim na 21% O_2 . Međutim, *Majumdar* i saradnici su pokazali značajno smanjenu ekspresiju CD73, CD90 i CD105 kod VS-MMC^ć kultivisanih na 2% O_2 (*Majumdar i sar., 2013*). Ova razlika bi mogla biti posledica različitih pasaža ćelija na kojima je analiziran imunofenotip ili različitosti ćelija izolovanih od različitih donora. Pomoću RT-PCR, kao i imunofluorescentnim obeležavanjem potvrđeno je da se ni ekspresija markera MMC^ć vimentina i α -SMA ne menja pri kultivaciji na 3% O_2 , slično ranije objavljenim podacima za 5% O_2 (*Drela i sar., 2014*).

Veliki je broj istraživanja efekata niskih koncentracija O_2 na diferencijaciju MMC^ć poreklom iz drugih tkiva do sada publikovao, ali su mnoga dala kontradiktorne rezultate. Naši rezultati pokazali su da VS-MMC^ć zadržavaju diferencijacioni potencijal za ćelije mezodermskog porekla, na obe koncentracije O_2 , što je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima u kojima su ove ćelije kultivisane na 2% O_2 i 5% O_2 (*Lopez, 2011; Nekanti, Dastidar, i sar., 2010*). Međutim, kvantitativna analiza histohemijskog bojenja diferencijacije, zajedno sa ekspresijom iRNK za markere diferencijacije, pokazala je da 3% O_2 smanjuje osteogenu diferencijaciju dok stimuliše adipogenu i hondrogenu diferencijaciju VS-MMC^ć. Prethodno je već pokazano da 5% O_2 povećava hondrogenezu kod VS-MMC^ć (*Reppel i sar., 2014*). Prema saznanjima iz literature

DISKUSIJA

dostupne do kraja izrade ove disertacije, ovo je jedino istraživanje u kojem je izvedena sveobuhvatna analiza efekata različitih koncentracija O₂ na diferencijacioni potencijal VS-MMĆ. Procena diferencijacionog potencijala u uslovima niskih koncentracija O₂ može predvideti ponašanje ćelija i stoga odrediti da li takve ćelije mogu da se koriste za specifične tretmane kao što su sugerisali Foyt i saradnici (Foyt i sar., 2019). Tako, npr. VS-MMĆ okarakterisane našim protokolom bi mogle biti pogodni kandidati za regeneraciju hrskavice. Zabeleženo je da hipoksija indukuje produkciju TGF-β kod MMĆ (Tang i sar., 2009; Zhou i sar., 2005), što može dovesti do autokrine regulacije hondrogene i osteogene diferencijacije, te bi trebalo dalje ispitati autokrine mehanizme MMĆ koje su aktivirane niskim koncentracijama O₂. Takva saznanja su od velikog značaja ne samo za utvrđivanje uticaja sekretoma ovih ćelija na diferencijaciju, već i za razjašnjavanje važnih terapijskih osobina VS-MMĆ, kao što je već pokazano u raznim istraživanjima (Mancuso i sar., 2019; Miranda i sar., 2019; D. Z. Sun i sar., 2019).

U ovom istraživanju je dalje potvrđeno da niska koncentracija O₂ stimuliše proliferaciju VS-MMĆ i skraćuje vreme dupliranja ćelijske populacije što potvrđuje prethodno publikovane rezultate sa VS-MMĆ kultivisanim na 2 %, 2,5% i 5% O₂ (Drela i sar., 2014; Lavrentieva i sar., 2010; Nekanti, Dastidar, i sar., 2010; Reppel i sar., 2014; Widowati i sar., 2014). Takođe, veliki broj publikacija pokazao je da niske koncentracije O₂ (1-5%) generalno stimulišu proliferaciju MMĆ izolovanih iz različitih izvora (Buravkova i sar., 2014). Dodatno, CFU-F esejem utvrđeno je da VS-MMĆ kultivisane na 3% O₂ formiraju veći broj kolonija, a ovi rezultati u saglasnosti su sa zapažanjima povećanog klonogenog potencijala VS-MMĆ kultivisanim na 5% O₂ (Lopez, 2011; Reppel i sar., 2014)

Transkripcioni faktori OCT4, NANOG i SOX2, markeri EMĆ (Boyer i sar., 2005), igraju važnu ulogu u regulaciji matičnosti adultnih MMĆ, iako su do sada dobijeni rezultati kontradiktorni (C.-C. Tsai i Hung, 2012). Njihova ekspresija, a posledično i pluripotentnost EMĆ, regulisana je niskim koncentracijama O₂ (Forristal i sar., 2010; Petruzzelli i sar., 2014). Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije, pokazali su da je kultivisanje ćelija na 3% O₂ tokom šest dana značajno povećalo ekspresiju OCT4, NANOG i SOX2. Ovo zapažanje je u saglasnosti sa studijom u kojoj je pokazano značajno povećanje u ekspresiji ovih markera kod VS-MMĆ kultivisanih na 5% O₂ tokom dve i četiri nedelje (Drela i sar., 2014). S druge strane, Reppel i sar. nisu

DISKUSIJA

detektovali *NANOG* i *SOX2* kod VS-MMĆ, dok je ekspresija *OCT4* bila slična kod ćelija kultivisanih u uslovima od 5% O₂ i 21% O₂ (Reppel i sar., 2014). Na istoj koncentraciji O₂, Musial-Wysocka i sar., zabeležili su povećanje jedino ekspresije *NANOG* u odnosu na 21% O₂ (Musial-Wysocka i sar., 2019). Dodatno, niske koncentracije O₂ stimulisale su ekspresiju gena matičnosti kada su VS-MMĆ kultivisane na nosačima od hitozana (Taguchi i sar., 2018). Naši rezultati bi mogli biti dodatno podržani ranijom studijom u kojoj su MMĆ krvi pupčanika kultivisane na 3% O₂ imale višu ekspresiju *OCT4*, *NANOG* i *SOX2* gena (Hung i sar., 2012). Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji sugerišu da 3% O₂ pojačava multipotentnost VS-MMĆ putem stimulacije njihove samoobnove i povećanja ekspresije markera pluripotentnosti. Zaista, druga istraživanja pokazala su da hipoksija može da indukuje ekspresiju markera pluripotentnosti u raznim ćelijskim linijama kancera i MMĆ (Mathieu i sar., 2011; Mimeault i Batra, 2013; Park i sar., 2013; Yamamoto i sar., 2013), a opisana je i uloga HIF molekula u ovim procesima (Forristal i sar., 2010; Petruzzelli i sar., 2014). S obzirom da mehanizmi kojima hipoksija reguliše „matičnost“ ovih ćelija nisu još uvek ispitani, njihovo objašnjenje moglo bi biti jedan od ciljeva naših narednih istraživanja koji se odnose na VS-MMĆ.

Prema našim saznanjima, u istraživanjima u okviru ove teze po prvi put je ispitivan efekat niske koncentracije O₂ na profil ćelijskog ciklusa VS-MMĆ. Dobijeni rezultati pokazali su da kultivisanje VS-MMĆ na 3% O₂ ne menja značajno njihov ćelijski ciklus, osim što se broj ćelija u G₀/G₁ fazi nakon 24h prolazno povećao. Kada je reč o preživljavanju ćelija, uočeno je da je mala proporcija (manje od 10%) apoptotičnih ćelija bila prisutna na obe koncentracije O₂. Ipak, značajno manji procenat apoptotičnih i nekrotičnih ćelija uočen je u ćelijskoj populaciji kultivisanoj na 3% O₂ nakon 72h, što ukazuje da 3% O₂ štiti VS-MMĆ od apoptoze nakon 72h kultivacije smanjujući je za 68%. Prethodno su Majumdar i sar. pokazali da kultivacija ćelija na 2% O₂ ne utiče na njihovo preživljavanje, s obzirom da nije uočena značajna razlika u broju živih ćelija u ovim grupama (Majumdar i sar., 2013). Poznato je da hipoksija indukuje apoptozu, ali može imati i anti-apoptotske efekte, te sudbina ćelija tokom hipoksije zavisi od balansa između odgovarajućih faktora koji regulišu ćelijske funkcije (Greijer i Van Der Wall, 2004). Kod MMĆ je pretežno zabeležen anti-apoptotski efekat u hipoksičnim uslovima, dok je hipoksija indukovala apoptozu jedino u istraživanjima

DISKUSIJA

gde su ćelije kultivisane u uslovima bez seruma što ukazuje da ipak faktor izgladnjivanja ima presudnu ulogu u ovoj kombinaciji (*Buravkova i sar., 2014*). Rezultati dobijeni u okviru ove teze sugerišu da 3% O₂ ne moduliše ćelijski ciklus VS-MMĆ već moduliše apoptozu. S obzirom da se HIF-1 α ističe kao glavni regulator ovih procesa, bilo bi značajno u narednim istraživanjima ispitati mehanizme njegovog delovanja u slučaju VS-MMĆ.

Jedna od ključnih osobina MMĆ koja ih čini važnim za terapijsku primenu jeste njihova sposobnost da migriraju iz svoje niše ka oštećenim tkivima gde učestvuju u obnavljanju tkiva (*Sohni i Verfaillie, 2013*). Na mobilizaciju i migraciju MMĆ, pored drugih faktora, utiče i lokalna koncentracija O₂, pogotovo u patološkim stanjima kada je poremećen dotok krvi (*Lin i sar., 2017*). U našem istraživanju je uočeno da VS-MMĆ koje su kultivisane na 3% O₂ imaju veću sposobnost migracije u poređenju sa ćelijama koje su kultivisane na 21% O₂. Ranije je pokazano da je kultivacija na 2% O₂ vodila do povećane, mada ne statistički značajno, mobilnosti VS-MMĆ (*Himal i sar., 2017*). Pored toga, istraživanje efekata 3% O₂ na KS-MMĆ ukazalo je na stimulaciju njihove mobilnosti (*Busletta i sar., 2011*). U našim istraživanjima dodatno je pokazano da je prekultivacija VS-MMĆ na 3% O₂ dovela do značajnog povećanja migratornog kapaciteta u *scratch* testu u poređenju sa ćelijama kultivisanim na 21% O₂. Slično povećanje ćelijske migracije je uočeno kod humanih KS-MMĆ koje su prekultivisane na 3% O₂ (*Rosová i sar., 2008*). Iako ovi rezultati impliciraju da bi prekultivacija VS-MMĆ na 3% O₂ mogla biti jedan od pristupa za njihovu potencijalnu upotrebu u ćelijskoj terapiji, potrebno je sprovesti još opsežnijih istraživanja pre konačnog zaključka.

Kako MMĆ migriraju do mesta oštećenja kroz VCM (*F. M. Chen i sar., 2011*) i potom pomažu u reparaciji tkiva, u ovim istraživanjima primenjen je i test mobilizacije ćelija iz kolagenskih kapi. Dobijeni rezultati ukazali su da je nivo mobilizacije VS-MMĆ bio viši na 3% u odnosu na 21% O₂, iako statistička značajnost nije uočena. Kada su ćelije prekultivisane na različitim koncentracijama O₂, VS-MMĆ prekultivisane na 3% O₂ su pokazale malo veću sposobnost da migriraju iz kolagenskih kapi. U okviru ove disertacije po prvi put ispitivan je uticaj hipoksije na mobilizaciju VS-MMĆ, s obzirom da nije zabeležen u do sada objavljenim istraživanjima. Uzevši u obzir da je najrasprostranjenija komponenta VCM pupčanika kolagen (*Can i Karahuseyinoglu,*

DISKUSIJA

2007), te da je nedavna studija ukazala na to da VS-MMĆ migriraju iz pupčanika kroz endotelski sloj materice (*Ebrahim i Leach, 2015, 2016*), naši rezultati bi možda mogli dodatno da objasne fiziološku ulogu ovih ćelija o kojoj se malo zna. Naime, u materici većine sisara nivo O_2 je nizak (*Kasterstein i sar., 2013*), a hronično niske koncentracije O_2 mogu da stimulišu mobilnost MMĆ različitim mehanizmima, utičući na komponente VĆM, hemotaktične faktore, hemokine, integrine i druge lokalne faktore (*Das i sar., 2010*), te se može se pretpostaviti da bi okolna tkiva mogla da mobilišu VS-MMĆ za lokalno obnavljanje. Ipak, tek usavršavanjem metoda za *in vivo* praćenje MMĆ, ovakva istraživanja će biti moguća.

Nekoliko signalnih puteva uključeno je u stimulaciju/modulaciju migracije MMĆ, među kojima su MAPK i *Wnt/β-catenin* signalni put (*Li Li i Jiang, 2011; Neth i sar., 2006*). Iako ERK1/2 igra značajnu ulogu u migraciji MMĆ, inhibicija tog puta nije imala efekat na migraciju ovih ćelija u nekim studijama. Kako bi se analizirali signalni putevi uključeni u migratorne procese VS-MMĆ, korišćeni su specifični inhibitori MAPK signalnog puta, PD-98059 i *Wnt/β-catenin* signalnog puta, PNU-74654. Utvrđeno je da se sposobnost VS-MMĆ da migriraju u uslovima obe koncentracije O_2 nije promenila u prisustvu PD-98059, dok je isti inhibitor značajno smanjio mobilizaciju ćelija iz kolagenskih kapi na obe koncentracije O_2 . Ovi rezultati sugerišu da kinaza ERK1/2 nije uključena u migraciju VS-MMĆ, dok je njeno učešće u mobilizaciji VS-MMĆ iz kolagenskih kapi nezavisno od koncentracije O_2 . S druge strane, s obzirom da je statistički značajno smanjenje oba migratorna procesa uočeno jedino u prisustvu PNU-74654 pri koncentraciji O_2 od 21%, pretpostavlja se da je *Wnt/β-catenin* signalni put aktiviran kod VS-MMĆ tokom migracije i mobilizacije u standardnim uslovima. Do sada je jedino kod KS-MMĆ uočeno da migracija indukovana sa 3% O_2 uključuje, između ostalog i aktivaciju ERK1/2 (*Busletta i sar., 2011*), te stoga rezultati u okviru ove disertacije obezbeđuju važan uvid u učešće signalnih puteva u migraciji i mobilizaciji VS-MMĆ na standardnim, laboratorijskim koncentracijama O_2 , kao i na 3% O_2 .

