

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ



ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



Биљана Т. Љујић

**ИСПИТИВАЊЕ УЛОГЕ И ЗНАЧАЈА STAT3 МОЛЕКУЛА И
ХУМАНИХ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА У
ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ ТУМОРА ДОЈКЕ**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

КРАГУЈЕВАЦ 2013.

Двојици Томислава

Хвала,

мојој породици, посебно Вешку на несебичној подршци током израде овог рада.

Захваљујем се,

проф. др Миодрагу Стојковићу, ментору, на уложеном труду и поверењу.

Захваљујем се,

проф. др Небојши Арсенијевићу и проф. др Миодрагу Лукићу, на несебичном залагању у реализацији тезе, уложеном труду и поверењу.

Захваљујем се,

Марији Миловановић и Владиславу Воларевићу, на колегијалности, подршци и помоћи током израде овог рада.

Хвала Миљану Недељковићу, за графичку обраду.

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. Онкогенеза и прогресија тумора дојке.....	1
1.1.1. Експериментални 4Т1 модел карцинома дојке.....	2
1.2.1. Структурне особине и физиолошка улога STAT молекула.....	3
1.2.2. Улога STAT3 молекула у онкогенези.....	4
1.2.3. Улога STAT3 у расту и метастазирању тумора дојке.....	5
1.3.1. Биологија мезенхималних матичних ћелија и њихова физиолошка улога.....	6
1.3.2. <i>In vitro</i> карактеристике мезенхималних матичних ћелија.....	7
1.3.3. <i>In vitro</i> диференцијација мезенхималних матичних ћелија.....	11
1.3.4. Утицај мезенхималних матичних ћелија на ћелије имунског система.....	11
1.3.5. Значај и улога мезенхималних матичних ћелија у туморској микросредини.....	19
1.4.1. Имунски одговор на туморске ћелије.....	26
1.4.2. Имунски одговор на ћелије тумора дојке.....	28
2. ЦИЉ РАДА	30
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	31
3.1. Лабораторијске животиње.....	31
3.2. Ћелијска линија мишјег тумора дојке (4Т1).....	31
3.3. Ћелијска линија хуманих мезенхималних матичних ћелије (hMSC).....	31
3.4. Индукција примарног тумора дојке.....	32
3.4.1. Експреименталне групе.....	33
3.4.2. Одређивање величине примарног тумора.....	33
3.4.3. Хистолошка анализа метастаза.....	34

3.5. Изолација ДНК хуманог порекла реакцијом ланчане полимеризације.....	34
3.6. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)	36
3.7. Имунохистохемијска детекција митохондријалних маркера хуманог порекла	37
3.8. Имунохистохемијско одређивање експресије STAT3 молекула у туморском ткиву.....	37
3.9. Семи-квантитативно одређивање броја и величине метастатских колонија	38
3.10. Изолација леукоцита из слезине	39
3.11.Анализа популација моноклеарних ћелија слезине проточном цитометријом.....	40
3.11.1. Обележавање ћелијских мембранских маркера	40
3.12. Интрацелуларно бојење цитокина	42
3.12.1. Стимулација ћелија	43
3.12.2. Бојење површинских антигена	43
3.12.3. Фиксација ћелија и пермеабилитација ћелијске мембране	43
3.12.4. Бојење интрацелуларних цитокина	44
3.13. Интрацелуларно бојење транскрипционих фактора Foxp3	44
3.14. Изолација ефекторских ћелија слезине	45
3.14.1. Негативно селекционисање CD8 ⁺ T лимфоцита помоћу магнетних куглица	45
3.14.2. Позитивно селекционисање NK ћелија помоћу магнетних куглица	46
3.15. МТТ тест цитотоксичности.....	47
3.16. Мерење серумске концентрације IL-4, IL-10, TGF-β, IFN-γ, IL-17 и TNF-α	48
3.17. Статистичка обрада података	50

4. РЕЗУЛТАТИ	51
4.1. Интравенска апликација hMSC поспешује раст примарног тумора дојке на дозно зависан начин	51
4.2. hMSC одлазе у туморско ткиво и удаљене органе и у неким од њих опстају и до 35-ог дана.....	54
4.3. Системска администрација hMSC поспешује раст метастатских колонија.....	56
4.4. На експресију STAT3 молекула у туморском ткиву не утичу инјектиране hMSC	58
4.5. Интравенска апликација hMSC не мења укупну целуларност слезине али утиче на нумеричке односе лимфоцитних популација и субпопулација.....	59
4.6. Интравенска апликација hMSC смањује цитотоксичку активност укупних спленоцита, NK ћелија и CD8 ⁺ Т лимфоцита	68
4.7. Системска администрација hMSC повећава ниво Th2 цитокина у серуму током антитуморског имунског одговора	70
4.8. hMSC мењају нумерички однос IL-10 ⁺ /IFN- γ ⁺ CD4 ⁺ , тако што повећавају број IL-10 ⁺ CD4 ⁺ Т лимфоцита у слезини.....	72
4.9.1. hMSC не мењају удео IL-17 ⁺ и TNF- α ⁺ продукујућих CD4 ⁺ спленоцита.....	76
5. ДИСКУСИЈА	79
5.1. hMSC мигрирају у тумор, опстају у удаљеним органима и промовишу раст тумора и метастазирање на дозно зависан начин	80
5.2. Интравенски апликоване hMSC не мењају степен фосфорилације STAT3 у примарном тумору	83
5.3. Интравенска апликација hMSC смањује процентуални удео NKT-like ћелија док истовремено повећава заступљеност Т регулаторних лимфоцита у слезини не мењајући укупну целуларност слезине.....	85
5.4. Интравенска апликација hMSC смањује цитотоксичку активност укупних спленоцита, CD8 ⁺ Т лимфоцита и NK ћелија.....	89
5.5. Интравенски апликоване hMSC убрзавају раст експерименталног тумора дојке креирањем имуносупресивне средине	92

6. ЗАКЉУЧЦИ	97
СКРАЋЕНИЦЕ	98
7. ЛИТЕРАТУРА	101
8. ПРИЛОГ	148
8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА	148
8.2. KEY WORD DOCUMENTATION	153
8.3. БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА	157
8.4. СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА.....	158
8.5. THE LIST OF PUBLISHED PAPERS	161
8.6. ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ.....	164

1. УВОД

Предмет овог рада су истраживања утицаја хуманих мезенхималних матичних ћелија на експресију *STAT3* гена у туморском ткиву и на прогресију експерименталног тумора дојке.

У уводном делу, пре описивања и дискусије добијених резултата, приказани су општи аспекти канцерогенезе, биолошки ефекти експресије *STAT3* гена и хуманих мезенхималних матичних ћелија, као и механизми имунског одговора на тумор који могу бити од значаја за разматрање наших резултата.

1.1. Онкогенеза и прогресија тумора дојке

У основи карцинома налазе се промене у генетском материјалу, које могу настати дејством физичких, хемијских или биолошких агенаса. Удруживање генетских дефеката ремети многобројне путеве регулације пролиферације, диференцијације, ћелијске смрти и механизма за поправку ДНК (енгл. *geraige*), што све може водити у онкогенезу (1).

Онкогенеза карцинома дојке је мултистепенни процес генетских и фенотипских промена, које су узрок прогресије карцинома дојке. Основне фазе онкогенезе карцинома дојке су:

а) **предиспонирајући генетски ризик**: под појмом генетски ризик се подразумевају дефекти у ДНК *repair* механизмима и апоптози, настали услед промена у тумор-супресорним генима *BRCA1*, *BRCA2* и *TP53* (2).

б) **хиперплазија** настаје прекомерном стимулацијом ћелијског циклуса и супресијом апоптозе под утицајем хормона и фактора раста (3-5). Осим пролиферативних сигнала за настанак хиперплазије, неопходна је и имортализација услед прекомерне експресије теломеразе (6).

в) **карцином *in situ*** карактеришу мутације гена (*c-ERBB2*, *c-MYC*, *CCDN1*, *RB-1*) чији су производи укључени у трансдукцију сигнала насталих дејством фактора раста и стероидних хормона и гена (*P53*) чији су производи важни за ћелијску смрт као и изражена хромозомска нестабилност (7-9).

д) **метастазирање**: поред већ описаних карактеристика малигнух ћелија (промене регулације ћелијског циклуса, ћелијске смрти, секрецији фактора раста, *repaire* ситема) метастатске ћелије су способне да индукују неоангиогенезу што уз промене експресије гена (*CDH-1* кодира E-cadherin) важних за инвазију и успешну колонизацију удаљених ткива доприноси успостављању и ширењу метастаза (10).

1.1.1. Експериментални 4T1 модел карцинома дојке

Убризгавање туморских ћелија линије 4T1 мишицама представља добар модел за истраживање карцинома дојке. Ова линија, добијена из спонтано насталог тумора дојке BALB/С миша (11), представља анимални модел IV стадијума хуманог карцинома дојке. Ћелије се могу инокулисати директно у масно јастуче млечне жлезде (инјекцијом), интравенски кроз репну вену, интратереријски катетеризацијом десне каротидне артерије или ињекцијом у леву преткомору. Након убризгавања **директно у ткиво дојке**, 4T1 ћелије расту брзо формирајући примарни тумор и дају метастазе у плућима, јетри, костима и мозгу у периоду од 3 до 6 недеља након инокулисања (хематогени пут ширења тумора; (11-17). Иако доминантно ове туморске ћелије метастазирају хематогеним путем, остали путеви метастазирања нису искључени. У експериментима са истом ћелијском линијом, након индукције примарног тумора у млечну жлезду, туморске ћелије се детектују знатно чешће у крви него у дренажујућем лимфном систему (11). У овом моделу прве метастазе се детектују у ткиву плућа (од 7 до 14-ог дана), док се у јетри појављују касније (од 21 до 28-ог дана). Метастатске колоније у мозгу детектабилне су најраније 35-ог дана (11). Метастазирање 4T1 тумора по свему судећи почиње од плућа и дренажујућих лимфних чворова а наставља се метастазама у јетри и мозгу (11, 14). Редослед настанка метастаза у свему је сличан хуманом карциному дојке, а 4T1 линија је једна од ретких која даје и метастазе у костима (14, 15). После убризгавања 4T1 ћелија **кроз репну вену или каротиду**, редослед метастазирања је идентичан али се метастазирање одиграва брже у периоду од једне до две недеље. Како су ћелије 4T1 тумора сингене са BALB/С мишевима, овај модел се користи и за испитивање улоге имунског система у расту и метастазирању карцинома дојке (14).