Već je naglašeno u istraživanjima u okviru ove teze da je ćelijska migracija kompleksan proces koji uključuje remodelovanje VĆM, povezano sa aktivacijom proteolitičkih enzima, uPA i MMP (*Jean-Dominique Vassalli i sar., 1991; Wolf i Friedl, 2011*). Rezultati dobijeni u okviru ove disertacije pokazali su da 3% O_2 pojačava

DISKUSIJA

aktivnost uPA i MMP-2 tokom migracije VS-MMĆ. Međutim, u prisustvu inhibitora PD-98059 i PNU-74654 aktivnost uPA je bila značajno smanjena u uslovima obe koncentracije O₂. Ova zapažanja korelišu sa gore-pomenutim nalazima s obzirom da PD-98059 i PNU-74654 smanjuju mobilnost VS-MMĆ za koju je remodelovanje VĆM neophodno. Može se pretpostaviti da su ERK1/2 i β -catenin uključeni u mobilnost VS-MMĆ i da svoju ulogu ostvaruju preko aktivacije uPA, ali je neophodno dodatno istražiti ove procese kako bi se razjasnila ova hipoteza.

U ovom istraživanju uspešno su neinvazivnim metodama izolovane i umnožene MMĆ humanog pupčanika, i potvrđene su specifične karakteristike korišćenih MMĆ u skladu sa preporukom Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju. Analizirani su efekti specifične mikrosredine na njihova funkcionalna svojstva, i to proinflatornog citokina IL-17 na PK-MMĆ i niskih koncentracija O₂ na VS-MMĆ i utvrđeni molekularni mehanizmi preko kojih deluju. Dobijeni rezultati pokazali su da IL-17 povećava migraciju PK-MMĆ, kao i njihovu transmigraciju kroz endotelsku barijeru i to posredstvom indukcije ekspresije uPA, preko aktivacije ERK1/2 MAPK. Ova saznanja ukazuju da je IL-17 jedan od signala uključenih u regrutovanje MMĆ do oštećenih tkiva, kako bi se povećala regulacija inflamacije i regeneracije tkiva. Iako ovi rezultati upućuju na potencijalnu primenu PK-MMĆ u regenerativnoj medicini, dodatna opsežna istraživanja su neohodna kako bi se jasnije razumelo kako specifična mikrosredina u kojoj MMĆ obitavaju ili deluju utiče na njihova svojstva. Rezultati su takođe pokazali da kultivacija VS-MMĆ u hipoksičnim uslovima na 3% O₂, ne utiče na njihov imunofenotip, ali poboljšava njihove osobine u pogledu visokog klonogenog potencijala i potencijala ekspanzije, kao i povećanja ekspresije markera pluripotentnosti i pojačanog migratornog potencijala. Niska koncentracija O₂ izmenila je deferencijacioni potencijal i apoptozu dok nije imala efekta na ćelijski ciklus. Utvrđeno je, po prvi put, koji su signalni putevi uključeni u migratorne procese ovih ćelija. Ova zapažanja pružaju bolji uvid u osobine VS-MMĆ i ukazuju na to da bi kultivacija VS-MMĆ na 3% O₂ mogla povećati njihov terapijski potencijal. Ipak, veoma je važno istaći da biologija MMĆ još uvek nije u potpunosti poznata, to su heterogene grupe ćelija koje imaju malu proporciju multipotentnih MMĆ (Phinney, 2012), čak i unutar istog tkiva zdravih osoba; identitet izolovanih MMĆ se ne može uzeti sa

DISKUSIJA

sigurnošću: metodologija i uslovi kultivacije utiču na njihove osobine otud i nužnost za daljim istraživanjem u okviru ove oblasti.

Činjenica da je do sada registrovan veliki broj kliničkih studija sa MMC izolovanim iz različitih tkiva, čiji se efekti ispituju kod pacijenata sa brojnim oboljenjima ukazuje ne samo na njihov terapijski potencijal već i na mogućnost bezbedne primene ovih ćelija. Ipak, najveći broj studija je u I i II fazi kliničkih testiranja, tako da pre odobrene upotrebe MMC u ćelijskoj terapiji i regenerativnoj medicini treba prevazići mnogobrojne prepreke. Najznačajnije među njima su pitanje bezbednosti primene MMC, kvaliteta i broja izolovanih MMC adekvatnog za terapiju, kao i efikasnost transplantacije i delovanja primenjenih ćelija bez štetnih posledica po pacijente. Stoga se uz saznanja o biologiji i terapijskom potencijalu MMC i njihovog odnosa sa mikrosredinom u kojoj se nalaze, razvijaju i novi pristupi terapiji zasnovanoj na MMC sa ciljem da se ćelije inkorporiraju, integrišu i pravilno funkcionišu na željenom mestu u organizmu. Ti sistemi uključuju korišćenje MMC u kombinaciji sa prirodnim ili biosintetičkim nosačima različitih osobina koji podražavaju VCM specifične mikrosredine (*Hiew i sar., 2018; Lutolf i sar., 2009; Pennesi i sar., 2011*); korišćenje modifikovanih MMC na genskom nivou, „pre-kondicioniranje“ MMC sa odgovarajućim stimulusima (*Ren i sar., 2012*), korišćenje kombinovane ćelijske terapije i/ili standardizovanje protokola za dobijanje prečišćenih i dobro definisanih populacija MMC (*Nicodemou i Danisovic, 2017*) ili MMC sa željenim imunološkim karakteristikama (*Sivanathan i sar., 2015*). Pored toga, razumevanje odnosa i interakcija MMC i lokalne mikrosredine omogućiće uvid u to na koji način su određene MMC primenljive u lečenju konkretne bolesti. Na primer, vrlo su aktuelna istraživanja za ciljano lečenje tumora, koja se ispituju na životinjskim modelima pomoću MMC kao ćelijskih sistema za isporuku antikancerskih agenasa (*Amara i sar., 2014; Ćurinkova i sar., 2014*). Iako je ova oblast još uvek na početku razvoja, na osnovu svega navedenog neminovno je su adultne MMC budućnost ćelijske terapije i regenerativne medicine, ali tek nakon potpunog razumevanja mehanizama njihovog delovanja i načina na koje su oni u specifičnim sredinama regulisani i modulisani.

6. ZAKLJUČCI



U skladu sa postavljenim ciljevima, iz rezultata dobijenih u okviru ove disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. PK-MMĆ i VS-MMĆ je moguće izolovati metodom centrifugiranja u gradijentu gustine odnosno metodom eksplanta i održavati u kulturi;
2. Izolovane MMĆ su okarakterisane na osnovu sposobnosti adhezije za plastiku, ekspresije specifičnih površinskih mezenhimskih markera i multipotentnog potencijala diferencijacije u osteogenu, hondroenu i adipogenu lozu. Kod izolovanih MMĆ potvrđena je i ekspresija embrionalnih markera/markera pluripotentnosti, NANOG, OCT4, SOX-2 i SSEA4;
3. Ispitivanja efekata proinformatornog citokina IL-17 na regulaciju migratornih svojstva PK-MMĆ pokazala su da IL-17 pojačava migraciju i mobilizaciju PK-MMĆ posredstvom uPA-e na način zavisen od aktivacije ERK1/2 MAPK;
4. Stimulatorni efekti koje IL-17 ostvaruje na migraciju PK-MMĆ praćeni su promenama u citosketu ovih ćelija, koje se ogledaju u orijentisanju F-aktina i γ -tubulina ka zagrebanj površini i dovode do polarizacije ćelija, ali i lokalizacijom uPA u ćelijskim protruzijama;
5. IL-17 pozitivno reguliše adheziju PK-MMĆ na endotelske ćelije delujući na oba tipa ćelija, i posledično pojačava transendotelsku migraciju PK-MMĆ zavisno od aktivacije uPA. Aktivnost uPA i njena interakcija sa ćelijskom površinom, posreduju sposobnosti IL-17 da poveća adheziju PK-MMĆ za fibronektin podendotelske bazalne membrane čime je obezbeđena endotelska propustljivost i invazija ćelija u ciljno tkivo.
6. Kultivacija VS-MMĆ u hipoksičnim uslovima na 3% O₂, ne utiče na njihov mezenhimski fenotip, ali moduliše njihov diferencijacioni potencijal. Hipoksični uslovi stimulišu adipogenu i hondroenu, dok smanjuju osteogenu diferencijaciju VS-MMĆ;
7. Izlaganje VS-MMĆ uslovima od 3% O₂ poboljšava njihovu „matičnost“ u smislu povećanja ekspresije embrionalnih markera *NANOG*, *OCT4*, *SOX-2* kao i

ZAKLJUČCI

proliferativnog i klonogenog potencijala ćelija. U uslovima niske oksigenacije, kvalitet ovih ćelija je očuvan s obzirom da 3% O₂ dovodi samo do tranzijentne promene u ćelijskom ciklusu i štiti od apoptoze;

8. Migratorni kapacitet VS-MMĆ, kao i aktivnost proteolitičkih enzima povećani su u ispitivanim hipoksičnim uslovima od 3% O₂. Međutim, smanjena oksigenacija nema uticaja na aktivaciju specifičnih signalnih puteva u ovim procesima, s obzirom da ERK1/2 MAPK posreduje mobilizaciji VS-MMĆ iz kolagena nezavisno od koncentracije O₂, dok se *Wnt/β-catenin* put aktivira tokom migracije i mobilizacije u standardnim uslovima. Pored toga, aktivnost uPA kod VS-MMĆ posredovana je aktivacijom oba signalna puta, ali takođe na način nezavisan od koncentracije O₂.

7. *LITERATURA*



LITERATURA

- Abedin, M., Tintut, Y., i Demer, L. L. (2004). Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circulation Research*, 95(7), 671–676.
- Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P. W., Beighton, G., Bello, P. A., et al. (2007). Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nature Biotechnology*, 25(7), 803–816.
- Aggarwal, S., i Pittenger, M. F. (2005). Modulation of Immune Cell Responses by Human Mesenchymal Stem Cells. *Blood*, 105(4), 1815–1822.
- Ahmed, A. S. I., Sheng, M. H., Wasnik, S., Baylink, D. J., i Lau, K.-H. W. (2017). Effect of aging on stem cells. *World Journal of Experimental Medicine*, 7(1), 1–10.
- Ahsan, T., Doyle, A. M., i Nerem, R. M. (2008). Stem cell research. U A. Atala, R. Lanza, J. A. Thomson, i R. M. Nerem, *Principles of Regenerative Medicine* (Vol. 11, pp. 28–47). Academic Press.
- Alison, M. R., Poulsom, R., Forbes, S., i Wright, N. A. (2002). An introduction to stem cells. *Journal of Pathology*, 197, 419–423.
- Altman, J., i Das, G. D. (1967). Postnatal Neurogenesis in the Guinea-pig. *Nature*, 214, 1098–1101.
- Amable, P. R., Teixeira, M. V. T., Carias, R. B. V., Granjeiro, J. M., i Borojevic, R. (2014). Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Research and Therapy*, 5(53), 1–13.
- Amara, I., Touati, W., Beaune, P., i De Waziers, I. (2014). Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for prodrug gene therapy against tumors. *Biochimie*, 105, 4–11.
- Anzalone, R., Iacono, M. Lo, Corrao, S., Magno, F., Loria, T., Cappello, F., Zummo, G., et al. (2010). New Emerging Potentials for Human Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells: Immunological Features and Hepatocyte-Like Differentiative Capacity. *Stem Cells and Development*, 19(4), 423–438.
- Anzalone, R., Iacono, M. Lo, Loria, T., Stefano, A. Di, Giannuzzi, P., Farina, F., i la Rocca, G. (2011). Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells as Candidates for Beta Cells Regeneration: Extending the Differentiative and Immunomodulatory Benefits of Adult Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Type 1 Diabetes. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(2), 342–363.
- Argibay, B., Trekker, J., Himmelreich, U., Beiras, A., Topete, A., Taboada, P., Pérez-Mato, M., et al. (2017). Intraarterial route increases the risk of cerebral lesions after mesenchymal cell administration in animal model of ischemia. *Scientific Reports*, 7(40758), 1–17.
- Azandeh, S., Orazizadeh, M., Hashemitabar, M., Khodadadi, A., Shayesteh, A. A., Nejad, D. B., Gharravi, A. M., et al. (2012). Mixed enzymatic-explant protocol for isolation of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly and encapsulation in 3D culture system. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 5(10), 580–586.
- Bakhshi, T., Zabriskie, R. C., Bodie, S., Kidd, S., Ramin, S., Laura, A., Gregory, S. A., et al. (2008). Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture. *Transfusion*, 48(12), 2638–2644.
- Basciano, L., Nemos, C., Foliguet, B., de Isla, N., de Carvalho, M., Tran, N., i Dalloul, A.

LITERATURA

- (2011). Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. *BMC Cell Biology*, 12(1), 12. BioMed Central Ltd.
- Bass, R., i Ellis, V. (2009). Regulation of urokinase receptor function and pericellular proteolysis by the integrin $\alpha 5\beta 1$. *Thrombosis and Haemostasis*, 101(5), 954–962.
- De Becker, A., Van Hummelen, P., Bakkus, M., Broek, I. Vande, De Wever, J., De Waele, M., i Van Riet, I. (2007). Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Haematologica*, 92(4), 440–449.
- Becker, A. J., McCulloch, E. A., i Till, J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 197(4), 452–454.
- Belema-Bedada, F., Uchida, S., Martire, A., Kostin, S., i Braun, T. (2008). Efficient Homing of Multipotent Adult Mesenchymal Stem Cells Depends on FROUNT-Mediated Clustering of CCR2. *Cell Stem Cell*, 2(6), 566–575.
- Bernardo, M. E., i Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: Sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, 13(4), 392–402.
- Bian, Z. Y., Li, G., Gan, Y. K., Hao, Y. Q., Xu, W. T., i Tang, T. T. (2009). Increased Number of Mesenchymal Stem Cell-like Cells in Peripheral Blood of Patients with Bone Sarcomas. *Archives of Medical Research*, 40(3), 163–168.
- Bianco, P. (2014). “Mesenchymal” Stem Cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 677–704.
- Bieback, K., i Brinkmann, I. (2010). Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues : From biology to cell therapy, 2(4), 81–92.
- Binder, B. R., Mihaly, J., i Prager, G. W. (2007). uPAR –uPA –PAI-1 interactions and signaling: A vascular biologist’s view. *Thrombosis and Haemostasis*, 97, 336–342.
- Blasi, F., i Carmeliet, P. (2002). uPAR: A versatile signalling orchestrator. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(12), 932–943.
- Blasi, F., Vittoria Cubellis, M., Teresa Masucci, M., Møller, L. B., Olson, D. P., Pedersen, N., Behrendt, N., et al. (1990). The urokinase receptor and regulation of cell surface plasminogen activation. *Cell Differentiation and Development*, 32(3), 247–253.
- Bongso, A., i Fong, C. Y. (2013). The Therapeutic Potential, Challenges and Future Clinical Directions of Stem Cells from the Wharton’s Jelly of the Human Umbilical Cord. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(2), 226–240.
- Bongso, A., i Richards, M. (2004). History and perspective of stem cell research. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 18(6), 827–842.
- Bonilla-Porras, A. R., Velez-Pardo, C., i Jimenez-Del-Rio, M. (2017). Fast transdifferentiation of human Wharton’s jelly mesenchymal stem cells into neurospheres and nerve-like cells. *Journal of Neuroscience Methods*, 282, 52–60.
- Bonnet, D. (2002). Haematopoietic stem cells. *J Pathol*, 197, 430–440.
- Boveri, T. (1892). Über die Entstehung des Gegensatzes zwischen den Geschlechtszellen und die somatischen Zellen bei *Ascaris megalcephala*. *Sitzungsberichte*

LITERATURA

- Boyer, L. A., Tong, I. L., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, *122*(6), 947–956.
- De Bruyn, C., Najar, M., Raicevic, G., Meuleman, N., Pieters, K., Stamatopoulos, B., Delforge, A., et al. (2011). A rapid, simple and reproducible method for the isolation of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly without enzymatic treatment. *Stem Cells and Development*, *20*(3), 547–57.
- Bryder, D., Rossi, D. J., i Weissman, I. L. (2006). Hematopoietic stem cells: The paradigmatic tissue-specific stem cell. *American Journal of Pathology*, *169*(2), 338–346.
- Buravkova, L. B., Andreeva, E. R., Gogvadze, V., i Zhivotovsky, B. (2014). Mesenchymal stem cells and hypoxia: Where are we? *Mitochondrion*, *19*(Part A), 105–112.
- Busletta, C., Novo, E., Valfrè Di Bonzo, L., Povero, D., Paternostro, C., Ievolella, M., Mareschi, K., et al. (2011). Dissection of the biphasic nature of hypoxia-induced motogenic action in bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, *29*(6), 952–963.
- Can, A., i Karahuseyinoglu, S. (2007). Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma with Regard to the Source of Fetus-Derived Stem Cells. *Stem Cells*, *25*(11), 2886–2895.
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, *9*(5), 641–50.
- Caplan, A. I. (2017). Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Translational Medicine*, *6*(6), 1445–1451.
- Caplan, A. I., i Dennis, J. E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, *98*(5), 1076–1084.
- Carreau, A., Hafny-Rahbi, B. El, Matejuk, A., Grillon, C., i Kieda, C. (2011). Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *15*(6), 1239–1253.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., i Middleton, J. (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells*, *25*(11), 2739–2749.
- Chang, J., Liu, F., Lee, M., Wu, B., Ting, K., Janette, N., Soo, C., et al. (2013). NF- κ B inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting beta-catenin degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(33), 13690–13691.
- Chang, S. H., i Dong, C. (2009). IL-17F: regulation, signaling and function in inflammation. *Cytokine*, *46*(1), 7–11.
- Chang, S. H., Park, H., i Dong, C. (2006). Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(47), 35603–35607.
- Charif, N., Li, Y. Y., Targa, L., Zhang, L., Ye, J. S., Li, Y. P., Stoltz, J. F., et al. (2017). Aging of bone marrow mesenchymal stromal/stem cells: Implications on autologous regenerative medicine. *Bio-Medical Materials and Engineering*, *28*(s1), S57–S63.
- Chatzistamatiou, T. K., Papassavas, A. C., Michalopoulos, E., Gamaloutsos, C., Mallis, P., Gontika, I., Panagouli, E., et al. (2014). Optimizing isolation culture and freezing methods to preserve Wharton's jelly's mesenchymal stem cell (MSC) properties: An MSC banking

LITERATURA

- protocol validation for the Hellenic Cord Blood Bank. *Transfusion*, 54(12), 3108–3120.
- Chen, D., Hao, H., Tong, C., Liu, J., Dong, L., Ti, D., Hou, Q., et al. (2015). Transdifferentiation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells into epidermal-like cells by the mimicking skin microenvironment. *International Journal of Lower Extremity Wounds*, 14(2), 136–145.
- Chen, F. M., Wu, L. A., Zhang, M., Zhang, R., i Sun, H. H. (2011). Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: Promises, strategies, and translational perspectives. *Biomaterials*, 32(12), 3189–3209.
- Chen, M. Y., Lie, P. C., Li, Z. L., i Wei, X. (2009). Endothelial differentiation of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, 37(5), 629–640.
- Chen, S., Lewallen, M., i Xie, T. (2012). Adhesion in the stem cell niche: biological roles and regulation. *Development*, 140(2), 255–265.
- Cho, P. S., Messina, D. J., Hirsh, E. L., Chi, N., Goldman, S. N., Lo, D. P., Harris, I. R., et al. (2007). Immunogenicity of umbilical cord tissue derived cells. *Blood*, 111(1), 430–439.
- Chong, P. P., Selvaratnam, L., Abbas, A. A., i Kamarul, T. (2012). Human peripheral blood derived mesenchymal stem cells demonstrate similar characteristics and chondrogenic differentiation potential to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 30(4), 634–642.
- Chronopoulos, A., Trudeau, K., Roy, S., Huang, H., Vinos, S. A., i Roy, S. (2011). High glucose-induced altered basement membrane composition and structure increases trans-endothelial permeability: Implications for diabetic retinopathy. *Current Eye Research*, 36(8), 747–753.
- Le Clainche, C., i Carlier, M.-F. (2008). Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration. *Physiological Reviews*, 88(2), 489–513.
- Conconi, M. T., Burra, P., Di Liddo, R., Calore, C., Turetta, M., Bellini, S., Bo, P., et al. (2006). CD105(+) cells from Wharton's jelly show in vitro and in vivo myogenic differentiative potential. *International Journal of Molecular Medicine*, 18(6), 1089–1096.
- Conconi, M. T., Liddo, R. Di, Tommasini, M., Calore, C., i Parnigotto, P. P. (2011). Phenotype and Differentiation Potential of Stromal Populations Obtained from Various Zones of Human Umbilical Cord: An Overview. *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*, 4(1), 6–20.
- Copelan, E. A. (2006). Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *The new england journal of medicine*, 354(17), 1813–1826.
- Corrao, S., La Rocca, G., Lo Iacono, M., Zummo, G., Gerbino, A., Farina, F., i Anzalone, R. (2013). New Frontiers in Regenerative Medicine in Cardiology: The Potential of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 39–45.
- Crisan, M., i Dzierzak, E. (2017). The many faces of hematopoietic stem cell heterogeneity. *Development*, 144(22), 4195–4195.
- Crisostomo, P. R., Wang, Y., Markel, T. A., Wang, M., Lahm, T., i Meldrum, D. R. (2008). Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF- α , LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF κ B- but not JNK-dependent mechanism. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 294(3), C675–C682.

LITERATURA

- Cua, D. J., i Tato, C. M. (2010). Innate IL-17-producing cells: The sentinels of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10(7), 479–489.
- D'Ignazio, L., i Rocha, S. (2016). Hypoxia Induced NF- κ B. *Cells*, 5(1), 10.
- Das, R., Jahr, H., Osch, G. J. V. M. van, i Farrell, E. (2010). The Role of Hypoxia in Bone Marrow – Derived Mesenchymal Stem Cells : Considerations. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 16(2), 159–68.
- DiMarino, A. M., Caplan, A. I., i Bonfield, T. L. (2013). Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Frontiers in Immunology*, 4(JUL), 1–9.
- Ding, D.-C., Shyu, W.-C., i Lin, S.-Z. (2011). Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplantation*, 20(1), 5–14.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.
- Donders, R., Vanheusden, M., Bogie, J. F. J., Ravanidis, S., Thewissen, K., Stinissen, P., Gyselaers, W., et al. (2015). Human Wharton's jelly-derived stem cells display immunomodulatory properties and transiently improve rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Transplantation*, 24(10), 2077–2098.
- Drela, K., Sarnowska, A., Siedlecka, P., Szablowska-Gadomska, I., Wielgos, M., Jurga, M., Lukomska, B., et al. (2014). Low oxygen atmosphere facilitates proliferation and maintains undifferentiated state of umbilical cord mesenchymal stem cells in an hypoxia inducible factor-dependent manner. *Cytotherapy*, 16(7), 881–892.
- Dröscher, A. (2014). Images of cell trees, cell lines, and cell fates: The legacy of Ernst Haeckel and August Weismann in stem cell research. *History and Philosophy of the Life Sciences*, 36(2), 157–186.
- Đurinkova, E., Kučerova, L., i Matušková, M. (2014). Mesenchymal stromal cells retrovirally transduced with prodrug-converting genes are suitable vehicles for cancer gene therapy. *Acta virologica*, 58, 3–13.
- Ebrahim, N. A., i Leach, L. (2015). Temporal Studies into Attachment, VE-Cadherin Perturbation, and Paracellular Migration of Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells Across Umbilical Vein Endothelial Monolayers. *Stem Cells and Development*, 24(4), 426–436.
- Ebrahim, N. A., i Leach, L. (2016). Transendothelial migration of human umbilical mesenchymal stem cells across uterine endothelial monolayers: Junctional dynamics and putative mechanisms. *Placenta*, 48, 87–98.
- Ejtehadifar, M., Shamsasenjan, K., Movassaghpour, A., Akbarzadehlaleh, P., Dehdilani, N., Abbasi, P., Molaeipour, Z., et al. (2015). The effect of hypoxia on mesenchymal stem cell biology. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 5(2), 141–149.
- Elfenbein, G. J., i Sackstein, R. (2004). Primed marrow for autologous and allogeneic transplantation: A review comparing primed marrow to mobilized blood and steady-state marrow. *Experimental Hematology*, 32, 327–339.
- Ely, L. K., Fischer, S., i Garcia, K. C. (2009). Structural basis of receptor sharing by interleukin 17 cytokines. *Nature Immunology*, 10(12), 1245–1251.

LITERATURA

- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., i Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4), 677–89.
- English, K. (2013). Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunology and Cell Biology*, 91(1), 19–26.
- Estrela, C., de Alencar, A. H. G., Kitten, G. T., Vencio, E. F., i Gava, E. (2011). Mesenchymal stem cells in the dental tissues: Perspectives for tissue regeneration. *Brazilian Dental Journal*, 22(2), 91–98.
- Evans, M. J., i Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154–156.
- Fernández, M., Simon, V., Herrera, G., Cao, C., Del Favero, H., i Minguell, J. J. (1997). Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplantation*, 20(4), 265–271.
- Ferraro, F., Celso, C. Lo, i Scadden, D. (2010). Adult stem cells and their niches. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 695, 155–168.
- Ferro, F., Spelat, R., Shaw, G., Duffy, N., Islam, M. N., O’Shea, P. M., O’Toole, D., et al. (2019). Survival/Adaptation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells After Long-Term Starvation Through Selective Processes. *Stem Cells*, 00, 1–15.
- Fischer, U. M., Harting, M. T., Jimenez, F., Monzon-Posadas, W. O., Xue, H., Savitz, S. I., Laine, G. A., et al. (2008). Pulmonary Passage is a Major Obstacle for Intravenous Stem Cell Delivery: The Pulmonary First-Pass Effect. *Stem Cells and Development*, 18(5), 683–692.
- Fong, C. Y., Chak, L. L., Biswas, A., Tan, J. H., Gauthaman, K., Chan, W. K., i Bongso, A. (2011). Human Wharton’s Jelly Stem Cells Have Unique Transcriptome Profiles Compared to Human Embryonic Stem Cells and Other Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(1), 1–16.
- Forristal, C. E., Wright, K. L., Hanley, N. A., Oreffo, R. O. C., i Houghton, F. D. (2010). Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. *Reproduction*, 139(1), 85–97.
- Foyt, D. A., Taheem, D. K., Ferreira, S. A., Norman, M. D. A., Petzold, J., Jell, G., Grigoriadis, A. E., et al. (2019). Hypoxia impacts human MSC response to substrate stiffness during chondrogenic differentiation. *Acta Biomaterialia*, 89, 1–11.
- Fraser, J. K., Wulur, I., Alfonso, Z., i Hedrick, M. H. (2006). Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 24(4), 150–154.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4(5):267-74.
- Fu, Y.-S., Cheng, Y.-C., Lin, M.-Y. A., Cheng, H., Chu, P.-M., Chou, S.-C., Shih, Y.-H., et al. (2006). Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton’s Jelly to Dopaminergic Neurons In Vitro: Potential Therapeutic Application for Parkinsonism. *Stem Cells*, 24(1), 115–124.
- Fu, Y., Karbaat, L., Wu, L., Leijten, J., Both, S. K., i Karperien, M. (2017). Trophic Effects of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 23(6), 515–528.
- Fuchs, E., Tumber, T., i Guasch, G. (2004). Socializing with the neighbors: Stem cells and their