1.2.1. Структурне особине и физиолошка улога STAT молекула

STAT протеини (енгл. Signal Transducer and Activator of Transcription) припадају фамилији транскрипционих фактора, велики су од 750 до 800 аминокиселинских остатака који садрже Src хомологе 2 домене (SH2) а на карбокси крају садрже тирозинске остатке подложне фосфорилизацији. Редослед аминокиселина између 400-ог и 500-ог места у молекулу STAT одређују специфичност везивања за тачно одређене делове ДНК (18), а за ДНК се везује својим N-терминусом (19), након активирања STAT молекула фосфорилацијом услед које ови протеини димеризују, транслоцирају се у једро и везују за промоторе циљаних гена (20, 21). До данас је, код миша, идентификовано седам чланова STAT фамилије (22). Гени који кодирају STAT протеине, налазе се на три различита хромозома: *STAT1* и *STAT4* гени су спојени и налазе се на хромозому 1, *STAT2* и *STAT6* су такође спојени и налазе се на хромозому 10, док су *STAT3*, *STAT5a* и *STAT5b* мапирани на 11-ом хромозому. Ови подаци показују да су генски локуси за STAT протеине настали тандемским дупликацијама анцестралног локуса (вероватно локуса на хромозому 11 у ком се налазе гени за *STAT3* и *STAT5*), а потом дисперзијом повезаних локуса на различите хромозоме (22).

Иако неки цитокини и фактори раста могу да активирају више STAT протеина, неки STAT протеини се активирају на специфичан начин и посредују у испољавању биолошких одговора тачно одређених цитокина (21). Потенцијална улога STAT сигналног пута огледа се у контроли ћелијског циклуса и апоптозе. *STAT1* имају важну улогу у испољавању биолошких одговора на интерфероне, као што су антивирусни, антипролиферативни и имунски одговор (23, 24). *STAT2* протеини такође посредују у испољавању биолошких функција интерферона- α и - β али не и интерферона- γ (25). *STAT4* и *STAT6* су есенцијални за Th1 односно Th2 одговор (26, 27). *STAT5* се састоји од два врло слична гена која кодирају *STAT5a* и *STAT5b* протеине, који су хомолози у 96% аминокиселина (28). *STAT5a* има улогу у мамопоези и лактогенези (29), док *STAT5b* посредује у сексуално диморфичним ефектима фактора раста у јетри (30).

STAT3 је протеин који може бити активиран пропагацијом сигнала генерисаних на многим цитокинским рецепторима као што су IL-6, IL-11, LIF, онкостатин М (OSM), цилијарни неуротрофични фактор и кардиотрофин-1 (31). Активација ових рецептора

ангажује gp130 молекула, који се преко своје фосфотирозинске резидуе везује за SH2 домен STAT3 молекула и на тај начин га активира (32, 33). STAT3 се такође активира и у одговору на G-CSF и лептин, у одговору на стимулацију тирозин киназних рецептора (EGF, CSF-1 и PDGF), члановима интерферонске (IL-10, IFN- γ и IFN- α) и IL-2 (IL-2, IL-7 и IL-15) фамилије рецептора (34). Рецептори ових молекула у свом цитоплазматском домену имају (YxxQ) мотив за који се везује STAT3 (35). Активација STAT3 молекула детектована је код мишева и током раног постинплантационог периода, што указује на то да овај молекул игра важну улогу током ране ембриогенезе (36). Овај протеин такође учествује у диференцијацији астроцита (37) и тубулогенези (38). Круцијалне улоге STAT3 протеина се огледају у различитим биолошким функцијама као што су ћелијски раст, анти-апоптоза и мотилитет ћелија који зависи од типа ћелије и врсте стимулса (21).

1.2.2. Улога STAT3 у онкогенези

STAT протеини су прво описани као посредници у интерферонској (IFN) сигнализацији, са значајном улогом у антивирусном и урођеном имунском одговору. Међутим, када су откривени и остали чланови STAT фамилије, ови молекули су виђени као потенцијални медијатори контроле раста ћелије и као онкогени. Тачније, уочено је да STAT3, а у мањој мери и STAT5, може бити активиран класичним сигнаlima који промовишу ћелијску пролиферацију. Још убедљивије доказе дале су опсервације које потврђују да је STAT3 супстрат за каталитичку активност тирозин киназе онкопротеина v-src (39) и да је фосфорилисани STAT3 акумулиран у многим канцерским ћелијама. Ови налази омогућили су хипотезу да је активирани STAT3 онкоген (40). Значајан број експеримената и клиничких студија је говори у прилог такве улоге STAT3. Иако су ранији радови били фокусирани на улогу овог молекула у директној контроли пролиферације и ћелијског преживљавања, недавна истраживања повезала су STAT3 са механизмима прогресије тумора независим од фосфорилације молекула и везивања хомодимера за ДНК указујући на интраћелијске путеве који нису директни регулатори генске експресије (41). Међутим, већи број радова показује да активирани STAT3 учествује у супресији делотворног имунског одговора на малигне ћелије. Недавно су *Kasprzycka* и сарадници (42), радећи са ћелијама Т лимфома, пружили доказ да активирани STAT3 у туморској ћелији не само да

промовише преживљавање малигнух ћелија већ и модулира имунски надзор индукујући развој T_{reg}.

1.2.3. Улога STAT3 у расту и метастазирању тумора дојке

Фосфорилација STAT молекула у нормалним, не трансформисаним ћелијама, је пролазна док је у ћелијама многих туморских линија као и у бројних примарних тумора, ови протеини (нарочито STAT3) су стално фосфорилисани (43). Тако је STAT3 конститутивно активиран у више од 50% примарних тумора дојке и ћелијских линија тумора (44-46). Клиничке студије су показале висок ниво тирозин-фосфорилисаног STAT3 (pSTAT3) код пацијената у другом стадијуму карцинома дојке, што је у корелацији са инкомплетним одговором на неoadјувантну терапију (46). Доказ да активирани STAT3 учествује у онкогенези тумора дојке заснива се на проучавању ћелијских линија које показују висок ниво pSTAT3. Инхибиција или уклањање STAT3 у оваквим ћелијама повећава склоност апоптози, хемосензитивност и смањује неоангиогенеза, и то како у култури ћелија тако и у ксенографтским моделима (44, 45, 47-49). Експресија конститутивно активног облика STAT3 (STAT3C) у имортализованим епителним ћелијама дојке омогућује *de novo* туморогенезу, што указује да овај транскрипциони фактор може бити довољан за покретање ћелијске трансформације (50). Активацију STAT3 молекула, могу покренути бројни аутокрини и паракрини фактори раста (IL-6, епидермални фактор раста, тромбоцитни фактор раста, херегулин, васкуларни ендотелни фактор раста и хепатоцитни фактор раста), којих у ћелијама карцинома дојке има више него довољно (51-53). Интерлеукин-6, као један од активатора STAT3 молекула, своје плејотропне тумор-промовишуће активности као што су анти-апоптотичка, про-инвазивна и имуномодулаторна, остварује управо активацијом STAT3 (54-55).

1.3.1. Биологија хуманих мезенхималних матичних ћелија и њихова физиолошка улога.

Откриће мезенхималних матичних ћелија

Мезенхималне матичне ћелије (MSC) су група хетерогених мултипотентних ћелија које могу бити изоловане из различитих ткива. Ове ћелије су први пут идентификовали *Friedenstein* и сарадници 1960. године изолацијом из костне сржи илијачне кости и окарактерисали их као хетерогену групу адхерентних ћелија које диференцирају у колоније налик депозитима кости или хрскавице (56). Осамдесетих година прошлог века истраживачи су применили *Friedenstein*-ову методу изолације и показали да су ћелије изоловане овом методом мултипотентне и да могу диференцирати у остеобласте, хондроците, адипоците и чак миобласте. На овај начин добијене ћелије привремено су називали мезенхималне матичне ћелије (због њихове способности да диференцирају у мезенхимални тип ћелија) или стромалне ћелије сржи (зато што настају из комплексног низа пратећих структура сржи) (57).

Матичне ћелије су дефинисане као ћелије које имају способност самообнављања и могу диференцирати у разним правцима. MSC изоловане из разних адултних ткива показују изразиту разноликост у погледу експресије гена, морфологије и диференцијације (58), па је јасно да се ради о разноликим популацијама ћелија.

Физиолошка улога MSC

Физиолошка улога MSC костне сржи је формирање ниша за хематопоезне матичне ћелије (енгл. Hematopoietic Stem Cells, HSCs). Након трансплантације у костну срж NOD–SCID мишева, ксеногене MSC диференцирају у периците, миофибробласте, стромалне ћелије костне сржи и ендотелне ћелије, које представљају функционалне компоненте ниша чија је основна улога одржавање хематопоезе (59, 60). У костној сржи глодара су описана два типа ниша: нише које формирају остеобласти „ендостеална ниша“ и „васкуларна ниша“ коју граде ендотелне ћелије и CD146⁺ субендотелне стромалне ћелије, које леже на албуминалној страни синусоида костне сржи (61). Стромалне ћелије у оба типа ниша обезбеђују микросредину која је неопходна за одржавање и самообнављање MSC, тако што их штите од диференцијације и апоптотичких стимулса. Нише такође контролишу

пролиферацију и диференцијацију MSC и омогућују ослобађање њихових зрелих потомака у васкуларни систем. MSC ендостеалне нише су задржане у Go фази, да би након адекватних стимулуса оне прешле у васкуларну нишу у којој ћелије строме контролишу њихову пролиферацију и диференцијацију (62, 63).

1.3.2. *In vitro* карактеристике мезенхималних матичних ћелија

Иако се хумане MSC углавном изолују из костне сржи (64) ове ћелије могу бити изоловане и из других ткива као што су масно ткиво, амнионска течност, периост, фетално ткиво (65-68), односно могу бити изоловане из свих постнаталних ткива и органа (69) и у зависности од ткива из ког су изоловане показују хетерогеност у погледу морфологије и експресије површинских антигена (70-72). До данас нису откривени појединачни или мултипли површински маркери који би могли бити означени као „главни“ маркери за идентификацију MSC. Осим тога, већина података који се тичу фенотипских особина MSC се заснива на анализама *in vitro* развијених линија, док се мало зна о њиховим *in vivo* фенотипима.

Фенотипски рецептори

На површини MSC могуће је, моноклонским антителима, маркирати различите мембранске антигене. На основу присуства неких од тих маркера али и недостатка других маркера могућа је ближа карактеризација MSC.

Најважнији површински маркери су: Stro-1, CD73 (мембрански везана екто-5'-нуклеотидаза), CD90 (Thy-1), CD105 (ендоглин) и CD166 (ALCAM) (73-77). Stro-1 препознаје трипсин-резистентне површинске антигене који се једино налазе на субпопулацији MSC која има способност остеогене диференцијације (74). CD166 реагују са недиференцираним MSC, па је присуство овог маркера погодно за изолацију што чистије линије MSC (76).