LITERATURA

- niche. *Cell*, 116(6), 769–778.
- Gaffen, S. L. (2009). Structure and signalling in the IL-17 receptor superfamily. *Nat. Rev. Immunol.*, 9(8), 1–24.
- Galderisi, U., i Giordano, A. (2014). The Gap Between the Physiological and Therapeutic Roles of Mesenchymal Stem Cells. *Medicinal Research Reviews*, 34(5), 1100–1126.
- Galipeau, J., i Sensébé, L. (2018). Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell*, 22(6), 824–833.
- Gang, E. J., Bosnakovski, D., Figueiredo, C. A., Visser, J. W., i Perlingeiro, R. C. R. (2007). SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*, 109(4), 1743–1751.
- Gao, L. R., Zhang, N. K., Ding, Q. A., Chen, H. Y., Hu, X., Jiang, S., Li, T. C., et al. (2013). Common expression of stemness molecular markers and early cardiac transcription factors in human Wharton’s jelly-derived mesenchymal stem cells and embryonic stem cells. *Cell Transplantation*, 22(10), 1883–1900.
- Garg, A. V., Ahmed, M., Vallejo, A. N., Ma, A., i Gaffen, S. L. (2013). The Deubiquitinase A20 Mediates Feedback Inhibition of Interleukin-17 Receptor Signaling. *Science Signaling*, 6(278), ra44.
- Gattazzo, F., Urciuolo, A., i Bonaldo, P. (2014). Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(8), 2506–2519.
- Di Giuseppe, F., Pierdomenico, L., Eleuterio, E., Sulpizio, M., Lanuti, P., Riviello, A., Bologna, G., et al. (2014). Cryopreservation Effects on Wharton’s Jelly Stem Cells Proteome. *Stem Cell Reviews and Reports*, 10(3), 429–446.
- Goldsby, R. A., Kindt, T. J., Osborne, B. A., i Janis Kuby. (2002). *Immunology* (5. izdanje). W. H. Freeman.
- Good, R. A. (1987). Bone marrow transplantation symposium: Bone marrow transplantation for immunodeficiency diseases. *American Journal of the Medical Sciences*, 294(2), 68–74.
- Greco, V., i Guo, S. (2010). Compartmentalized organization: a common and required feature of stem cell niches? *Development*, 137(10), 1586–1594.
- Greijer, A. E., i Van Der Wall, E. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *Journal of Clinical Pathology*, 57(10), 1009–1014.
- Griffin, G. K., Newton, G., Tarrío, M. L., Bu, D.-X., Maganto-Garcia, E., Azcutia, V., Alcaide, P., et al. (2012). IL-17 and TNF- Sustain Neutrophil Recruitment during Inflammation through Synergistic Effects on Endothelial Activation. *The Journal of Immunology*, 188(12), 6287–6299.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., i Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS*, 97(25), 13625–13630.
- Gu, C., Wu, L., i Li, X. (2013). IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine*, 64(2), 477–485.
- Gurusamy, N., Alsayari, A., Rajasingh, S., i Rajasingh, J. (2018). Adult Stem Cells for Regenerative Therapy. U David P. Teplow, *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (1.izdanje, tom. 160, pp. 1–22). Elsevier Inc.
- Gustafsson, M. V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J. L., et al.

LITERATURA

- (2005). Hypoxia requires Notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Developmental Cell*, 9(5), 617–628.
- Gutierrez-Aranda, I., Ramos-Mejia, V., Bueno, C., Munoz-Lopez, M., Real, P. J., Mácia, A., Sanchez, L., et al. (2010). Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection. *Stem Cells*, 28(9), 1568–1570.
- Gutova, M., Najbauer, J., Frank, R. T., Kendall, S. E., Gevorgyan, A., Metz, M. Z., Guevorkian, M., et al. (2008). Urokinase Plasminogen Activator and Urokinase Plasminogen Activator Receptor Mediate Human Stem Cell Tropism to Malignant Solid Tumors. *Stem Cells*, 26(6), 1406–1413.
- Haack-Sørensen, M., Hansen, S. K., Hansen, L., Gaster, M., Hyttel, P., Ekblond, A., i Kastrup, J. (2013). Mesenchymal Stromal Cell Phenotype is not Influenced by Confluence during Culture Expansion. *Stem Cell Reviews and Reports*, 9(1), 44–58.
- Haecker, V. (1892). Die Kernteilungsvorgänge bei der Mesoderm- und Entoderm Bildung von Cyclops. *Archiv für mikroskopische anatomie*, 39: 556–581.
- Hall, A. (2005). Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochemical Society Transactions*, 33(5), 891–895.
- Han, X., Yang, Q., Lin, L., Xu, C., Zheng, C., Chen, X., Han, Y., et al. (2014). Interleukin-17 enhances immunosuppression by mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 21(11), 1758–1768.
- Hartupée, J., Liu, C., Novotny, M., Li, X., i Hamilton, T. (2007). IL-17 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization. *Journal of immunology*, 179(6), 4135–41.
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., i Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, 9(1), 12. BioMed Central Ltd.
- Hassan, G., Kasem, I., Soukkarieh, C., i Aljamali, M. (2017). A Simple Method to Isolate and Expand Human Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cells : Using Explant Method and Umbilical Cord Blood Serum. *International Journal of Stem Cells*, 10(2), 184–192.
- He, Q., Wan, C., i Li, G. (2007). Concise Review: Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Blood. *Stem Cells*, 25(1), 69–77.
- He, S., Nakada, D., i Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, 377–406.
- Hendijani, F., Sadeghi-Aliabadi, H., i Javanmard, S. H. (2014). Comparison of human mesenchymal stem cells isolated by explant culture method from entire umbilical cord and Wharton's jelly matrix. *Cell and Tissue Banking*, 15(4), 555–565.
- Hiew, V. V., Simat, S. F. B., i Teoh, P. L. (2018). The Advancement of Biomaterials in Regulating Stem Cell Fate. *Stem Cell Reviews and Reports*, 14(1), 43–57.
- Himal, I., Goyal, U., i Ta, M. (2017). Evaluating Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cell's Survival, Migration, and Expression of Wound Repair Markers under Conditions of Ischemia-Like Stress. *Stem Cells International*, 2017, 1–13.
- Hiyama, E., i Hiyama, K. (2007). Telomere and telomerase in stem cells. *British Journal of Cancer*, 96(7), 1020–1024.

LITERATURA

- Hofer, H. R., i Tuan, R. S. (2016). Secreted trophic factors of mesenchymal stem cells support neurovascular and musculoskeletal therapies. *Stem Cell Research and Therapy*, 7(1), 1–14.
- Hosseini, S. M., Vasaghi, A., Nakhparvar, N., Roshanravan, R., Talaei-Khozani, T., i Razi, Z. (2015). Differentiation of Wharton's jelly mesenchymal stem cells into neurons in alginate scaffold. *Neural Regeneration Research*, 10(8), 1312–1316.
- Hsieh, J.-Y., Fu, Y.-S., Chang, S.-J., Tsuang, Y.-H., i Wang, H.-W. (2010). Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Wharton ' s Jelly of Umbilical Cord. *Stem cells and development*, 19(12), 1895–1910.
- Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L. A., Keith, B., i Simon, M. C. (2003). Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 alpha (HIF-1 alpha) and HIF-2 alpha in Hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol*, 23(24), 9361–9374.
- Hu, Y., Liang, J., Cui, H. P., Wang, X. M., Rong, H., Shao, B., i Cui, H. (2013). Wharton's jelly mesenchymal stem cells differentiate into retinal progenitor cells. *Neural Regeneration Research*, 8(19), 1783–1792.
- Huang, G. T. J., Gronthos, S., i Shi, S. (2009). Critical reviews in oral biology and medicine: Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in Regenerative Medicine. *Journal of Dental Research*, 88(9), 792–806.
- Huang, H., Kim, H. J., Chang, E. J., Lee, Z. H., Hwang, S. J., Kim, H. M., Lee, Y., et al. (2009). IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: Implications for bone remodeling. *Cell Death and Differentiation*, 16(10), 1332–1343.
- Huang, Y. Z., Xie, H. Q., Silini, A., Parolini, O., Zhang, Y., Deng, L., i Huang, Y. C. (2017). Mesenchymal Stem/Progenitor Cells Derived from Articular Cartilage, Synovial Membrane and Synovial Fluid for Cartilage Regeneration: Current Status and Future Perspectives. *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(5), 575–586.
- Hung, S.-P., Ho, J. H., Shih, Y.-R. V., Lo, T., i Lee, O. K. (2012). Hypoxia promotes proliferation and osteogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 30(2), 260–266.
- Igura, K., Zhang, X., Takahashi, K., Mitsuru, A., Yamaguchi, S., i Takahashi, T. A. (2004). Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*, 6(6), 543–553.
- Ivanovic, Z., i Vlaski-Lafarge, M. (2016). *Anaerobiosis and Stemness. An evolutionary Paradigm* (1 izdanje.). San Diego, United States: Elsevier Science Publishing Co Inc.
- Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., Kriegsheim, A. Von, et al. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel–Lindau Ubiquitylation Complex by O₂-Regulated Prolyl Hydroxylation. *Science*, 292, 468–472.
- Jansen, J. (2005). The first successful allogeneic bone-marrow transplant: Georges Mathé. *Transfusion Medicine Reviews*, 19(3), 246–248.
- Jin, W., i Dong, C. (2013). IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Emerging Microbes and Infections*, 2, e60.
- Joerger-Messerli, M. S., Marx, C., Oppliger, B., Mueller, M., Surbek, D. V., i Schoeberlein, A. (2016). Mesenchymal Stem Cells from Wharton's Jelly and Amniotic Fluid. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 31, 30–44.
- Jones, D. L., i Fuller, M. T. (2014). *Stem cell niches*. U A. Athala, R. Lanza ., *Essentials of Stem*

LITERATURA

- Cell Biology* (3. izdanje .). Elsevier Inc.
- Jones, D. L., i Wagers, A. J. (2008). No place like home: Anatomy and function of the stem cell niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 11–21.
- Kaelin, W. G., i Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway. *Molecular Cell*, 30(4), 393–402.
- Kalaszczynska, I., i Ferdyn, K. (2015). Wharton’s jelly derived mesenchymal stem cells: Future of regenerative medicine? Recent findings and clinical significance. *BioMed Research International*, 2015.
- Kallio, P. J., Okamoto, K., Brien, S. O., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H., i Poellinger, L. (1998). Signal transduction in hypoxic cells : inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP / p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *The EMBO Journal*, 17(22), 6573–6586.
- Kanazawa, M., Atsuta, I., Ayukawa, Y., Yamaza, T., Kondo, R., Matsuura, Y., i Koyano, K. (2018). The influence of systemically or locally administered mesenchymal stem cells on tissue repair in a rat oral implantation model. *International Journal of Implant Dentistry*, 4(1), 1–11.
- Kang, S. K., Shin, I. S., Ko, M. S., Jo, J. Y., i Ra, J. C. (2012). Journey of mesenchymal stem cells for homing: Strategies to enhance efficacy and safety of stem cell therapy. *Stem Cells International*, 2012.
- Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G. G., Demiralp, D. Ö., Tukun, A., et al. (2007). Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. *Stem Cells*, 25(2), 319–331.
- Kassis, I., Zangi, L., Rivkin, R., Levdansky, L., Samuel, S., Marx, G., i Gorodetsky, R. (2006). Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplantation*, 37(10), 967–976.
- Kasterstein, E., Strassburger, D., Komarovskiy, D., Bern, O., Komsky, A., Raziell, A., Friedler, S., et al. (2013). The effect of two distinct levels of oxygen concentration on embryo development in a sibling oocyte study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(8), 1073–1079.
- Khatami, S. M., Zahri, S., Maleki, M., i Hamidi, K. (2014). Stem cell isolation from human Wharton’s jelly: A study of their differentiation ability into lens fiber cells. *Cell Journal*, 15(4), 364–371.
- Khodabandeh, Z., Vojdani, Z., Talaei-Khozani, T., Jaberipour, M., Hosseini, A., i Bahmanpour, S. (2016). Comparison of the expression of hepatic genes by human Wharton’s Jelly Mesenchymal stem cells cultured in 2D and 3D Collagen culture systems. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 41(1), 28–36.
- Kim, D.-W., Staples, M., Shinozuka, K., Pantcheva, P., Kang, S.-D., i Borlongan, C. (2013). Wharton’s Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), 11692–11712.
- Kim, N., i Cho, S.-G. (2013). Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Korean Journal of Internal Medicine*, 28(4), 387–402.
- Kita, K., Lee, J. O., Finnerty, C. C., i Herndon, D. N. (2011). Cord Blood-Derived Hematopoietic Stem/Progenitor Cells: Current Challenges in Engraftment, Infection, and

LITERATURA

- Ex Vivo Expansion . *Stem Cells International*, 2011, 1–8.
- Kobayashi, K., Kubota, T., i Aso, T. (1998). Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly. Expression and localization of α -smooth muscle actin. *Early Human Development*, 51(3), 223–233.
- Kocić, J., Santibañez, J. F., Krstić, A., Mojsilović, S., Ilić, V., i Bugarski, D. (2013). Interleukin-17 modulates myoblast cell migration by inhibiting urokinase type plasminogen activator expression through p38 mitogen-activated protein kinase. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(2), 464–475.
- Kondo, M., Yamaoka, K., Sonomoto, K., Fukuyo, S., Oshita, K., Okada, Y., i Tanaka, Y. (2013). IL-17 inhibits chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*, 8(11).
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., i Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 485–517.
- Krstić, J., Obradović, H., Kukolj, T., Mojsilović, S., Okic-Dordević, I., Bugarski, D., i Santibanez, J. F. J. (2015). An Overview of Interleukin-17A and Interleukin-17 Receptor A Structure, Interaction and Signaling. *Protein and Peptide Letters Peptide Letters*, 22(7), 570–578.
- Kuhn, N. Z., i Tuan, R. S. (2010). Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: Implications in tumorigenesis and metastasis. *Journal of Cellular Physiology*, 222(2), 268–277.
- Kuznetsov, S. A., Mankani, M. H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P., i Robey, P. G. (2001). Circulating skeletal stem cells. *Journal of Cell Biology*, 153(5), 1133–1139.
- Lai, Y., i Dong, C. (2016). Interleukin-17 Family. U *Encyclopedia of Immunobiology* (Tom. 2). Elsevier
- Lander, A. D., Kimble, J., Clevers, H., Fuchs, E., Montarras, D., Buckingham, M., Calof, A. L., et al. (2012). What does the concept of the stem cell niche really mean today? *BMC Biology*, 10(19), 1–15.
- Lando, D., Peet, D. J., Gorman, J. J., Whelan, D. A., Whitelaw, M. L., i Bruick, R. K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes and Development*, 16, 1466–1471.
- Lavrentieva, A., Majore, I., Kasper, C., i Hass, R. (2010). Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell communication and signaling*, 8, 18.
- Lee, J., Ho, W. H., Maruoka, M., Corpuz, R. T., Baldwin, D. T., Foster, J. S., Goddard, A. D., et al. (2001). IL-17E, a novel proinflammatory ligand for the IL-17 receptor homolog IL-17Rh1. *Journal of Biological Chemistry*, 276(2), 1660–1664.
- Li, D., Chai, J., Shen, C., Han, Y., i Sun, T. (2014). Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells differentiate into epidermal-like cells using a novel co-culture technique. *Cytotechnology*, 66(4), 699–708.
- Li, H., Chen, J., Huang, A., Stinson, J., Heldens, S., Foster, J., Dowd, P., et al. (2002). Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), 773–778.
- Li, Li, i Jiang, J. (2011). Regulatory factors of mesenchymal stem cell migration into injured

LITERATURA

- tissues and their signal transduction mechanisms. *Frontiers of Medicine*, 5(1), 33–39.
- Li, Linheng, i Clevers, H. (2010). Coexistence of Quiescent and Active Adult Stem Cells in Mammals. *Science*, 327(5965), 542–545.
- Li, Linheng, i Xie, T. (2005). Stem cell niche: Structure and Function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 605–631.
- Li, Z., Liu, C., Xie, Z., Song, P., Zhao, R. C. H., Guo, L., Liu, Z., et al. (2011). Epigenetic dysregulation in mesenchymal stem cell aging and spontaneous differentiation. *PLoS ONE*, 6(6), 1–9.
- Lim, J., Razi, Z. R. M., Law, J., Nawi, A. M., Idrus, R. B. H., i Ng, M. H. (2016). MSCs can be differentially isolated from maternal, middle and fetal segments of the human umbilical cord. *Cytotherapy*, 18(12), 1493–1502.
- Lin, W., Xu, L., Lin, S., Shi, L., Wang, B., Pan, Q., Lee, W. Y. W., et al. (2019). Characterisation of multipotent stem cells from human peripheral blood using an improved protocol. *Journal of Orthopaedic Translation*.
- Lin, W., Xu, L., Zwingenberger, S., Gibon, E., Goodman, S. B., i Li, G. (2017). Mesenchymal stem cells homing to improve bone healing. *Journal of Orthopaedic Translation*, 9, 19–27.
- Liu, C., Qian, W., Qian, Y., Giltiyay, N. V., Lu, Y., Misra, S., i Deng, L. (2009). Act1, a novel U-box E3 ubiquitin ligase for IL-17R-mediated signalling. *Science Signaling*, 2(92), ra63.
- Liu, J., Duan, Y., Cheng, X., Chen, X., Xie, W., Long, H., Lin, Z., et al. (2011). IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407(2), 348–354.
- Liu, Shan, Zhou, J., Zhang, X., Liu, Y., Chen, J., Hu, B., Song, J., et al. (2016). Strategies to optimize adult stem cell therapy for tissue regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 1–16.
- Liu, Shuyun, Yuan, M., Hou, K., Zhang, L., Zheng, X., Zhao, B., Sui, X., et al. (2012). Immune characterization of mesenchymal stem cells in human umbilical cord Wharton's jelly and derived cartilage cells. *Cellular Immunology*, 278(1–2), 35–44.
- Liu, W., Shen, S. M., Zhao, X. Y., i Chen Dr., G. Q. (2012). Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 3(2), 165–178.
- Lopez, Y. (2011). Evaluating the Impact of Oxygen Concentration and Plating Density on Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal*, 4(1), 82–94.
- Łos, M. J., Skubis, A., i Ghavami, S. (2019). Stem Cells. U M. J. Łos, A. Hudecki, i E. Wiecheć , *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine* (pp. 5–16). Academic Press.
- Lukomska, B., Stanaszek, L., Zuba-Surma, E., Legosz, P., Sarzynska, S., i Drela, K. (2019). Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem Cells International*, 2019, 1–10.
- Lutolf, M. P., Gilbert, P. M., i Blau, H. M. (2009). Designing biomaterials to direct stem cell fate. *Nature*, 462(7272), 434–441.
- Lv, F.-J., Tuan, R. S., Cheung, K. M. C., i Leung, V. Y. L. (2014). Concise Review : The

LITERATURA

- Surface Markers and Identity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 32(6), 1408–1419.
- Maddur, M. S., Miossec, P., Kaveri, S. V., i Bayry, J. (2012). Th17 cells: Biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *American Journal of Pathology*, 181(1), 8–18.
- Maehle, A.-H. (2011). Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. *Notes and Records of the Royal Society*, 65(4), 359–378.
- Mafi, P., Hindocha, S., Mafi, R., Griffin, M., i Khan, W. S. (2011). Adult Mesenchymal Stem Cells and Cell Surface Characterization - A Systematic Review of the Literature. *The Open Orthopaedics Journal*, 5(1), 253–260.
- Majmudar, A. J., Wong, W. J., i Simon, M. C. (2010). Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress. *Molecular Cell*, 40(2), 294–309.
- Majmudar, D., Bhonde, R., i Datta, I. (2013). Influence of ischemic microenvironment on human Wharton's Jelly mesenchymal stromal cells. *Placenta*, 34(8), 642–649.
- Mancuso, P., Raman, S., Glynn, A., Barry, F., i Murphy, J. M. (2019). Mesenchymal Stem Cell Therapy for Osteoarthritis: The Critical Role of the Cell Secretome. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 1–9.
- Mansilla, E., Marín, G. H., Drago, H., Sturla, F., Salas, E., Gardiner, C., Bossi, S., et al. (2006). Bloodstream Cells Phenotypically Identical to Human Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells Circulate in Large Amounts Under the Influence of Acute Large Skin Damage: New Evidence for Their Use in Regenerative Medicine. *Transplantation Proceedings*, 38(3), 967–969.
- Margossian, T., Reppel, L., Makdissy, N., Stoltz, J. F., Bensoussan, D., i Huselstein, C. (2012). Mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly: Comparative phenotype analysis between tissue and in vitro expansion. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 22(4), 243–254.
- Marthiens, V., Kazanis, I., Moss, L., Long, K., i French-Constant, C. (2010). Adhesion molecules in the stem cell niche - more than just staying in shape? *Journal of Cell Science*, 123(10), 1613–1622.
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *PNAS*, 78(12), 7634–7638.
- Masson, N., Willam, C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., i Ratcliffe, P. J. (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- α chains activated by prolyl hydroxylation. *The EMBO Journal*, 20(18), 5197–5206.
- Mathieu, J., Zhang, Z., Zhou, W., Wang, A. J., Heddleston, J. M., Pinna, C. M. A., Hubaud, A., et al. (2011). HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Research*, 71(13), 4640–4652.
- Maxson, S., Lopez, E. A., Yoo, D., Danilkovitch-Miagkova, A., LeRoux, M. A., Yang, J., Kwon, J., et al. (2012). Concise Review: Role of Mesenchymal Stem Cells in Wound Repair. *STEM CELLS Translational Medicine*, 1(2), 142–149.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, 454(7203), 428–435.
- Mellet, M., Atzei, P., Horgan, A., Hams, E., Floss, T., Wurst, W., Fallon, P. G., et al. (2012).

LITERATURA

- Orphan receptor IL-17RD tunes IL-17A signalling and is required for neutrophilia. *Nature Communications*, 3, 1110–1119.
- Mesa, K. R., Rompolas, P., i Greco, V. (2015). The Dynamic Duo: Niche/Stem Cell Interdependency. *Stem Cell Reports*, 4(6), 961–966.
- Messerli, M., Wagner, A., Sager, R., Mueller, M., Baumann, M., Surbek, D. V., i Schoeberlein, A. (2013). Stem cells from umbilical cord Wharton's jelly from preterm birth have neuroglial differentiation potential. *Reproductive Sciences*, 20(12), 1455–1464.
- Mettouchi, A. (2012). The role of extracellular matrix in vascular branching morphogenesis. *Cell Adhesion and Migration*, 6(6), 528–534.
- Mimeault, M., i Batra, S. K. (2013). Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(1), 30–54.
- Minet, E., Michel, G., Mottet, D., Raes, M., i Michiels, C. (2001). Transduction pathways involved in hypoxia-inducible factor-1 phosphorylation and activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(7), 847–855.
- Miossec, P. (2017). Update on interleukin-17: A role in the pathogenesis of inflammatory arthritis and implication for clinical practice. *RMD Open*, 3(1), 1–6.
- Miossec, P., i Kolls, J. K. (2012). Targeting IL-17 and T H 17 cells in chronic inflammation. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(10), 763–776.
- Miranda, J. P., Camões, S. P., Gaspar, M. M., Rodrigues, J. S., Carvalheiro, M., Bárcia, R. N., Cruz, P., et al. (2019). The Secretome Derived From 3D-Cultured Umbilical Cord Tissue MSCs Counteracts Manifestations Typifying Rheumatoid Arthritis. *Frontiers in Immunology*, 10(February), 18.
- Mojsilović, S., Krstić, A., Ilić, V., Okić-Dordević, I., Kocić, J., Trivanović, D., Santibañez, J. F., et al. (2011). IL-17 and FGF signaling involved in mouse mesenchymal stem cell proliferation. *Cell and Tissue Research*, 346(3), 305–316.
- Mole, D. R., Blancher, C., Copley, R. R., Pollard, P. J., Gleadle, J. M., Ragousis, J., i Ratcliffe, P. J. (2009). Genome-wide association of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α DNA binding with expression profiling of hypoxia-inducible transcripts. *Journal of Biological Chemistry*, 284(25), 16767–16775.
- Moran, E. M., Connolly, M., Gao, W., McCormick, J., Fearon, U., i Veale, D. J. (2011). Interleukin-17A induction of angiogenesis, cell migration, and cytoskeletal rearrangement. *Arthritis and Rheumatism*, 63(11), 3263–3273.
- Mortezaee, K., Minaii, B., Sabbaghziarani, F., Kashani, I. R., Hassanzadeh, G., Pasbakhsh, P., Barbarestani, M., et al. (2015). Retinoic Acid as the Stimulating Factor for Differentiation of Wharton's Jelly- Mesenchymal Stem Cells into Hepatocyte-like Cells. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 7(3), 106–112.
- Muguruma, Y., Yahata, T., Miyatake, H., Sato, T., Uno, T., Itoh, J., Kato, S., et al. (2006). Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*, 107(5), 1878–1887.
- Musiał-Wysocka, A., Kot, M., Sułkowski, M., Badyra, B., i Majka, M. (2019). Molecular and Functional Verification of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) Pluripotency. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1807.