Антитело на CD271 молекула (рецептор за нискоафинитентни нервни фактор раста LNGFR) се такође користи за добијање што чистије линије MSC нарочито током изолације из костне сржи (78). Занимљиво је да се губи експресија CD271 молекула након *in vitro* култивације MSC, што сугерише да недостају индуктивни стимулси у стандардним медијумима за култивацију и да CD271 има морфогеничну улогу у развоју строме костне сржи (79).

Штавише, скорије студије су идентификовале додатне маркере MSC (80) и показале да нова MSC антитела (W1C3, W3D5, 9A3 и друга) препознају само CD271-позитивну популацију ћелија у костној сржи. Из бројних студија дошло се до закључка да је CD271 најспецифичнији маркер за MSC изоловане из костне сржи. Остали маркери који су класификовани као фенотипски маркери MSC су: CD146 (MCAM) и CD146 (81, 82).

Ипак, сви ови антигени се могу наћи и на другим типовима ћелија и њихова експресија се разликује у зависности од ткива из кога се изолују MSC (83). Такође, MSC не експримују хематопоетске и ендотелијалне маркере као што су: CD11, CD14, CD31 (PECAM-1), CD33, CD34, CD45 и CD133 (77, 84).

У циљу стандардизације фенотипских карактеристика MSC, Интернационално Удружење за Терапију Ћелијама (International Society for Cellular Therapy- ISCT) је предложило да MSC популација мора бити позитивна на најмање неколико антигена као што су: CD73, CD90 и CD105, али и негативна на хематопоетске маркере CD45 и CD34 и маркере за моноците, макрофаге и В лимфоците (85).

Рецептори за факторе раста, хемокине и цитокине

Фактори раста могу утицати на MSC преко својих многобројних рецептора који се налазе на њиховој површини. Показано је да су EGFR, bFGFR, IGFR, PDGFR, TGFβRI и TGFβRII рецептори врло битни за самообнављање и диференцијацију MSC (86).

Хемокински рецептори на површини MSC имају важну улогу у хомингу као и миграцији MSC до места повреде или неоплазије. Идентификовани су бројни такви рецептори на површини MSC (CCR1, CCR2, CCR4, CCR6, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR1, CXCR2,

CXCR4, CXCR5, CXCR6 и CX3CR1) као и хемокини које ове ћелије могу секретовати (87, 88).

MSC експримују широк спектар цитокинских рецептора: IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, IFN γ R и TNFI и TNFIIR (89). Ови цитокини директно утичу на способност миграције MSC, експресију хемокинских и цитокинских рецептора, као и на транскрипцију гена за хемокине и цитокине (90, 91). Стога, MSC имају способност да одговоре на сигнале из окружења и да мигрирају до оштећеног ткива. Продукцијом цитокина и хемокина MSC, могу обезбедити трофичку подршку и регенерацију оштећеног ткива аутокрином или паракрином сигнализацијом.

Адхезивни молекули

Експресија специфичних интегрина на површини MSC не само да има важну улогу у процесу екстравазације на местима ткивних оштећења већ посредују у интеракцијама ових ћелија са матриксом и другим ћелијама омогућајући и регулишући на тај начин адхезију, покретљивост, разастирање, пролиферацију, диференцијацију, опстанак и апоптозу ових ћелија (92). На површини MSC детектоване су бројне субјединице интегрина као што су $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, αV , $\beta 1$, $\beta 3$ и $\beta 5$ (93). Осим тога, многе студије су анализирале њихову улогу у причвршћивању за подлогу и преживљавању MSC у различитим природним и вештачким медијумима за култивацију. Ови молекули су веома значајни за отпочињање програма специфичне диференцијације (93). На пример, промене у експресији ових интегрин забележене су током хондрогене диференцијације и хондроцитне де-диференцијације (94).

CD44 молекул је други битан рецептор који је укључен у интеракцију ћелија-матрикс и налази се на површини MSC (75, 95). Овај трансмембрански молекул је одговоран за везивање са хијалуроном. *Zhu* и сарадници (96) су испитивали улогу интеракције CD44 молекула и хијалурона у миграцији MSC и показали да се након стимулације PDGF-ом, повећава експресија овог молекула тако да адхезија за и миграција на хијалурону искључиво зависе од CD44.

MSC остварују контакт са другим ћелијама преко неколико типова рецептора. *Oldershaw* и сарадници (97) су испитивали Notch рецепторе и њихове лиганде (Jagged-1, Jagged-2,

DLL-1, DLL-3 and DLL-4) на површини MSC и показали да су Notch 1, 2 и 3 присутни на MSC и да је Jagged-1 једини Notch лиганд експримиран у високом нивоу на овим ћелијама. Након везивања лиганата Notch рецептори се активирају протеолитичким исецањем и отпуштањем интрацелуларног домена, који потом улази у једро и мења експресију гена (98).

Површински молекули који припадају суперфамилији имуноглобулина такође су укључени у интеракције MSC са другим ћелијама нпр. са ћелијама костне сржи. Проточном цитометријом утврђено је присуство ICAM-1 и -2, VCAM-1 и ALCAM молекула на MSC (99). Лиганди за ове молекуле су присутни на зрелим хематопоезским ћелијама. VCAM-1 – $\alpha 4$ интегрин има улогу у интеракцији између MSC и Т лимфоцита, блокирањем овог рецептора онемогућено је везивање Т лимфоцита за MSC. Контакт између MSC и других типова ћелија путем интегрина може омогућити презентацију антигена и секрецију цитокина, што говори у прилог томе да MSC *in vivo* могу утицати на хематопоезу и имунски одговор.

Имуномодулаторни рецептори

Показано је да MSC инхибирају функције Т и В лимфоцита и NK ћелија. На MSC се детектује низак ниво експресије молекула I класе MHC док се молекули II класе експримују само након стимулације $IFN\gamma$. Без обзира да ли експримују једну, обе или ниједну класу MHC молекула MSC су још увек способне да инхибирају активацију Т лимфоцита (100). Костимулаторни молекули CD40, CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2), нису експримираны на MSC, тако да не може бити активације алореактивних Т лимфоцита. MSC секретују солубилне факторе као што су индоламин 2,3-диоксигеназа (IDO), IL-6 и IL-10 са неспорним имуномодулаторним ефектима (101). На површини MSC присутни су и Toll-like рецептори (TLRs) 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 9, којима ове ћелије препознају молекуле на патогенима у оштећеном ткиву (102), што активира сигналне путеве одговорне за секрецију цитокина и хемокина. Стога TLRs рецептори могу специфично усмерити регрутацију, миграцију MSC до места повреде као и активирати њихове имуномодулаторне функције.

1.3.3. *In vitro* диференцијација мезенхималних матичних ћелија

MSC се поред идентификације на основу својих морфолошких и фенотипских карактеристика, могу идентификовати и на основу својих способности да *in vitro* диференцирају у кост, хрскавицу и масно ткиво (103). Под одговарајућим условима MSC могу диференцирати у хондроците, теноците, скелетне миоците, неуроне и ћелије висцералног мезодерма (ендотелне ћелије) (103-106). Такође је показано да, када се MSC третирају 5-азациитидином и амфотрецином Б, диференцирају у мијелобласте који се спајају у миотубуле (104). Поред тога, *in vitro* индукована је и диференцијација у неурону-сличне ћелије (105, 107), које експримују маркере типичне за зреле неуроне, али будући да су инсуфицијентне у производњи акционог потенцијала ове ћелије не могу бити класификоване као прави неурони (108).

1.3.4. Утицај мезенхималних матичних ћелија на ћелије имунског система

Имуномодулаторни ефекти MSC су описани тек након опсервација *Di Nicola* и *Bartholomew* и сарадника, 2002. године, да MSC изоловане из костне сржи супримирају пролиферацију Т лимфоцита (109, 110). Након оваквих студија пажња истраживача се усмерава осим на мултипотентне особина MSC и на њихове модулаторне ефекте на ћелије имунског система (**Схема 1**).

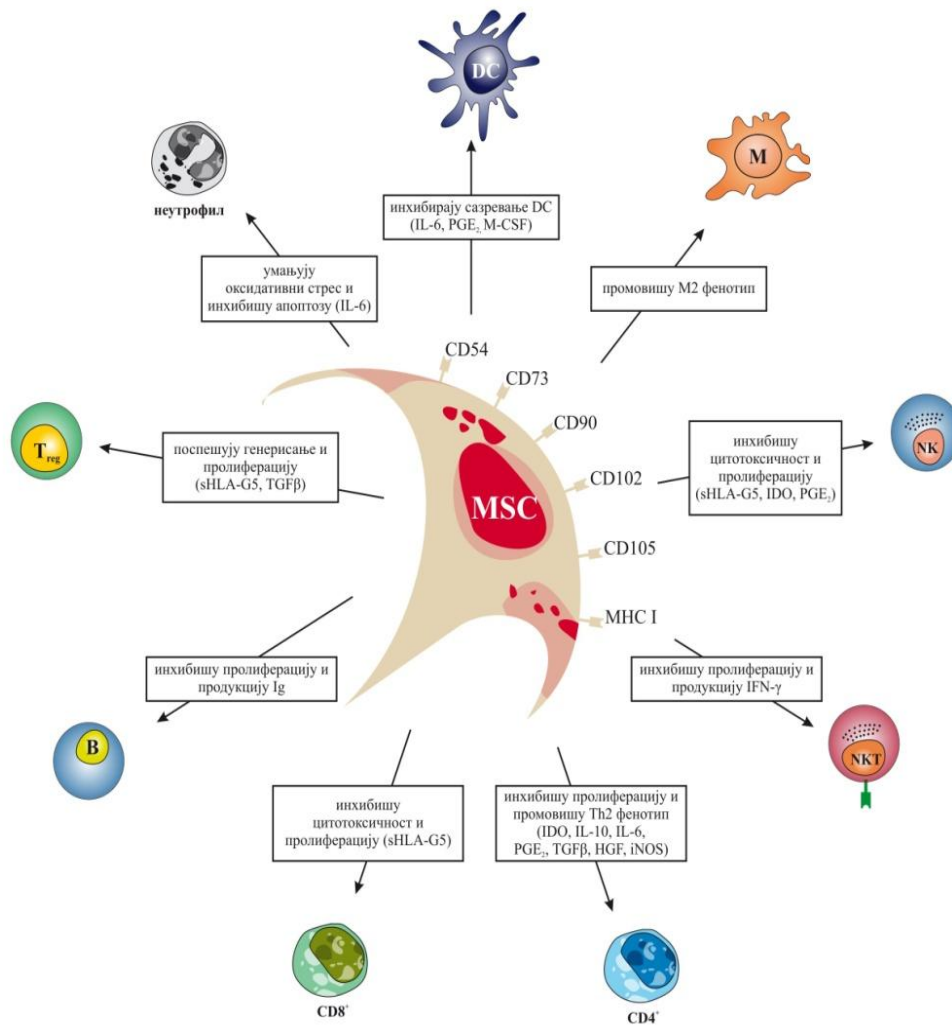


Схема 1. Утицај мезенхималних матичних ћелија на ћелије имунског система

Утицај MSC на ћелије урођеног имунског система

Дендритске ћелије. Мијелоидне дендритске ћелије имају фундаменталну улогу у презентацији антигена наивним Т лимфоцитима. Током матурације индуковане антигенима и цитокинима урођене имуности, незреле дендритске ћелије пролазе кроз низ морфолошких и функционалних промена као што су експресија костимулаторних

молекула, повећање експресије МНС молекула I и II класе заједно са другим површинским маркерима (као што су CD11c и CD83). *In vitro* је показано да, MSC могу инхибирати матурацију моноцита и CD34⁺ хематопоетских прогениторских ћелија у дендритске ћелије (111-114). Кокултивација зрелих дендритских ћелија са MSC, смањује експресију молекула II класе МНС, CD11c, CD83 као и костимулаторних молекула, односно, умањује продукцију IL-12 чиме је нарушена способност дендритских ћелија да адекватно презентују пептидне делове антигена (111, 113, 115-117). MSC такође смањују и проинфламаторни потенцијал дендритских ћелија инхибирајући продукцију TNF (115).

Плазмоцитоидне дендритске ћелије које су специјализоване за продукцију високог нивоа IFN тип I у одговору на микроорганизме, коинкубиране са MSC повећавају секрецију антиинфламаторног IL-10 (115).

Комбиновани ефекти MSC на две основне субпопулације дендритских ћелија забележени *in vitro*, могу се екстраполирати и на ситуацију *in vivo*.

***NK* ћелије**

NK ћелије су важне ефекторске ћелије урођене имуности и имају кључну улогу у урођеном имунском одговору на вирусе и малигне ћелије и то захваљујући својој цитолитичкој активности и продукцији проинфламаторних цитокина (118). Активација NK ћелија је регулисана површинским рецепторима који спроводе инхибиторне или активацијске сигнале. Да би NK ћелије усрatile измењене ћелије неопходно је да оне искажу на својој површини лиганате које препознају активацијски NK рецептори уз истовремени низак ниво или одсуство молекула I класе МНС које би требало да препознају инхибиторни рецептори (119, 120). MSC могу инхибирати цитотоксичност неактивираних NK ћелија супресијом експресије активацијских рецептора NKp30 и NKG2D (121).

Свеже изоловане, неактивираних NK ћелије пролиферишу и стичу снажну цитотоксичну активност након култивације са IL-12 и IL-15. Међутим, када се овакве NK ћелије инкубирају са истим овим цитокинима али у присуству MSC, њихова пролиферација као и

секреција IFN- γ изостају (121, 122). Кокултивација пред-активираних NK ћелија са MSC има сличне ефекте и ако би се могло рећи да су преактивирание NK ћелија ипак отпорније на ову инхибицију (115, 121-125).

Ипак, *in vitro* показано је да и аутологе и алогене MSC, могу бити убијене цитокинима активираних али не и не активираних NK ћелија (121, 123, 124). Осетљивост хуманих MSC на NK ћелијама посредовану цитотоксичност зависи од ниског нивоа експресије МНС молекула I класе на MSC, и експресије неколико лиганата који препознају NK ћелијске рецепторе (122). Инкубација MSC са IFN- γ , делимично их штити од цитотоксичности NK ћелија кроз повећану експресију МНС молекула I класе (121).

На основу *in vitro* добијених резултата, може се доћи до претпоставки да у *in vivo* условима, активирание NK ћелије након сусрета са MSC, делимично су функционално инхибисане али и даље задржавају способност лизирања MSC (121). У микросрединама које су богате IFN- γ , MSC су заштићене од NK ћелија, док у одсуству IFN- γ активирание NK ћелије убијају MSC. Међутим, *in vivo* значај ових интеракција може бити имплициран само у случајевима MSC трансплантације.

Неутрофили

Неутрофили су још један важан тип ћелија урођеног имунског система, које се током инфламације, брзо мобилишу, активирају и убијају микроорганизме. Након везивања за бактеријске продукте, неутрофили пролазе кроз процес познат као *respiratory burst*. Показано је да MSC могу да ублаже овај процес (126) као и да постоји веза између умањеног *respiratory burst* и повећаног животног века неутрофила (127). MSC могу да одложе спонтану апоптозу неактивираних и активираних неутрофила кроз IL-6 зависне механизме што је битно за депое неутрофила, као што су коштана срж и плућа (128).

Утицај MSC на ћелије адаптивног имунског система

Т лимфоцити

MSC могу инхибирати пролиферацију наивних Т лимфоцита, претходно стимулираних митогенима или специфичним антигенима, задржавајући их у G0/G1 фази ћелијског циклуса (129-138). Ова ефекат је независан од МНС рестрикције јер га остварују и аутологе и алогене MSC. MSC промовишу и апоптозу Т лимфоцита продужавајући стимулацију TCR-а. Ову ћелијску смрт индуковану активацијом (138) може успорити истовремена стимулација Т лимфоцита IL-2 (131).

Осим инхибиције пролиферације Т лимфоцита, MSC могу смањити продукцију IFN- γ *in vitro* (115) и *in vivo* (131) и повећати секрецију IL-4, што указује на промену поларизације имунског одговора од проинфламаторног у антиинфламаторни (115).

MSC могу значајно умањити цитотоксичну способност Т лимфоцита, што је и показано *in vitro* студијом у којој хумане MSC, које су садржале вирусне пептиде или су биле трансфектоване са mRNA из туморских ћелија, бивају отпорне на цитотоксичке ефекте CTL (139). Ова отпорност се не може уклонити ни појачаном експресијом молекула I класе МНС на површини MSC проузрокованом додавањем IFN- γ (140, 141).

MSC подстичу дендритске ћелије (DCs) да појачано секретују IL-10, што за последицу има покретање експанзије T_{reg} (115, 117). Поред тога, након кокултивације са антиген специфичним Т ћелијама, MSC могу директно индуковати пролиферацију T_{reg} тако што ослобађају имуномодулаторне изоформе HLA-G5 (125).

Посматрани целовито до сада описани ефекти MSC на CTLs и T_{reg} јасно указују да MSC могу регулисати интезитет и поларизацију имунског одговора у правцу његове инхибиције. Ипак то није сасвим и увек тако јер MSC експримирају функционалне TLRs рецепторе који након интеракције са лигандима индукују пролиферацију, диференцијацију и миграцију MSC као и секрецију цитокина и хемокина (142-144). Након ангажовања TLR3 и TLR4 на површини MSC, ове ћелије губе способност инхибиције Т лимфоцита, вероватно услед оштећене Notch сигнализације (145, 146).

В лимфоцити

Студије које су се бавиле интеракцијом између В лимфоцита и MSC су врло контрадикторне, вероватно као последица различитих експерименталних услова (134, 147-150). Већина објављених радова до данас указује на то да MSC *in vitro* инхибирају пролиферацију В лимфоцита (134, 147,149). MSC такође могу инхибирати диференцијацију В лимфоцита у плазмоците као и експресију хемокинских рецептора (149). Претпоставља се да ови ефекти зависе од секреције солубилних фактора и међућелијског контакта и вероватно су посредовани интеракцијом између pD1 молекула и његових лиганда на В лимфоцитима (147). Супротно, друге *in vitro* студије су показале да MSC могу промовисати преживљавање, пролиферацију, диференцијацију и секрецију антитела из В лимфоцита изолованих из здравих особа и деце оболеле од системског лупуса еритематодеса (151, 152). Без обзира на контроверзне резултате *in vitro* студија, треба нагласити да одговор В лимфоцита зависи од функционалног стања Т лимфоцита па ће стога продукција антитела *in vivo* бити смањена услед описане инхибиције Т лимфоцита. Ову претпоставку потврђује студија у експерименталном аутоимунском енцефаломијелитису код мишева третираних протеолипидним протеинским пептидом током које инфузија MSC значајно смањује продукцију антиген специфичних антитела као и рp-специфични одговор Т лимфоцита (153).

Механизми којима MSCs остварују своје имуномодулаторне активности

Занимљиво је да MSC могу функционисати као професионалне антиген презентујуће ћелије. Експресија молекула II класе МНС на овим ћелијама зависи од концентрације IFN- γ и то тако да ниске концентрације IFN- γ повећавају док високе концентрације смањују експресију ових молекула, што указује на то да би MSC током раног имунског одговора могле обављати презентацију антигена да би се у каснијим фазама имунског одговора ова улога постепено гасила (154, 155). Будући да је већина података о имуномодулаторним својствима MSC добијена на основу *in vitro* студија са MSC њихова физиолошка улога у контроли имунског одговора је још увек недовољно расветљена (156, 157).

Већина радова објављених до данас, указује на то да MSC могу супримирати имунски одговор и то путем директног контакта (ангажовање инхибиторних молекула након адхезије) или секрецијом солубилних фактора, конститутивно или под утицајем цитокина (92, 109, 115, 125, 147, 148, 157, 158).

MSC конститутивно секретују TGF- β 1, HGF, IL-10, рGe2, HO1, IL-6 и солубилни HLA-G5 (109, 115, 125, 130, 135, 137, 141, 158) при чему се интезитет секреције може појачати дејством цитокина продукованих након интеракције ових ћелија са ћелијама имунског система (115). Ниједан од ових молекула нема ексклузивну улогу у имуномодулаторним способностима MSC, већ сви заједно стварају имуносупресивно окружење. Ипак најшири спектар имуномодулаторних активности испољавају IL-6 и HLA-G5. IL-6 може умањити *respiratory burst*, одложити апоптозу неутрофила и инхибирати диференцијацију прогениторских ћелија коштане сржи у DCs (159), док солубилни HLA-G5 може супримирати пролиферацију Т лимфоцита, односно смањити цитотоксичност Т и NK ћелија и промовисати настанак регулаторних Т лимфоцита (125, 141).

Под утицајем цитокина MSC могу секретовати неке имуномодулаторне молекуле као што су IDO и азот моноксид (148, 160). Тако IFN- γ покреће слобађање IDO из MSC (158), што смањује количину триптофана у микросредини чиме је инхибирана пролиферација Th1 лимфоцита а синергистичко деловање IDO и простагландина E2 инхибира и NK ћелије (122, 148). IFN- γ , самостално или у комбинацији са другим проинфламаторним цитокинима (TNF, IL-1 α или IL-1 β), може стимулисати мишије MSC на прекомерну продукцију хемокина и азот монооксида. Секретовани хемокини ће усмерити Т лимфоците ка депоима MSC у којима ће ове ћелије бити супримиране дејством азот монооксида (136).