LITERATURA

- Musina, R. A., Bekchanova, E. S., i Sukhikh, G. T. (2005). Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 139(4), 504–9.
- Nagamura-Inoue, T. (2014). Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World Journal of Stem Cells*, 6(2), 195.
- Nartprayut, K., U-Pratya, Y., Kheolamai, P., Manochantr, S., Chayosumrit, M., Issaragrisil, S., i Supokawej, A. (2013). Cardiomyocyte differentiation of perinatally-derived mesenchymal stem cells. *Molecular Medicine Reports*, 7(5), 1465–1469.
- Nekanti, U., Dastidar, S., Venugopal, P., Totey, S., i Ta, M. (2010). Increased Proliferation and Analysis of Differential Gene Expression in Human Wharton ' s Jelly-derived Mesenchymal Stromal Cells under Hypoxia. *International Journal of Biological Sciences*, 6(5), 499–512.
- Nekanti, U., Mohanty, L., Venugopal, P., Balasubramanian, S., Totey, S., i Ta, M. (2010). Optimization and scale-up of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Stem Cell Research*, 5(3), 244–254.
- Neth, P., Ciccarella, M., Egea, V., Hoelters, J., Jochum, M., i Ries, C. (2006). Wnt Signaling Regulates the Invasion Capacity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 24(8), 1892–1903.
- Neuss, S., Schneider, R. K. M., Tietze, L., Knüchel, R., i Jahnen-Dechent, W. (2009). Secretion of fibrinolytic enzymes facilitates human mesenchymal stem cell invasion into fibrin clots. *Cells Tissues Organs*, 191(1), 36–46.
- Nguyen, H., Chiasson, V. L., Chatterjee, P., Kopriva, S. E., Young, K. J., i Mitchell, B. M. (2013). Interleukin-17 causes Rho-kinase-mediated endothelial dysfunction and hypertension. *Cardiovascular Research*, 97(4), 696–704.
- Nicodemou, A., i Danisovic, L. (2017). Mesenchymal stromal/stem cell separation methods: concise review. *Cell and Tissue Banking*, 18(4), 443–460.
- Novatchkova, M., Leibbrandt, A., Werzowa, J., Neubu, A., i Eisenhaber, F. (2003). The STIR-domain superfamily in signal transduction, development and immunity. *Trends in Biochemical Sciences*, 28(5), 226–229.
- Okić-Đorđević, I., Kukulj, T., Krstić, J., Trivanović, D., Obradović, Hristina Santibañez, Juan Francisco Mojsilović, S., Ilić, V., Bugarski, D., et al. (2016). The inhibition of periodontal ligament stem cells osteogenic differentiation by IL-17 is mediated via MAPKs. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 71, 92–101.
- Osta, B., Lavocat, F., Eljaafari, A., i Miossec, P. (2014). Effects of interleukin-17A on osteogenic differentiation of isolated human mesenchymal stem cells. *Frontiers in Immunology*, 5, 1–8.
- Ouryazdanpanah, N., Dabiri, S., Derakhshani, A., Vahidi, R., i Farsinejad, A. (2018). Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells: Growth Factor-Free Isolation, Molecular Characterization and Differentiation. *Iranian journal of pathology*, 13(4), 461–466.
- Park, I. H., Kim, K. H., Choi, H. K., Shim, J. S., Whang, S. Y., Hahn, S. J., Kwon, O. J., et al. (2013). Constitutive stabilization of hypoxia-inducible factor alpha selectively promotes the self-renewal of mesenchymal progenitors and maintains mesenchymal stromal cells in an undifferentiated state. *Experimental and Molecular Medicine*, 45(9), e44-11.
- Paul, J. (1958). Establishment of Permanent Cell Strains from Human Adult Peripheral Blood.

LITERATURA

- Nature*, 182, 808.
- Pennesi, G., Scaglione, S., Giannoni, P., i Quarto, R. (2011). Regulatory Influence of Scaffolds on Cell Behavior: How Cells Decode Biomaterials. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(2), 151–159.
- Petruzzelli, R., Christensen, D. R., Parry, K. L., Sanchez-Elsner, T., i Houghton, F. D. (2014). HIF-2 α regulates NANOG expression in human embryonic stem cells following hypoxia and reoxygenation through the interaction with an Oct-Sox Cis regulatory element. *PLoS ONE*, 9(10), 1–11.
- Pham, P. Van, i Vu, N. B. (2016). In vitro expansion of mesenchymal stem cells for clinical use. *Progress in Stem Cell*, 3(02), 87.
- Phinney, D. G. (2012). Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: Implications for cell therapy. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(9), 2806–2812.
- Phinney, D. G., i Sensebe, L. (2013). Mesenchymal stromal cells: Misconceptions and evolving concepts. *Cytotherapy*, 15(2), 140–145.
- Pietras, E. M., Warr, M. R., i Passequé, E. (2011). Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *Journal of Cell Biology*, 195(5), 709–720.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143–147.
- Polymeri, A., Giannobile, W. V., i Kaigler, D. (2016). Bone Marrow Stromal Stem Cells in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Hormone and Metabolic Research*, 48(11), 700–713.
- Prasajak, P., i Leeansaksiri, W. (2013). Developing a new two-step protocol to generate functional hepatocytes from Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under hypoxic condition. *Stem Cells International*, 2013.
- Prasanna, S. J., Gopalakrishnan, D., Shankar, S. R., i Vasandan, A. B. (2010). Pro-inflammatory cytokines, IFN γ and TNF α , influence immune properties of human bone marrow and Wharton jelly mesenchymal stem cells differentially. *PLoS ONE*, 5(2), e9016.
- Preston, S. L., Alison, M. R., Forbes, S. J., Direkze, N. C., Poulosom, R., i Wright, N. A. (2003). The new stem cell biology: something for everyone. *Molecular Pathology*, 56(2), 86–96.
- Prockop, D. J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276, 71–74.
- Pulukuri, S. M. K., Gorantla, B., Dasari, V. R., Gondi, C. S., i Rao, J. S. (2010). Epigenetic Upregulation of Urokinase Plasminogen Activator Promotes the Tropism of Mesenchymal Stem Cells for Tumor Cells. *Molecular Cancer Research*, 8(8), 1074–1083.
- Puranik, S. B., Nagesh, A., i Guttedar, R. S. (2012). Isolation of mesenchymal-like cells from Wharton's jelly of umbilical cord. *International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences*, 2(3), 218–224.
- Qian, Y., Liu, C., Hartupee, J., Altuntas, C. Z., Gulen, M. F., Jane-Wit, D., Xiao, J., et al. (2007). The adaptor Act1 is required for interleukin 17 - Dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nature Immunology*, 8(3), 247–256.
- Rachakatla, R. S., Marini, F., Weiss, M. L., Tamura, M., i Troyer, D. (2007). Development of

LITERATURA

- human umbilical cord matrix stem cell-based gene therapy for experimental lung tumors. *Cancer Gene Therapy*, 14(10), 828–835.
- Ramalho-Santos, M., i Willenbring, H. (2007). On the Origin of the Term “Stem Cell.” *Cell Stem Cell*, 1(1), 35–38.
- Reichel, C. A., Uhl, B., Lerchenberger, M., Puhr-Westerheide, D., Rehberg, M., Liebl, J., Khandoga, A., et al. (2011). Urokinase-type plasminogen activator promotes paracellular transmigration of neutrophils Via Mac-1, but independently of urokinase-type plasminogen activator receptor. *Circulation*, 124(17), 1848–1859.
- Ren, G., Chen, X., Dong, F., Li, W., Ren, X., Zhang, Y., i Shi, Y. (2012). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells and Translational Medicine: Emerging Issues. *Stem cells Translational Medicine*, 1(1), 51–58.
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., Zhao, R. C., et al. (2008). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*, 2(2), 141–150.
- Reppel, L., Margossian, T., Yaghi, L., Moreau, P., Mercier, N., Leger, L., Hupont, S., et al. (2014). Hypoxic Culture Conditions for Mesenchymal Stromal/Stem Cells from Wharton’s Jelly: A Critical Parameter to Consider in a Therapeutic Context. *Current Stem Cell Research and Therapy*, 9(4), 306–318.
- Rezniczek, G. A., Kumbruch, S., Scheich, J., Jensen, A., i Tempfer, C. B. (2016). Factors influencing yield and neuronal differentiation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood and matrix. *Regenerative Medicine*, 11(5), 465–474.
- Rickel, E. A., Siegel, L. A., Yoon, B.-R. P., Rottman, J. B., Kugler, D. G., Swart, D. A., Anders, P. M., et al. (2008). Identification of functional roles for both IL-17RB and IL-17RA in mediating IL-25-induced activities. *The journal of immunology*, 181, 4299–4310.
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., et al. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302(5651), 1704–1709.
- Riekstina, U., Cakstina, I., Parfejevs, V., Hoogduijn, M., Jankovskis, G., Muiznieks, I., Muceniece, R., et al. (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Reviews and Reports*, 5(4), 378–386.
- Ries, C., Egea, V., Karow, M., Kolb, H., Jochum, M., i Neth, P. (2007). MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*, 109(9), 4055–4063.
- Rippon, H. J. R., i Bishop, A. E. B. (2004). Embryonic stem cells. *Cell Prolif*, 37, 23–34.
- La Rocca, G., Anzalone, R., Corrao, S., Magno, F., Loria, T., Lo Iacono, M., Di Stefano, A., et al. (2009). Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochemistry and Cell Biology*, 131(2), 267–282.
- Rompolas, P., Mesa, K. R., i Greco, V. (2013). Spatial organization within a niche as a determinant of stem-cell fate. *Nature*, 502(7472), 513–518.
- Rosová, I., Dao, M., Capoccia, B., Link, D., i Nolta, J. A. (2008). Hypoxic Preconditioning Results in Increased Motility and Improved Therapeutic Potential of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 26(8), 2173–2182.

LITERATURA

- Roufosse, C. A., Direkze, N. C., Otto, W. R., i Wright, N. A. (2004). Circulating mesenchymal stem cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(4), 585–597.
- Rouvier, E., Luciani, M. F., Mattéi, M. G., Denizot, F., i Golstein, P. (1993). CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *Journal of immunology*, 150(12), 5445–56.
- Roy, S., Arora, S., Kumari, P., i Ta, M. (2014). A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Cryobiology*, 68(3), 467–472.
- Ruster, B., Ttig, S. G., Ludwig, R. J., Bistrrian, R., Ller, S. M., Seifried, E., Gille, J., et al. (2006). Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*, 108(12), 3938–3945.
- Scadden, D. T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441(7097), 1075–1079.
- Schmidt, A., Ladage, D., Steingen, C., Brixius, K., Schinköthe, T., Klinz, F. J., Schwinger, R. H. G., et al. (2006). Mesenchymal stem cells transmigrate over the endothelial barrier. *European Journal of Cell Biology*, 85(11), 1179–1188.
- Schofield R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4(1-2):7-25.
- Schroeder, T. (2010). Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity: Subtypes, Not Unpredictable Behavior. *Cell Stem Cell*, 6(3), 203–207.
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell*, 148(3), 399–408.
- Semenza, G., i Wang, G. (1992). A Nuclear Factor Induced by Hypoxia via De Novo Protein Synthesis Binds to the Human Erythropoietin Gene Enhancer at a Site Required for Transcriptional Activation. *Molecular and cellular biology*, 12(12), 5447–5454.
- Shi, M., Li, J., Liao, L., Chen, B., Li, B., Chen, L., Jia, H., et al. (2007). Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: Role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica*, 92(7), 897–904.
- Shi, Q., Gao, J., Jiang, Y., Sun, B., Lu, W., Su, M., Xu, Y., et al. (2017). Differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells into endometrial cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1), 246.
- Shi, Y., Ullrich, S. J., Zhang, J., Connolly, K., Grzegorzewski, K. J., Barber, M. C., Wang, W., et al. (2000). A Novel Cytokine Receptor-Ligand Pair. *Journal of Biological Chemistry*, 275(25), 19167–19176.
- Shin, J. H., Shin, D. W., i Noh, M. (2009). Interleukin-17A inhibits adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells and regulates pro-inflammatory responses in adipocytes. *Biochemical Pharmacology*, 77(12), 1835–1844.
- Sibov, T. T., Severino, P., Marti, L. C., Pavon, L. F., Oliveira, D. M., Tobo, P. R., Campos, A. H., et al. (2012). Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: Parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation. *Cytotechnology*, 64(5), 511–521.
- da Silva Meirelles, L., Caplan, A. I., i Nardi, N. B. (2008). In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 26(9), 2287–2299.

LITERATURA

- Sivanathan, K. N., Rojas-Canales, D. M., Hope, C. M., Krishnan, R., Carroll, R. P., Gronthos, S., Grey, S. T., et al. (2015). Interleukin-17A-Induced Human Mesenchymal Stem Cells Are Superior Modulators of Immunological Function. *Stem Cells*, 33(9), 2850–2863.
- Sobolewski, K., Małkowski, A., Bańkowski, E., i Jaworski, S. (2005). Wharton's jelly as a reservoir of peptide growth factors. *Placenta*, 26(10), 747–752.
- Sohni, A., i Verfaillie, C. M. (2013). Mesenchymal stem cells migration homing and tracking. *Stem Cells International*, 2013, 1–8.
- Son, B.-R., Marquez-Curtis, L. A., Kucia, M., Wysoczynski, M., Turner, A. R., Ratajczak, J., Ratajczak, M. Z., et al. (2006). Migration of Bone Marrow and Cord Blood Mesenchymal Stem Cells In Vitro Is Regulated by Stromal-Derived Factor-1-CXCR4 and Hepatocyte Growth Factor-c-met Axes and Involves Matrix Metalloproteinases. *Stem Cells*, 24(5), 1254–1264.
- Song, X., Zhu, S., Shi, P., Liu, Y., Shi, Y., Levin, S. D., i Qian, Y. (2011). IL-17RE is the functional receptor for IL-17C and mediates mucosal immunity to infection with intestinal pathogens. *Nature Immunology*, 12(12), 1151–1158.
- Spaeth, E., Klopp, A., Dembinski, J., Andreeff, M., i Marini, F. (2008). Inflammation and tumor microenvironments: Defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Therapy*, 15(10), 730–738.
- Squillaro, T., Peluso, G., i Galderisi, U. (2016). Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell transplantation*, 25(5), 829–48.
- Starnes, T., Broxmeyer, H. E., Robertson, M. J., i Hromas, R. (2002). Cutting Edge: IL-17D, a Novel Member of the IL-17 Family, Stimulates Cytokine Production and Inhibits Hemopoiesis. *The Journal of Immunology*, 169(2), 642–646.
- Starnes, T., Robertson, M. J., Sledge, G., Kelich, S., Nakshatri, H., Broxmeyer, H. E., i Hromas, R. (2001). Cutting Edge: IL-17F, a Novel Cytokine Selectively Expressed in Activated T Cells and Monocytes, Regulates Angiogenesis and Endothelial Cell Cytokine Production. *The Journal of Immunology*, 167(8), 4137–4140.
- Steingen, C., Brenig, F., Baumgartner, L., Schmidt, J., Schmidt, A., i Bloch, W. (2008). Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 44(6), 1072–1084.
- Stirling, G. A., i Kakkar, V. V. (1969). Cells in the circulating blood capable of producing connective tissue. *British Journal of Experimental Pathology*, 50(1), 51–55.
- Stubbendorff, M., Deuse, T., Hua, X., Phan, T. T., Bieback, K., Atkinson, K., Eiermann, T. H., et al. (2013). Immunological Properties of Extraembryonic Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Gestational Tissue. *Stem Cells and Development*, 22(19), 2619–2629.
- Subramanian, A., Fong, C. Y., Biswas, A., i Bongso, A. (2015). Comparative characterization of cells from the various compartments of the human umbilical cord shows that the Wharton's jelly compartment provides the best source of clinically utilizable mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*, 10(6), 1–25.
- Sun, D. Z., Abelson, B., Babbar, P., i Damaser, M. S. (2019). Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for regenerative urology. *Nature Reviews Urology*.
- Sun, Z., Chen, Y. H., Wang, P., Zhang, J., Gurewich, V., Zhang, P., i Liu, J. N. (2002). The blockage of the high-affinity lysine binding sites of plasminogen by EACA significantly inhibits prourokinase-induced plasminogen activation. *Biochimica et Biophysica Acta* -

LITERATURA

- Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1596(2), 182–192.
- Suzuki, N., Gradin, K., Poellinger, L., i Yamamoto, M. (2017). Regulation of hypoxia-inducible gene expression after HIF activation. *Experimental Cell Research*, 356(2), 182–186.
- Taghizadeh, R. R., Cetrulo, K. J., i Cetrulo, C. L. (2011). Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta*, 32, S311–S315.
- Taguchi, T., Cho, J. Y., Hao, J., Nout-Lomas, Y. S., Kang, K. S., i Griffon, D. J. (2018). Influence of hypoxia on the stemness of umbilical cord matrix-derived mesenchymal stem cells cultured on chitosan films. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B*, 106(2), 501–511.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., i Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872.
- Takahashi, K., i Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676.
- Takechi, K., Kuwabara, Y., i Mizuno, M. (1993). Ultrastructural and immunohistochemical studies of Wharton's jelly umbilical cord cells. *Placenta*, 14(2), 235–245.
- Tanaka, T., Wiesener, M., Bernhardt, W., Eckardt, K.-U., i Warnecke, C. (2009). The human HIF (hypoxia-inducible factor)-3 α gene is a HIF-1 target gene and may modulate hypoxic gene induction. *Biochemical Journal*, 424(1), 143–151.
- Tang, Y., Wu, X., Lei, W., Pang, L., Wan, C., Shi, Z., Zhao, L., et al. (2009). TGF- β 1-induced Migration of Bone Mesenchymal Stem Cells Couples Bone Resorption and Formation. *Nat Med*, 15(7), 757–765.
- Teo, G. S. L., Ankrum, J. A., Martinelli, R., Boetto, S. E., Simms, K., Sciuto, T. E., Dvorak, A. M., et al. (2012). Mesenchymal stem cells transmigrate between and directly through tumor necrosis factor- α -activated endothelial cells via both leukocyte-like and novel mechanisms. *Stem Cells*, 30(11), 2472–2486.
- Thomas, E. D., Lochte, H. L., Cannon, J. H., Sahler, O. D., i Ferrebee, J. W. (1959). Supralethal Whole Body Irradiation and Isologous Marrow Transplantation in Man. *Journal of Clinical Investigation*, 38(10), 1709–1716.
- Thomson, J A, Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., i Hearn, J. P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(17), 7844–8.
- Thomson, James A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., i Jeffrey M. Jones. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147.
- Till, J. E., i McCulloch, E. A. (1961). A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research*, 14(2), 213–222.
- Tipnis, S., Viswanathan, C., i Majumdar, A. S. (2010). Immunosuppressive properties of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Role of B7-H1 and IDO. *Immunology and Cell Biology*, 88(8), 795–806.
- Tögel, F., Hu, Z., Weiss, K., Isaac, J., Lange, C., i Westenfelder, C. (2005). Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *American Journal of Physiology-Renal*

LITERATURA

- Physiology*, 289(1), F31–F42.
- Tondreau, T., Meuleman, N., Delforge, A., Dejeneffe, M., Leroy, R., Massy, M., Mortier, C., et al. (2005). Mesenchymal Stem Cells Derived from CD133-Positive Cells in Mobilized Peripheral Blood and Cord Blood: Proliferation, Oct4 Expression, and Plasticity. *Stem Cells*, 23(8), 1105–1112.
- Tournadre, A., i Miossec, P. (2012). Interleukin-17 in inflammatory myopathies. *Current Rheumatology Reports*, 14(3), 252–256.
- Toy, D., Kugler, D., Wolfson, M., Vanden Bos, T., Gurgel, J., Derry, J., Tocker, J., et al. (2006). Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *Journal of immunology*, 177(1), 36–9.
- Trivanović, D., Jauković, A., Popović, B., Krstić, J., Mojsilović, S., Okić-Djordjević, I., Kukolj, T., et al. (2015). Mesenchymal stem cells of different origin: Comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression. *Life Sciences*, 141, 61–73.
- Trivanović, D., Kocić, J., Mojsilović, S., Krstić, A., Ilić, V., Okić Djordjević, I., Francisco Santibanez, J., et al. (2013). Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's Jelly. *Srpski Arhiv za Celokupno Lekarstvo*, 141(3–4), 178–186.
- Troyer, D. L., i Weiss, M. L. (2008). Concise Review: Wharton's Jelly-Derived Cells Are a Primitive Stromal Cell Population. *Stem Cells*, 26(3), 591–599.
- Tsai, C.-C., i Hung, S.-C. (2012). Functional roles of pluripotency transcription factors in mesenchymal stem cells. *Cell Cycle*, 11(20), 3711–2.
- Tsai, M. S., Lee, J. L., Chang, Y. J., i Hwang, S. M. (2004). Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human Reproduction*, 19(6), 1450–1456.
- Tsai, P. J., Wang, H. S., Lin, G. J., Chou, S. C., Chu, T. H., Chuan, W. T., Lu, Y. J., et al. (2015). Undifferentiated Wharton's jelly mesenchymal stem cell transplantation induces insulin-producing cell differentiation and suppression of T-cell-mediated autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Cell Transplantation*, 24(8), 1555–1570.
- Uccelli, A., Moretta, L., i Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews Immunology*, 8, 726–736.
- De Ugarte, D. A., Alfonso, Z., Zuk, P. A., Elbarbary, A., Zhu, M., Ashjian, P., Benhaim, P., et al. (2003). Differential expression of stem cell mobilization-associated molecules on multi-lineage cells from adipose tissue and bone marrow. *Immunology Letters*, 89(2–3), 267–270.
- Vallabhaneni, K. C., Tkachuk, S., Kiyani, Y., Shushakova, N., Haller, H., Dumler, I., i Eden, G. (2011). Urokinase receptor mediates mobilization, migration, and differentiation of mesenchymal stem cells. *Cardiovascular Research*, 90(1), 113–121.
- Vassalli, J.-D., Sappino, A.-P., i Bein, D. (1991). The Plasminogen Activator/Plasmin System. *Journal of Clinical Investigation*, 88(October), 1067–1072.
- Venugopal, P., Balasubramanian, S., Majumdar, A. Sen, i Ta, M. (2011). Isolation, characterization, and gene expression analysis of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells under xeno-free culture conditions. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 4(1), 39–50.

LITERATURA

- Via, A. G., Frizziero, A., i Oliva, F. (2012). Biological properties of mesenchymal Stem Cells from different sources. *Muscles, ligaments and tendons journal*, 2(3), 154–62.
- Vishwakarma, A., Rouwkema, J., Jones, P. A., i Karp, J. M. (2017). The Need to Study, Mimic, and Target Stem Cell Niches. U A. Vishwakarma i J.M. Karp, *Biology and Engineering of Stem Cell Niches* (pp. 3–13). Elsevier Inc.
- Wagers, A. J. (2012). The stem cell niche in regenerative medicine. *Cell Stem Cell*, 10(4), 362–369.
- Walczak, P., Zhang, J., Gilad, A. A., Kedziorek, D. A., Ruiz-Cabello, J., Young, R. G., Pittenger, M. F., et al. (2008). Dual-Modality Monitoring of Targeted Intraarterial Delivery of Mesenchymal Stem Cells After Transient Ischemia. *Stroke.*, 39(5), 156–1574.
- Wan, C., He, Q., i Li, G. (2006). Allogenic Peripheral Blood Derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Enhance Bone Regeneration in Rabbit Ulna Critical-Sized Bone Defect Model. *Journal of Orthopaedic Research September, 24*, 610–618.
- Wang, G. L., Jiang, Bi.-H., Rue, E. A., i Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92(4), 5510–5514.
- Wang, G. L., i Semenza, G. L. (1993). General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(9), 4304–8.
- Wang, G. L., i Semenza, G. L. (1995). Purification and characterization of HIF-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(3), 1230–1237.
- Wang, H.-S., Hung, S.-C., Peng, S.-T., Huang, C.-C., Wei, H.-M., Guo, Y.-J., Fu, Y.-S., et al. (2004). Mesenchymal Stem Cells in the Wharton's Jelly of the Human Umbilical Cord. *Stem Cells*, 22(7), 1330–1337.
- Wang, L., Zhao, Y., i Shi, S. (2012). Interplay between mesenchymal stem cells and lymphocytes: Implications for immunotherapy and tissue regeneration. *Journal of Dental Research*, 91(11), 1003–1010.
- Wang, Lei, Li, Y., Chen, X., Chen, J., Gautam, S. C., Xu, Y., i Chopp, M. (2002). MCP-1, MIP-1, IL-8 and ischemic cerebral tissue enhance human bone marrow stromal cell migration in interface culture. *Hematology*, 7(2), 113–117.
- Wang, T., Liu, H., Ning, Y., i Xu, Q. (2014). The histone acetyltransferase p300 regulates the expression of pluripotency factors and odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *PLoS ONE*, 9(7).
- Wang, Y., Johnsen, H. E., Mortensen, S., Bindslev, L., Sejersten Ripa, R., Haack-Sørensen, M., Jørgensen, E., et al. (2006). Changes in circulating mesenchymal stem cells, stem cell homing factor, and vascular growth factors in patients with acute ST elevation myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention. *Heart*, 92(6), 768–774.
- Warnecke, C., Zabrowska, Z., Kurreck, J., Erdmann, V. A., Frei, U., Wiesner, M., i Eckardt, K.-U. (2004). Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells. *The FASEB Journal*, 18(12), 1462–1464.
- Watson, N., Divers, R., Kedar, R., Mehindru, A., Mehindru, A., Borlongan, M. C., i Borlongan, C. V. (2015). Discarded Wharton jelly of the human umbilical cord: A viable source for mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 17(1), 18–24.

LITERATURA

- Weiss, M. L., Anderson, C., Medicetty, S., Seshareddy, K. B., Weiss, R. J., VanderWerff, I., Troyer, D., et al. (2008). Immune Properties of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly-Derived Cells. *Stem Cells*, 26(11), 2865–2874.
- Wenger, R. H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB journal*, 16, 1151–1162.
- Wexler, S. A., Donaldson, C., Denning-Kendall, P., Rice, C., Bradley, B., i Hows, J. M. (2003). Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal “stem” cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *British Journal of Haematology*, 121(2), 368–374.
- Widowati, W., Wijaya, L., Bachtiar, I., Gunanegara, R. F., Sugeng, S. U., Irawan, Y. A., Sumitro, S. B., et al. (2014). Effect of oxygen tension on proliferation and characteristics of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Biomarkers and Genomic Medicine*, 6(1), 43–48.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., i Campbell, K. H. S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385, 810–813.
- Wilson A. Silva, J., Dimas T. Covas, Panepucci, R. A., Proto-Siqueira, R., Siufi, J. L. C., Zannette, D. L., Santos, A. R. D., et al. (2003). The Profile of Gene Expression of Human Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 21, 661–669.
- Wolf, K., i Friedl, P. (2011). Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration. *Trends in Cell Biology*, 21(12), 736–744.
- Wright, J. F., Bennett, F., Li, B., Brooks, J., Luxenberg, D. P., Whitters, M. J., Tomkinson, K. N., et al. (2008). The human IL-17F/IL-17A heterodimeric cytokine signals through the IL-17RA/IL-17RC receptor complex. *The journal of immunology*, 181(4), 2799–805.
- Wynn, R. F., Hart, C. A., Corradi Perini, C., O'Neill, L., Evans, C. A., Wraith, J. E., Leslie J, F., et al. (2004). A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood*, 104(9), 2643–2645.
- Xing, X., Yang, J., Yang, X., Wei, Y., Zhu, L., Gao, D., i Li, M. (2013). IL-17A induces endothelial inflammation in systemic sclerosis via the ERK signaling pathway. *PLoS ONE*, 8(12), 1–10.
- Xu, L., i Li, G. (2014). Circulating mesenchymal stem cells and their clinical implications. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2(1), 1–7.
- Yamamoto, Y., Fujita, M., Tanaka, Y., Kojima, I., Kanatani, Y., Ishihara, M., i Tachibana, S. (2013). Low Oxygen Tension Enhances Proliferation and Maintains Stemness of Adipose Tissue-Derived Stromal Cells. *BioResearch Open Access*, 2(3), 199–205.
- Yao, Z, Painter, S. L., Fanslow, W. C., Ulrich, D., Macduff, B. M., Spriggs, M. K., i Armitage, R. J. (1995). Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *Journal of immunology*, 155(12), 5483–6.
- Yao, Zhengbin, Fanslow, W. C., Seldin, M. F., Rousseau, A. M., Painter, S. L., Comeau, M. R., Cohen, J. I., et al. (1995). Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity*, 3(6), 811–821.
- Yi Liu, Songlin Wang, i Songtao Shi. (2012). The Role of Recipient T Cells in Mesenchymal Stem Cell-Based Tissue Regeneration. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 44(11), 2044–2050.