Могућности и ризици примене MSC

Пионирске *in vivo* студије су се углавном бавиле ефектима котрансплантираних аутологих MSC током терапије хематопоеетским матичним ћелијама (161) и испитивањем улоге ових ћелија у репарацији оштећених ткива (162), а много мање њиховим имуномодулаторним својствима. Тек након сазнања о слабој имуногеничности MSC, која су проистекла из *in vitro* (129) и претклиничких студија (110), истраживачи су претпоставили да се и алогене

MSC могу користити у клиничке сврхе. Предност алогених MSC у терапијске сврхе би се огледала у томе, што би се у акутним клиничким условима време отпочињања терапије скратило. Супротно, малобројне *in vivo* студије су ипак показале да аутологе MSC и поред своје слабе имуногеничности могу бити одбачене (163, 164).

Сазнања да MSC поседују имуномодулаторна својства утицало је да се на њихову клиничку примену гледа са више опреза и резерве (115, 129, 131). Претпоставка да MSC могу утицати и на антитуморски имунски одговор као и директно на раст тумора потврђена је и *in vitro* и *in vivo*. Након контакта са MSC или са њиховим солубилним факторима ћелије до сада испитиваних тумора убрзано пролиферишу а тумори расту (165-169). Ипак постоје и студије које показују да MSC инхибирају раст неких тумора (170). Контрадикторност ових налаза може се објаснити хетерогеном природом примењених MSC или различитим експерименталним моделима у којима микросредина може утицати на понашање MSC. Независно од начина и ефеката интеракција између туморских, MSC и ћелија имунског система, потенцијални ризик од стимулације раста до тада клинички не регистрованих тумора се мора узети у обзир пре клиничке употребе MSC.

1.3.5. Значај и улога мезенхималних матичних ћелија у туморској микросредини

Туморску микросредину чине и стварају малигне ћелије, строма и крвни судови и њихове специфичне интеракције (171). Строму тумора чине најчешће фибробласти, глаткомишићне, епителне и ћелије имунског система (Схема 2). У строми тумора се могу детектовати ефекторске ћелије урођеног и стеченог имунског одговора (172).

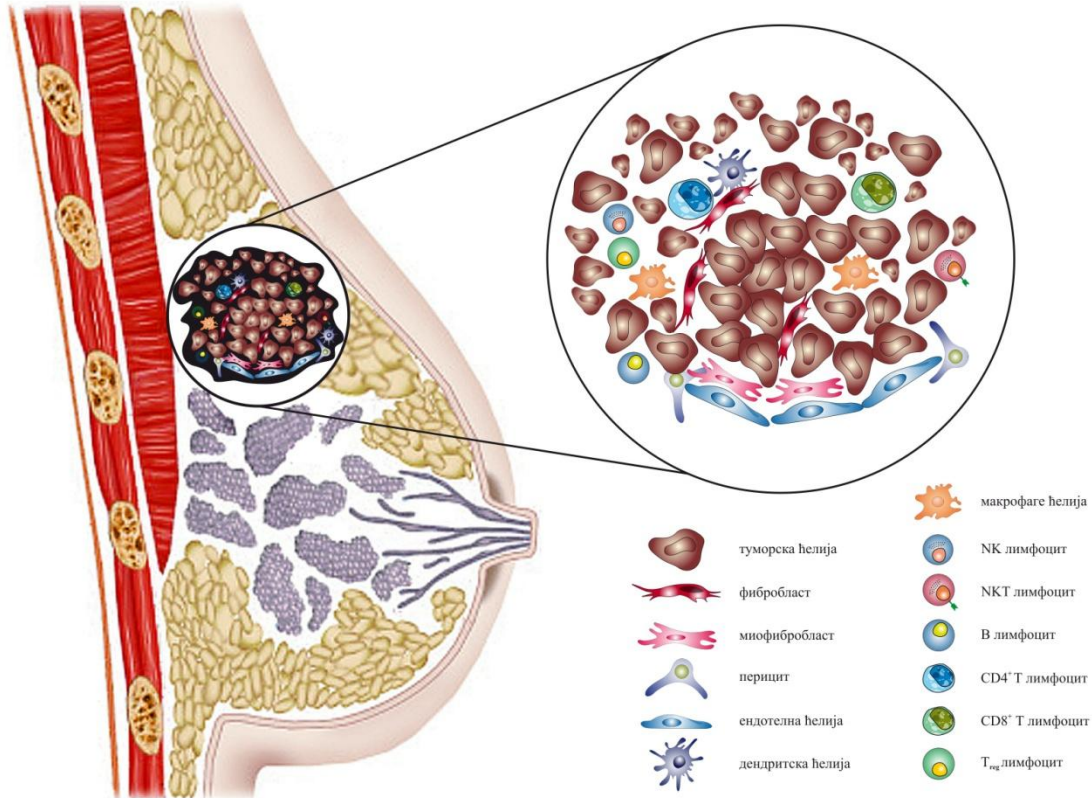


Схема 2. Микросредина тумора дојке

Сигнали генерисани из туморских ћелија стварају имunosупресивно окружење које не само да онемогућује ефикасан антитуморски одговор, већ у многим ситуацијама олакшава прогресију тумора. Туморске ћелије секретују инфламаторне медијаторе, факторе раста и металопротеиназе који на паракрини или аутокрини начин стимулишу раст тумора и појачавају регрутацију имunosупресивних ћелија као што су MSC, T_{reg} (173) и макрофага у туморску микросредину (174) (Схема 3).

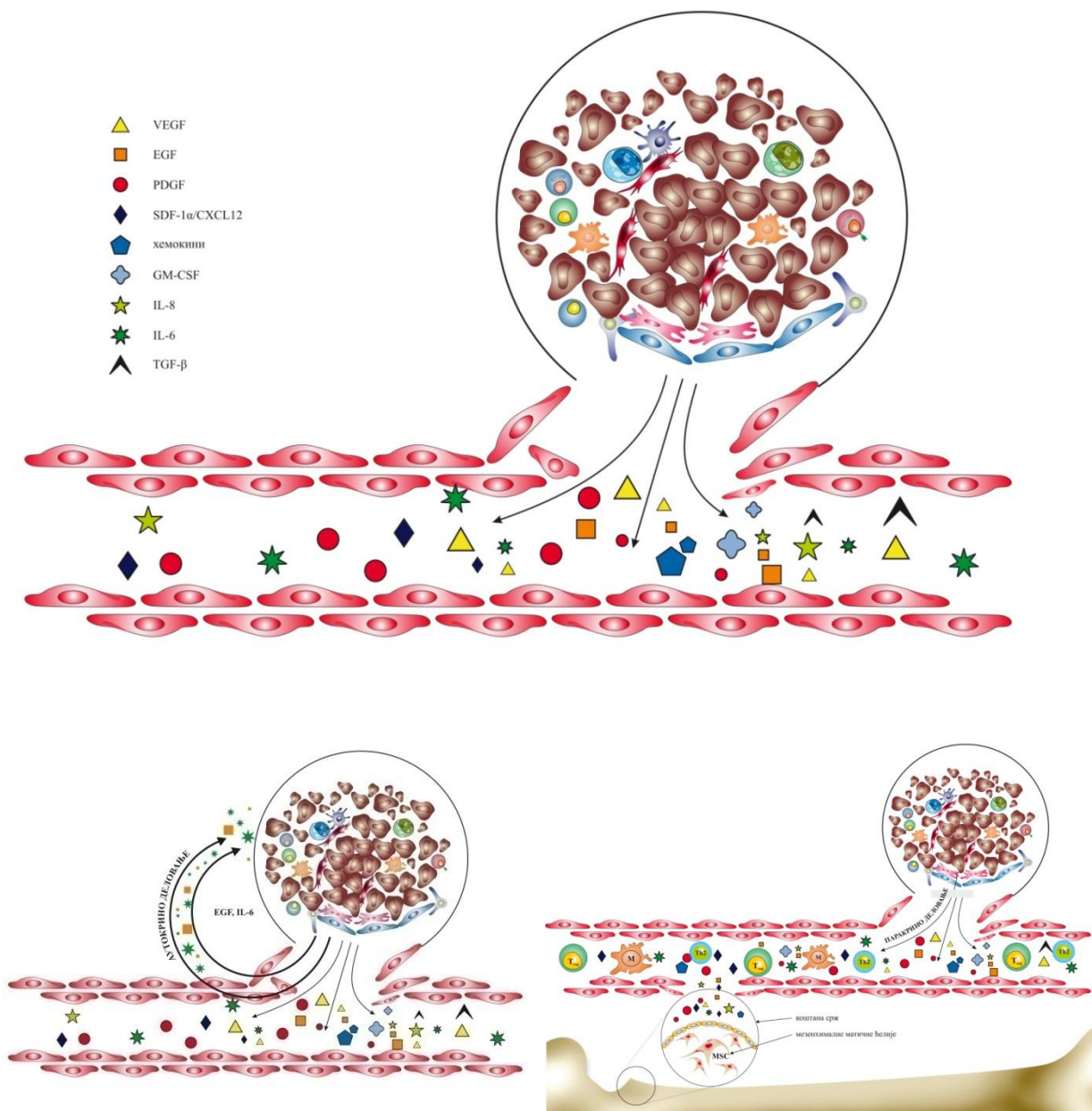


Схема 3. Аутокринa и паракрина стимулација раст тумора

Механизми миграције MSC у ткиво тумора још увек нису у потпуности разјашњени, али се претпоставља да зависе од билошких својстава тумора и његове микросредине (Схема 4). Улога MSC у тумору врло је слична њиховој улози у зарастању ткива и инфламацији. Сличност се огледа у њиховој способности да у строми тумора диференцирају у

фибробласте, периците и ендотелне ћелије (175, 176), да секретују цитокине (VEGF и PDGF) и на тај начин промовишу васкулогенезу и раст тумора (177).

По својим особинама туморска средина представља место хроничне инфламације и продукције запаљенских фактора (EGF, VGF-A, FGF, PDGF, SDF-1 α /CXCL12, IL-8, IL-6, GM-CSF, G-CSF, Ang1, CCL2, HGF, TGF β -1, U-TPA) који регрутују MSC и привлаче их из њихових ниша у строму тумора (178-184), процесом који у свему наликује на миграцију леукоцита и зависи од ангажовања адхезионих молекула (185). Најважнији молекули у овој миграцији су: интегрини, селектини и рецептори за хемокине (CCR1, CCR4, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CX3CR1, c-met) (186-190). Од свих хемокинских рецептора највише је изучаван CXCR4 и показано је да овај молекул, експримиран на површини али и интрацелуларно, има значајну улогу у мобилизацији и хомингу MSC (191-192).

Локализоване у туморској строми, MSC на описане начине доприносе стварању специфичне туморске микросредине и модулишу раст и прогресију тумора (171).

Доказани тропизам MSC за туморско ткиво чини ове ћелије погодним за евентулану терапију транспортом антитуморски агенаса као што су IFN- β , цитозин деаминаза, TNF и онколитички вируси (193-198). Овакав начин испоруке антитуморских агенаса је испитан у предклиничким моделима карцинома и дао је снажне антитуморске ефекте (195-201). Ипак, остаје питање баланса оваквог антитуморског деловања и прогресије тумора под дејством MSC?

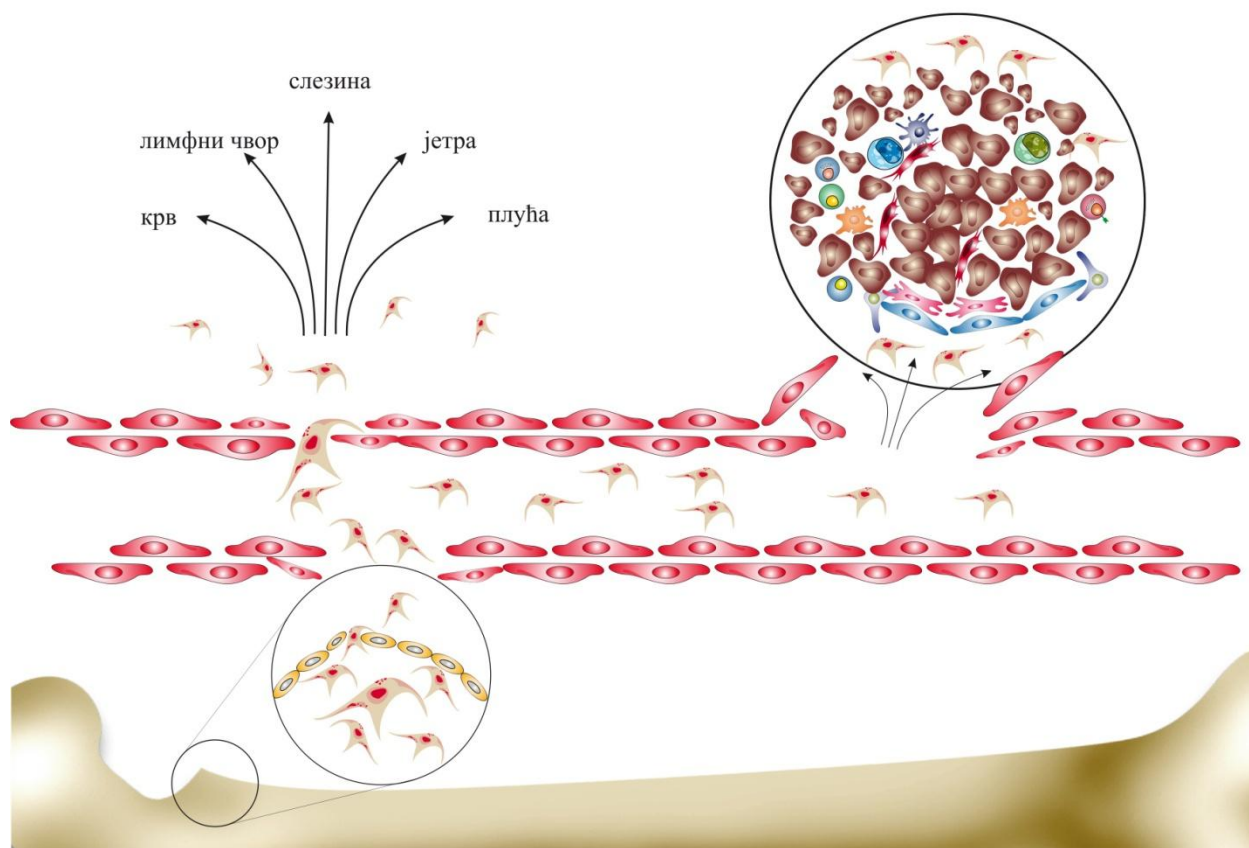


Схема 4. Миграција MSC под утицајем фактора раста секретованих из туморске микросредине

In vivo утицај MSC на раст тумора

Већина студија показала је да MSC могу промовисати раст тумора а мали је број студија које показују супротно. Занимљива је студија *Karnoub*-а и сарадника (202) којом је показано да MSC котрансплантиране са ћелијама четири различите линије карцинома дојке промовишу раст тумора *in situ* само једне туморске линије док убрзавају метастазирање све четири. Слични је показано и *in vivo* студијама са карциномом колоне, меланомом и лимфомом (167, 203, 204).

Ови тумор промовишући ефекти су изгледа универзални јер не зависе од ткивног порекла MSC, па тако и феталне и адултне MSC котрансплантиране са малигним ћелијама повећавају инциденцу тумора, васкуларизацију и степен некрозе (203).

Не треба губити из вида да повећање волумена и масе тумора, регистрован у експериментима са котрансплантацијом туморских ћелија и MSC може бити и резултат не само повећања броја туморских ћелија већ може бити и последица локалне пролиферације MSC (205). Занимљиво је да MSC пролиферишу само када се котрансплантирају са туморским ћелијама (198).

Своје не сумњиве тумор промовишуће ефекте MSC остварују на неколико начина (**Схема 5**):

А) **Убрзавањем неоангиогенезе.** MSC не само да продукују ангиогене факторе већ и диференцирају у периците и ћелије ендотела (206). Фактори ангиогенезе пореклом из MSC (VEGF, PDGF, FGF, CXCL12) делују и на туморске и ендотелне ћелије (207) и убрзавају неоваскуларизацију и раст тумора (208, 209).

Осим већ описаних начина којима MSC могу промовисати неоангиогенезу (206-209) ове ћелије својом диференцијацијом у TAF који секретују солубилне факторе који деградирају екстрацелуларни матрикс олакшавајући неоваскуларизацију и туморску прогресију (210).

Б) **Имуносупресијом.** Могућност избегавања и супресија атитуморског имунског одговора су важне одлике малигних ћелија (42, 54). Туморске ћелије супримирају имунски одговор контактном инхибицијом ефекторских ћелија имунског система и/или продукцијом супресивних фактора (42). Слично туморским ћелијама, MSC могу креирати супресивну микросредину и на тај начин промовисати раст тумора (115, 212, 213).

Показано је да, MSC могу инхибирати матурацију моноцита и CD34⁺ хематопоетских прогениторских ћелија у дендритске ћелије и умањити способност ових ћелија да адекватно презентују пептидне делове антигена (214, 215). Своја инхибиторна дејства MSC испољавају и на NK ћелије и неутрофиле (121, 216). MSC такође могу инхибирати

пролиферацију и диференцијацију Т (109, 139, 141, 217) и В лимфоцита и истовремено стимулирати пролиферацију T_{reg} (125).

Механизми којима MSC остварују своје имуносупресивне ефекте су комплексни и зависе како од међућелијског контакта тако и од продукције солубилних фактора. Под утицајем паракриних сигнала из туморских или ћелија имунског система, MSC могу продуковати солубилне имуносупресивне молекуле (PGE2, азот оксид, IDO, солубилни HLA-G5) (125, 122, 141, 218).

Ц) **Олакшавање настанка удаљених метастаза.** Све су бројније студије које показују да MSC могу колонизовати и метастатске туморе а у неким туморским моделима чак и фаворизовати метастатски фенотип малигнућелија у примарном тумору (202, 219). Хемокини пореклом из MSC делују на малигнућелије тако што им повећавају мотилитет, инвазивност и способност насељавања удаљених ткива (202). MSC након контакта са туморским ћелијама продукују бројне солубилне факторе и цитокине, превасходно IL-6, који је потентан активатор остеокласта чија је активност кључна у развоју метастаза у костима (220-225).

Д) **Стварајући нише канцерских матичних ћелија.** Нише канцерских матичних ћелија су места у којима ове ћелије несметано могу пролиферисати. MSC могу формирати оваква окружења и *in vitro* и *in vivo* у којима канцерске матичне ћелије могу сачувати свој пролиферативни потенцијал (165). Нише које формирају MSC нису есенцијалне само за дуго преживљавање и експанзију канцерских матичних ћелија, већ значајно штите туморске ћелије од цитотоксичности индуковане аспарагиназом (226).

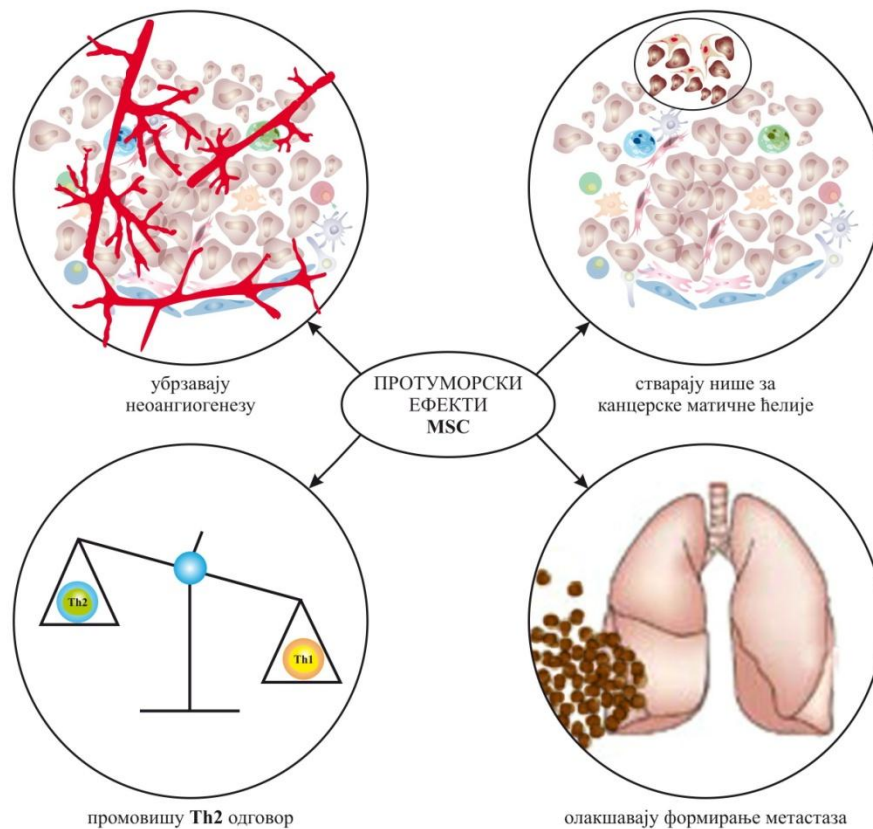


Схема 5. Тумор промовишући ефекти MSC

Антитуморски ефекти MSC

У супротности су студије које показују да MSC супримирају раст тумора. Тако на пример *Khakoo* и сарадници су први демонстрирали антинеопластичке ефекте MSC у моделу *Kaposi* саркома (168). Овај ефекат је последица међућелијског контакта који за последицу има инхибицију активне изоформе Акт киназе у туморским ћелијама (168). Антитуморски ефекти MSC забележени су и у експерименталном моделу Non Hockins лимфома, где се региструју спорији туморски раст и поља некрозе (227). Резултати *in vitro* студија показују да MSC могу индуковати миграцију ендотелних ћелија и промовисати њихову апоптозу што успорава неоангиогенезу (227). Осим већ описаних начина којима MSC остварују своје протуморске ефекте у моделу карцином колона (203), показано је да ове ћелије могу и супримирати раст овог тумора регрутовањем гренулоцита и моноцита у туморску микросредину (228).