LITERATURA

- Yoon, J. J. H., Roh, E. Y. E., Shin, S., Jung, N. N. H., Song, E. Y., Chang, J. Y., Kim, B. J., et al. (2013). Comparison of Explant-Derived and Enzymatic Digestion-Derived MSCs and the Growth Factors from Wharton's Jelly. *BioMed research international*, 2013, 428726.
- Yue, J., Zhang, K., i Chen, J. F. (2012). Role of integrins in regulating proteases to mediate extracellular matrix remodeling. *Cancer Microenvironment*, 5(3), 275–283.
- Zepp, J. A., Liu, C., Qian, W., Wu, L., Gulen, M. F., Kang, Z., i Li, X. (2012). Cutting Edge: TNF Receptor-Associated Factor 4 Restricts IL-17-Mediated Pathology and Signaling Processes. *The Journal of Immunology*, 189(1), 33–37.
- Zhang, C. P., i Fu, X. B. (2008). Therapeutic potential of stem cells in skin repair and regeneration. *Chinese Journal of Traumatology - English Edition*, 11(4), 209–221.
- Zhang, Y.-N., Lie, P.-C., i Wei, X. (2009). Differentiation of mesenchymal stromal cells derived from umbilical cord Wharton's jelly into hepatocyte-like cells. *Cytotherapy*, 11(5), 548–558.
- Zhou, S., Lechpammer, S., Greenberger, J. S., i Glowacki, J. (2005). Hypoxia inhibition of adipocytogenesis in human bone marrow stromal cells requires transforming growth factor- β /Smad3 signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 280(24), 22688–22696.
- Zhu, S., Pan, W., Shi, P., Gao, H., Zhao, F., Song, X., Liu, Y., et al. (2010). Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis through TRAF3-mediated suppression of interleukin 17 receptor signaling. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(12), 2647–2662.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., et al. (2001). Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue engineering*, 7(2), 211–228.
- Zvaifler, N. J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C. J., Moss, J., Burger, J. A., i Maini, R. N. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res*, 2, 477–488.

PRILOG- SPISAK SKRAĆENICA

ACT1 (od engl. *activator 1*) – aktivator 1

ALP (od engl. *alkaline phosphatase*)- alkalna fosfataza

BCIP/NBT- (*5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/p-nitroblue tetrazolium chloride*)-
hromogen za alkalnu fosfatazu

bFGF (od engl. *basic fibroblast growth factor*) – bazični faktor rasta fibroblasta

bHLH (od engl. *helix-loop-helix*) -bazični heliks-petlja-heliks

BSA (od engl. *bovine serum albumine*) – albumin goveđeg seruma

CCL- hemokin (C-C motiv) ligand

CCR-C-C hemokinski receptor

cDNK (od engl. *complementary DNA*) – DNK komplementarna molekulu RNK

CFE (od engl. *colony forming efficiency*) – efikasnost formiranja kolonija

CFU (od engl. *colony-forming unit*)- jedinica formiranja kolonija

CFU-F (od engl. *colony-forming unit- fibroblast*)- jedinica formiranja kolonija-
fibroblast

CTLA-8 (od engl. *cytotoxic T lymphocyte antigen 8*)- antigen citotoksičnih T limfocita

CXCR- receptor za C-X-C hemokine

DAPI- 4',6-diamidin-2-fenilindol

DMEM (od engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)- medijum za kultivaciju ćelija

DMSO- dimetil sulfoksid

E-ACA- ε-amino kapronska kiselina, inhibitor proteaza

ECGS (od engl. *endothelial cell growth supplement*)- suplement za rast endotelskih
ćelija

ECL (od engl. *enhanced chemiluminescence reagent system*)- sistem reagensa za
pojačanu hemiluminiscencu

EDTA (od engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) - etilendiamintetrasirćetna kiselina

EGF (od engl. *endothelial growth factor*)- endotelski faktor rasta

EM- endotelske ćelije

EMĆ- embrionalne matične ćelije

EPO- eritropoetin

ERK (od engl. *extracellular signal-regulated kinases*) – kinaze regulisane vanćelijskim signalima

FBS (od engl *Fetal Bovine Serum*)- fetalni goveđi serum

FIH-1 (od engl *factor-inhibiting HIF-1*) – faktor koji inhibira HIF

FITC- fluorescein izotiocijanat

GAPDH- gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza

G-CSF (od engl. *granulocyte-colony stimulating factor*) faktor stimulacije kolonije granulocita

GVHD (od engl. *graft versus host disease*) – bolest „kalem protiv domaćina“

HGF (od engl *hepatocyte growth factor*)- faktor rasta hepatocita

HIF (od engl. *hypoxia-inducible factor*) - faktor indukovan hipoksijom

HLA (od engl. *human leukocyte antigen*)- humani leukocitni antigen

HMĆ- hematopoetske matične ćelije

HRE (od engl, *hypoxia response elements*) – elementi u genomu responsivni na hipoksiju

HRP (od engl. *horseradish peroxidase*) - peroksidaza rena

hUVEC (od engl, *human umbilical vein endothelial cell*) – humane endotelske ćelije vene pupčanika

IBMX- 3-izobutil-1-metilksantin

ICAM- (od engl. *intercellular adhesion molecule 1*)- unutarćelijski adhezivni molekul

IDO- indolamin 2,3-dioksigenaza

IF- imunofluorescenca

IGF (od engl. *insulin-like growth factor*)- insulinu sličan faktor rasta

IKK- IκB kinaza

IL- interleukin

iNKT- invarijantne NKT ćelije

IPMĆ- indukovane pluripotentne matične ćelije

iRNK- informaciona RNK

IVF- veštačka *in vitro* fertilizacija

KS-MMĆ- matične ćelije kostne srži

LPL-lipoproteinska lipaza

MAPK (od engl. *mitogen-activated protein kinase*) - mitogenom aktivirana proteinska kinaza

MCPI-1 (od engl. *Monocyte chemotactic protein-1*)- hemoatraktantni protein monocita-1

MĆ- matične ćelije

MHC (od engl. *major histocompatibility complex*) - glavni kompleks histokompatibilnosti

MIF (od engl. *macrophage migration inhibitory factor*) - inhibitorni faktor migracije makrofaga

MMĆ- mezenhimske matične ćelije

MMP- matriksna metaloproteinaza

MNĆ- mononuklearne ćelije

MT-1 MMP - membranski tip MMP

MTOC (od engl. *microtubule organizing center*) - centar organizacije mikrotubula

MTT – 3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5 difenil-tetrazolijum bromid

NFκB – nuklearni faktor κB; transkripcioni faktor

NK ćelije (od engl. *Natural killer cells*) – prirodne ćelije ubice

Ocn (od engl. *Osteocalcin*) – osteokalcin, transkripcioni faktor uključen u osteogenu diferencijaciju

ODD domen (od engl. *oxygen-dependent degradation*) - domen za degradaciju koji je zavisao od O₂

OPN- osteopontin

PAI1 (od engl. *Plasminogen Activator Inhibitor-1*) – inhibitor aktivatora plazminogena-1

PAS (od engl. *periodic-aryl hydro- carbon receptor nuclear translocator-single-minded*, Per–Arnt–Sim) – domen HIF transkripcionog faktora

PBS (od engl. *Phosphate Buffer Saline*) – fiziološki rastvor puferovan fosfatnim puferom

PCR (od engl. *Polymerase Chain Reaction*) – reakcija lančanog umnožavanja

PC- protočna citometrija

PDL-1 (od engl. *programmed death ligand 1*) – ligand programirane smrti-1

PDGF (od engl. *platelet-derived growth factor*)- faktor rasta krvnih pločica

PDT (od engl. *population doubling time*)- vreme dupliranja ćelijske populacije

PE (od engl. *Phycoerythrin*) -fikoeritrin

PGE2- prostaglandin E2

PHD (od engl. *prolyl hydroxylase protein*) - prolil-hidroksilaza

PI (od engl. *Propidium Iodide*)- propidijum- jodid

PI-3K- PI-3 kinaza

PMSF (od engl. *phenylmethanesulphonylfluoride*) – fenil metan sulfonil fluorid

pNPP- p-nitrofenil fosfat

PPAR γ -(od engl. *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*)- transkripcioni faktor uključen u adipogenu diferencijaciju

Q-RT-PCR- kvantitativni RT-PCR

RIPA (od engl. *Radioimmunoprecipitation buffer*) – pufer za lizu ćelija za izolaciju membranskih i citosolnih proteina

RNK – ribonukleinska kiselina

RT-PCR (od engl. *Reverse-transcriptase Polymerase chain reaction*)- reversno transkriptazna lančana reakcija umnožavanja

Runx2/Cbfa1 (od engl. *Runt-related transcription factor 2/Core-binding factor subunit alpha-1*) – transkripcioni faktor uključen u regulaciju osteogene diferencijacije

SDS (od engl. *Sodium Dodecyl Sulphate*) – natrijum dodecil sulfat

SDS-PAGE (od engl. *Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*)

- SDS-poliakrilamidna gel elektroforeza

SDF-1 (od engl. *stromal cell derived factor*)- faktor stromalnih ćelija

SEFIR (od engl. *similar expression of fibroblast growth factor genes and IL-17Rs*, SEF/IL-17R) – motiv u intraćelijskom domenu IL-17R, homolog TIR familiji receptora

SEM- standardna greška

TAD- transaktivacioni domen

TAE- Tris-acetatni-EDTA puffer

TBS (engl. *Tris-Buffered Saline*) - fiziološki rastvor puferovan Tris-om

TGF- β (od engl. *transforming growth factor β*)- faktor transformacije rasta- β

Th (od engl. *T helper*)– pomoćničke T ćelije

TILL (od engl. *TIR-like loop*) – petlja nalik TIR, C-terminalni region SEFIR domena IL-17R koji pokazuje sličnost sa TIR domenom

TIMP- inhibitor metaloproteinaze

TLR (od engl. *toll-like receptor*) – receptor nalik *toll*-u

TNF- α (od engl. *tumor necrosis factor- α*)- faktor nekroze tumora- α

TPA (od engl. *tissue plasminogen activator*) aktivator plazminogena

TRAF (od engl. *TNFR-associated factor*) - faktori povezani sa TNFR

TRITC- tetrametilrodamin

TSG-6 (od engl. *tumor necrosis factor-inducible gene- 6*) -TNF inducibilni gen-6

TTBS- Tween-20 u TBS-u

uPA (od engl. *urokinase-type plasminogen activator*) - urokinaza, aktivator plazminogena

uPAR- receptor za uPA

VCAM-1 (od engl. *vascular cell adhesion protein 1*) –vaskularni ćelijski adhezivni molekul-1

VM- vanćelijski matriks

VEGF (od engl. *vascular endothelial growth factor*) – vaskularni endotelni faktor rasta

VHL- Von Hippel–Lindau protein, E3 ubikvitin- ligaza

VLA-4 (od engl. *very late antigen-4*)- integrin T limfocita

VS- Vartonova sluz

VS-MMĆ- mezenhimske matične ćelije vartonove sluzi

WB- *western blot*

α -SMA (od engl. *α -smooth muscle actin*) – aktin mišićnih ćelija

BIOGRAFIJA AUTORA

Hristina N. Obradović rođena je 26. juna 1988. godine u Aleksandrovcu, Republika Srbija. Gimnaziju je završila 2007. godine u Aleksandrovcu i iste godine upisala Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu. Osnovne studije završila je 2010. godine na studijskom programu Molekularna biologija i fiziologija sa prosečnom ocenom 9,56. Master studije na istom studijskom programu, smer Eksperimentalna biomedicina završila je 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,38 odbranivši master tezu sa temom „Uticaj agenasa modifikovanih azot monoksidom, GIT-27NO i Sakvinavir-NO, na rast ćelijske linije humane promijelocitne leukemije HL60 i ćelija osoba obolelih od akutne mijeloidne leukemije“ sa ocenom 10. Doktorske studije upisala je na Biološkom fakultetu 2012. godine na studijskom programu Molekularna biologija eukariota, pri čemu je položila sve programom predviđene ispite. Angažovana je na Institutu za medicinska istraživanja u Laboratoriji za eksperimentalnu hematologiju i matične ćelije od 2012. na projektu „Regenerativni i modulatorni potencijal adultnih matičnih ćelija“, kao istraživač stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, a 2015. godine izabrana je u istraživača saradnika. Od 2016. godine zaposlena je na Institutu za medicinska istraživanja u okviru istog projekta.

Učestvovala je u bilateralnom projektu sa republikom Austrijom i u aktivnostima *CellFit* i *SPRINT COST* akcija. Do sada je u saradnji sa drugim autorima objavila 21 bibliografsku jedinicu. Ukupan broj objavljenih naučnih radova štampanih u celini je 14, od čega su 6 radova u vrhunskim časopisima međunarodnog značaja (M21), 5 radova u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), 1 rad u časopisu međunarodnog značaja (M23) i 2 rada u naučnim časopisima nacionalnog značaja (M53). Prvi autor je u 3 rada, a objavila je i 7 radova saopštenih na međunarodnim i domaćim skupovima i štampanih u izvodu (M34, M64).

Dobitnik je grupne nagrade »Dr Jovan Vučo« Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu za najbolji naučno-istraživački rad grupe istraživača 2015. godine za rad objavljen u časopisu *Biochim Biophys Acta*.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана **Христина Н. Обрадовић**

број индекса **M3009/2012**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Функционална карактеризација примарних мезенхимских матичних ћелија у проинфламаторним и условима измењене оксигенације

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора **Христина Н. Обрадовић**

Број индекса **М3009/2012**

Студијски програм **Молекуларна биологија еукариота**

Наслов рада **Функционална карактеризација примарних мезенхимских
матичних ћелија у проинфламаторним и условима измењене оксигенације**

Ментори **Др Гордана Матић**, редовни професор,
Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Др Диана Бугарски, научни саветник,
Институт за медицинска истраживања,
Универзитет у Београду

Потписана **Христина Н. Обрадовић**

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Функционална карактеризација примарних мезенхимских матичних ћелија у проинфламаторним и условима измењене оксигенације

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____