Укратко, не постоји јединствена парадигма која може објаснити опречне резултате студија о про- или антитуморским ефектима MSC. Разумевање чак и нијанси интеракција између MSC и туморских ћелија је посебно важно с обзиром на терапијски потенцијал MSC.

1.4.1. Имуни одговор на туморске ћелије

Paul Ehrlich је 1909. године рекао да имуни систем може сузбити раст тумора и тиме је отворио дебату века названу „имунолошка контрола неоплазија“ (229), скоро деведесет година касније успостављен је концепт имуноског надзора над туморима (230-232). Да имуни надзор представља само једну димензију комплексне везе између имуноског система и тумора показали су *Shankaran* и сарадници (233). У овој студији забележено је да имуни систем може утицати на промену фенотипа туморских ћелија у правцу смањене имуногеничности, захваљујући којој их ћелије имуноског система не препознају и не убијају. Резултати ове и сличних студија су подстакли развој теорије о „имуноедитингу“. У најкраћем, имуноедитинг је процес кога чине три нејасно разграничене фазе: елиминација, еквилибријум и бекство. Фаза елиминација представља класичан имуни надзор, еквилибријум је период имунске латентности који започиње у фази елиминације након делимичне деструкције тумора и фаза бекства представљена финалним растом тумора који је превазишао имунска ограничења из претходних фаза (234).

Фаза елиминације односно имуни надзор

Данас, више од једног века након постављања прве хипотезе о имуном надзору, не поставља се више питање, да ли, већ како имуни надзор функционише као супресор раста тумора и штити имунокомпетентног домаћина од развоја неоплазија?

Ћелијску основу у имуном надзору представљају лимфоцити урођеног и стеченог имуноског система. Једна од најважнијих до данас изведених студија која показује кључну улогу лимфоцита у имуном надзору је студија о *RAG-2* (235). Елиминација овог гена повезана је са губитоком способности лимфоцита да реаранжирају гене за антигенске рецепторе и истовремено са повећаном инциденцом спонтаних тумора (236). *Girardi* и

сарадници (237, 238) су такође у својим студијама показали да $\alpha\beta$ -Т и $\gamma\delta$ -Т субсет лимфоцита, имају круцијалне улоге у механизмима антитуморске одбране. НК и NKT ћелије такође учествују у имунском надзору а мишеви са делецијом ових ћелија су три пута осетљивији на индуковану туморогенезу у поређењу са дивљим типом истог соја мишева (239).

Имунски надзор је процес у коме имунски одговор зависи од типа тумора, начина трансформације, анатомске локације, стромалног одговора, цитокинског профила и имуногеничности (234). Студије које су идентификовале физиолошки релеванте ефекторске ћелије у имунском надзору, допуњене су студијама које су дефинисале круцијалне задатке које ћелије имунског система морају извршити да би уништили туморске ћелије и то су: способност разликовања туморских од нормалних ћелија, продукција IFN- γ (240) и ћелијска цитотоксичност (241, 242). У последњих десет година истраживања су фокусирана су на расветљавање кључних разлика и молекулске основе на чијој бази ћелије имунског система препознају трансформисане ћелије. Познато је да, CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцити препознају туморске антигене у контексту МНС молекула I и II класе (243). Туморске ћелије могу прекомерно експримовати различите молекуле и због такве експресије ефекторске ћелије имунског система могу их препознати као трансформисане ћелије (243). Значај продукције IFN- γ у антитуморском одговору показано је применом антитела на овај цитокин што је за последицу имало бржи раст тумора (240). На крају, круцијална улога имунског надзора је убијање туморских ћелија ефекторским ћелијама имунског система (отпуштањем перфорина и гранзима, ангажовањем рецептора смрти) (241, 242).

Фаза еквилибријума

Током елиминационе фазе ћелије имунског система могу уништити огроман део трансформисаних ћелија, ипак мали али и довољан број туморских ћелија може преживети.

Период латенције који се протеже од краја елиминационе фазе до почетка фазе бекства и појаве клиничких симптома малигне болести представља потенцијално продужени период интеракције између туморских и имунских ћелија и означен је као фаза еквилибријума

(244; 245). На крају ове фазе судбина малигних ћелија може бити тројака: 1) елиминација; 2) перманентно одржавање у фази еквилибријума или 3) прелазак у финалну фазу бекства (234).

Фаза бекства

Многе студије су документовале да тумори стичу својство избегавања имунског одговора захваљујући променама својственим туморским ћелијама (246-248). Туморске ћелије могу инхибирати имунски одговор прекомерном продукцијом имуносупресивних цитокина као што су TGF- β или IL-10 (249). Инхибиција антитуморског одговора може настати и услед прекомерне продукције MIC NKG2D лиганда, кога луче поједини хумани тумори и који, пошто се веже за рецептор NKG2D исказан на NK ћелијама, умањује њихову цитотоксичност (250). Туморске ћелије могу аутокринно индуковати активацију STAT3 молекула, који појачава експресију гена чији продукти инхибирају сазревање дендритских ћелија, секрецију проинфламаторних цитокина и хемокина (251). Резултати скоријих истраживањима показују да тумори промовишу настанак, активацију и функцију имуносупресивних субпопулација ћелија (252) као што су NKT ћелије које продукују IL-13 (253) и/или CD4⁺CD25⁺ Т регулаторни лимфоцити.

1.4.2. Имуни одговор на ћелије тумора дојке

Ћелије имунског система играју важну улогу у одговору на карциноме дојке (254). Интеракција између туморских и имунских ћелија најчешће резултира продукцијом цитокина, хемокина и/или стварањем ендогених сигнала познатих као DAMP (255, 256).

За разумевање патогенезе како тумора дојке тако и осталих тумора, неопходно је разумевање микросредине у којој тумор расте (257). У строми здраве дојке ћелије имунског система нису многобројне. Присуство запаљенских инфилтрата у бенигним променама дојке није необично и може се видети у различитим фиброцистичним променама или стањима као што је дуктална ектазија. Међутим значајно повећање броја ћелија урођеног и стеченог имунског система скоро увек прати процес канцерогенезе (258).

Ћелије урођеног имунског система имају важну улогу у одржавању хомеостазе ткива дојке и активирају их било каква оштећења ткива, чак и она настала током нормалних физиолошких догађаја ка што су гранање дуктуса у пубертету и трудноћи. На пример, макрофаги су важни регулатори ових процеса, који имају карактер самоограничавајућих, а нестају одмах након успостављања ткивне хомеостазе (259). Супротно, канцерогенеза је хроничан процес, често праћен неправилном пролиферацијом и смрћу неопластичних ћелија. Континуирано ослобађање проинфламаторних DAMPs молекула из умирућих ћелија услед дисрегулације ћелијске смрти доприноси опстанку ових ћелија *in situ* и одржавању хроничне инфламације (260, 261). Такође, умируће трансформисане епителне ћелија отпуштају тумору асоциране антигене, што може активирати хуморални и целуларни имунски одговор који може превенирати раст тумора, међутим генетска нестабилност малигних ћелија омогућује фенотипске варијатете међу којима су и оне промене које им обезбеђују отпорност на препознавање и/или убијање од стране ефекторских ћелија имунског система (262).

Кључни улогу у развоју и одржавању проканцерогеног окружења имају мијелоидне дендритске ћелије и Th2 и Treg субпопулације CD4⁺ Т лимфоцита које доприносе стварању и одржавању толеранције на тумор (263). Значај Th2 ћелија у канцерогенези експлицитно је показан у експерименталном моделу карцинома дојке, у којем Th2 ћелије прекомерном продукцијом IL-4, регулишу функцију макрофага тако што фаворизују развој проканцерогеног M2 фенотипа (264; 265). IL-4 могу продуковати и саме малигне ћелије, но без обзира на порекло овај цитокин може деловати аутокринно и паракринно и на тај начин допринети опстанку туморских ћелија (266). Показано је да и други Th2 цитокин IL-13 на сличан начин подстиче раст хуманог карцинома дојке (267). Осим тога, позитивна корелација између броја инфилтришућих Treg и лоше прогнозе забележена је у клиничкој студији са пацијентима оболелим од инвазивног карцинома дојке (268).

Да антитуморски имунски одговор може ограничити раст тумора показано је анализом строме примарних карцинома дојке где је забележено да је доминација Th1 и CTL повезана са бољом прогнозом (269). Међутим, постоје и студије чији резултати показују да је прогностички значај имунског одговора различит и да зависи од молекуларног субтипа карцинома дојке (270, 271).

2. ЦИЉ РАДА

Основни циљ овог истраживања је да се испита утицаја хуманих мезенхималних матичних ћелија на експресију STAT3 гена у туморском ткиву и на прогресију експерименталног мишјег тумора дојке.

У складу са основним циљем, након интравенске апликације hMSC, анализирали смо:

1. модулацију фосфорилације STAT3 молекула у туморском ткиву
2. антитуморску имуност.

Конкретни задаци:

Испитивање *in vivo* ефеката hMSC на раст и развој тумора дојке и експресију STAT3 молекула у, експерименталном мишјем моделу, анализирањем:

1. раста примарног тумора, инциденце метастазирања и тропизма hMSC
2. експресије STAT3 молекула у туморском ткиву
3. нумеричких односа лимфоцитних популација и субпопулација у слезини
4. цитотоксичке антитуморске активности укупних спленоцита као и NK ћелија и CD8⁺ Т лимфоцита добијених из слезине
5. концентрације цитокина у системској циркулацији
6. интраћелијске продукције цитокина у CD4⁺ Т лимфоцитима слезине.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Лабораторијске животиње

Ова студија је изведена на имунокомпетентним мишевима чистог BALB/c соја („wild type“) женског пола. BALB/c мишеви су набављени из одгајалишта за мишеве Војно-медицинске академије у Београду а одгајани су у виваријуму Медицинског факултета у Крагујевцу.

У појединачним експериментима коришћени су увек мишеви истог пола и старости од 8 до 10 недеља (разлика у старости није била већа од 7 дана).

3.2. Ћелијска линија мишјег тумора дојке (4T1)

У експерименталним моделима користили смо ћелијску линију мишјег тумора дојке-4T1 (American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA; CRL-2539).

Ова линија је добијена из спонтано насталог тумора дојке у BALB/C мишу. Представља анимални модел за изучавање IV стадијума карцинома дојке. Ћелије се могу инокулисати директно у масно јастуче млечне жлезде (инјекцијом), интравенски у латералну репну вену, артеријски хируршком катетеризацијом десне каротидне артерије или инјекцијом у леву преткомору срца. Након убризгавања директно у ткиво дојке, 4T1 ћелије расту брзо, формирајући примарни тумор и дају хематогене метастазе у плућима, јетри, костима и мозгу у периоду од 3 до 6 недеља након инокулисања (12-17, 272).

3.3. Ћелијска линија хуманих мезенхималних матичних ћелија (hMSC)

Хумане мезенхималне матичне ћелије добијене су у лабораторији за Експерименталну хематологију и матичне ћелије (Институт за медицинска истраживања, Београд) од проф. др Диане Бугарски. hMSC добијене су из периферне крви здравог донора, показују адхерентност, способност пролонгираног пасажирања (преко 40 пасажа), клоногену

пролиферацију, формирање CFU-F и у *in vitro* условима способност мултипотентне диференцијације у мезенхималне ћелијске линије (остеогене, хондрогене, адипогене и миогене). Имунофенотипском анализом показано је одсуство хематопоетских маркера CD34, CD11a, CD33, CD45, glycophorin и присуство мезенхималног маркера vimentin, такође анализа кариотипа показује нормалан 46, XX кариотип. Хумане MSC су култивисане у комплетном DMEM медијуму (Dulbecco's Modified Eagles Medium) који садржи: 4,5g/l глукозе, 10% феталног бовиног серума (FBS), 1mmol/l мешаних неесенцијалних аминокиселина (Sigma, USA) и антибиотике (пеницилин 100 U/mL, стрептомицин 100 µg /mL; Nyclone, Logan, UT). Медијум у коме су расле ћелије је мењан сваки трећи дан.

3.4. Индукција примарног тумора дојке

Ћелије извађене из контејнера са течним азотом су брзо одмрзаване у воденом купатилу (37°C, не дуже од 2 минута). Додавањем 9 ml комплетног медијума и центрифугирањем на 350G 10 минута, уклоњен је крио-протективни медијум. Крио-протективни медијум јесте комплетан медијум за раст ћелија са додатком 5% DMSO. Након одливања супернатанта, ћелије су ресуспендоване у 1 ml комплетног медијума, пребачене у фласк за култивацију и инкубиране у атмосфери 5%CO₂, засићеној воденом паром на температури 37°C. Пре употребе, комплетан медијум је инкубиран најмање 15мин. да би се стабилизовала рН вредност. Ћелије су култивисане у посудама за културу ћелија- T₂₅ фласкови (BD Falcon) у стриктно асептичним условима. Просечно време дуплирања броја ћелија износи од 24 до 48^h.

Субконфлуентне ћелије, у логаритамској фази раста, подигнуте су из флашка краткотрајним третирањем трипсином (0,25% трипсин са хелатором 0,02% EDTA који су растворени у PBS-у (PAA Laboratories GmbH)). Ћелије су затим опране у комплетном медијуму, да би FBS инактивисао трипсин и спречио оштећење ћелија. Ћелије су додатно пране у PBS-у, без FBS-а, пре употребе у сваком *in vitro* и *in vivo* експерименту. Процент живих ћелија одређиван је виталним бојењем трипан плавим, а у експерименталном раду су коришћене само суспензије ћелија са вијабилношћу већом од 95%. Трипан плаво је боја

која служи за разликовање мртвих и живих ћелија јер улази искључиво у ћелије са нарушеним интегритетом ћелијске мембране, док живе ћелије са очуваном мембраном остају необојене (273).

Различити истраживачи, у експерименталном раду су користили различит број туморских ћелија, који се кретао од 1×10^3 до 1×10^6 (274-279) и различит број матичних ћелија (280; 281). У свим експериментима овог истраживања коришћено је 2×10^4 4T1 и 4×10^5 hMSC, број туморских и hMSC одређен је на основу неколико експеримената у којима је коришћен различит број 4T1 (од 1×10^4 до 3×10^4) и hMSC (од 2×10^3 до 1×10^6). Број од 4×10^5 hMSC је најмањи апликовани број hMSC који показује разлику у инциденци појављивања и волумену примарног тумора а даје најдуже преживљавање мишева. Највећи проценат мишева којима је апликовано 1×10^6 hMSC заједно са 2×10^4 4T1 туморских ћелија, не успевају да преживе 35 дана, колико је трајао експеримент.

3.4.1 Експерименталне групе

Експериментални мишеви су подељени у четири групе. Две групе BALB/c мишева су примили 4T1 ћелије (2×10^4) ресуспендованих у 50µl PBS-а и убризганих инсулинским системом (шприц и игла 21G) директно у масно јастуче млечне жлезде број 4 (4T1 група). Једна од ове две групе је истог дана примила и hMSC (4×10^5) ресуспендоване у 100 µl PBS апликованих интравенски кроз репну вену (4T1 + hMSC група). Група 3 је примила 4×10^5 hMSC у 100 µl PBS интравенски кроз репну вену (hMSC група) и група 4 је коришћена као контролна (није третирана ниједном врстом ћелија).

3.4.2. Одређивање величине примарног тумора

Раст примарног тумора праћен је провераван два пута у току недеље, регистрањем палпабилног тумора. Тридесет петог дана експеримента мишеви су жртвовани и запремина тумора је израчуната по формули (282):

$$V(\text{mm}^3) = L(\text{највећи пречник}) \times W^2(\text{најмањи пречник}) / 2$$

3.4.3. Хистопатолошка анализа метастаза

Мишеви су жртвовани одређеног дана (35. дана) у атмосфери засићеној диетилетром (ВЕТА НЕМ, Београд). За хистопатолошку анализу коришћени су примарна туморска маса, плућа и јетра.

3.5. Изолација ДНК хуманог порекла реакцијом ланчане полимеризације

У циљу детекције партикула хуманог порекла и праћења биодистрибуције hMSC користили смо PCR методу. Ланчана реакција полимеразе или PCR реакција је метода која омогућава умножавање жељеног сегмента ДНК помоћу ензима ДНК полимеразе. Предност ове методе над осталим техникама је у томе што захтева минималну количину материјала и омогућава амплификацију жељеног сегмента ДНК до милијарду пута што је довољно за даље анализе. Висока сензитивност PCR реакције омогућава анализу ДНК изоловане из једне једине ћелије. За ову реакцију су потребне следеће компоненте: ДНК матрица (једноланчани молекули ДНК – cDNA - молекули комплементаран РНК молекули или денатурирана дволанчана ДНК), "прајмери" (кратки олигонуклеотиди комплементарни крајевима секвенце која се копира), дезоксирибонуклеотиди, оптимални пуфер, јони магнезијума и термостабилна ДНК-зависна ДНК полимераза (најчешће се користи Таq полимеразе), која катализује уградњу нуклеотида. За успешну амплификацију веома је битна комплетна денатурација ДНК матрице пре првог циклуса (иницијална денатурација) и она се изводи на 95°C у трајању од 1 до 3 минута. Процес амплификације се одиграва током серије цикличних промена температуре, а један циклус се састоји из следеће три фазе: денатурација ДНК матрице (раскидање водоничних веза између два комплементарна ДНК ланца под утицајем температуре), хибридизација "прајмера" са матрицом (*eng.* annealing; успостављање водоничних веза између "прајмера" и комплементарне секвенце на матрици) и елонгација "прајмера" катализована ДНК полимеразом. Број циклуса се креће од 25 до 35. За успешан процес PCR амплификације од веома великог значаја је температура. Уколико је температура денатурације, хибридизације и елонгације адекватна за дати фрагмент ДНК, резултат PCR

амплификације биће већа количина тог специфичног фрагмента. Најкритичнији корак у оптимизацији PCR реакције је избор температуре за хибридизацију прајмера са матрицом. Уколико је температура сувише висока, неће доћи до хибридизације, док ће у случају сувише ниске температуре доћи до неспецифичне хибридизације "прајмера" са само парцијално комплементарним секвенцама ДНК. Оптимална температура хибридизације креће се од 42-65°C, у зависности од дужине и нуклеотидне секвенце "прајмера". Уобичајено трајање хибридизације креће се у распону од 10 секунди до 1 минута. Време трајања елонгације "прајмера" зависи од дужине и концентрације циљне секвенце и креће се од 10 секунди до 2 минута. Елонгација "прајмера" се изводи на 72°C, што је оптимална температура за деловање Таq полимеразе. По завршетку последњег циклуса изводи се финална елонгације на 72°C у трајању од 0-10 мин. У овом кораку долази до комплетирања парцијално елонгираних продуката.

За успешну амплификацију, поред оптимизације температуре, потребно је оптимизовати концентрацију ДНК, магнезијума, нуклеотида и "прајмера". У већини случајева секвенца и комбинација "прајмера" дефинише успех PCR-а. Најчешће се користе "прајмери" дужине од 14 до 40 нуклеотида, са G + C садржајем од 40-75%.

PCR смеша за CYP1A1 продукт у финалној запремини од 25 µl садржала је 1 µl cDNK (približno 50 ng), по 0.6 µl "F прајмера" (енгл. Forward primer) и 0.6 µl "R прајмера" (енгл. Reverse primer) CYP1A1, 12.5 µl 2X КАРА2G (contains 2 mM MgCl₂ at 1X), 1.25 µl DMSO (100%) и 9.05 µl воде за PCR (енгл. PCR grade water).

PCR смеша за β-actin продукт у финалној запремини од 25 µl садржала је 1 µl cDNK (približno 50 ng), по 0.5 µl "F прајмера" (енгл. Forward primer) и 0.5 µl "R прајмера" (енгл. Reverse primer) β-actin, 12.5 µl 2X КАРА2G (contains 2 mM MgCl₂ at 1X), 1.25 µl DMSO (100%) и 9.25 µl воде за PCR (енгл. PCR grade water).

Амплификација је извођена под следећим условима: иницијална денатурација ДНК на 95°C, 3 мин., а сваки следећи од укупно 35 циклуса је подразумевао денатурацију ДНК на 95°C у трајању од 15 секунди, хибридизацију "прајмера" 15 секунди на 60°C и елонгацију "прајмера" 15 секунди на 72°C. Финална елонгација је извођена 10 минута на 72°C. Хлађење на температури од 4°C.

ген	секвенца 5' → 3'	величина продукта
CYP1A1	sense 5' GAACTGCCACTTCAGCTGTCT	312 bp
	antisense 3' CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC	
β-actin	sense 5' GGACCTGACAGACTACC	337 bp
	antisense 3' GGCATAGAGGTCTTTACGG	

Табела 1. Секвенце "прајмера" и величине амплификованих продуката коришћених у експерименту.

Амплификовани продукти су електрофоретски анализирани на 2.7% агарозном гелу, 5 минута на 150 V и 55 минута на 100 V. Након електрофорезе гелови су визуелизовани и фотографисани.

3.6. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)

Уследило је бојење криостатских ткивних пресека методом хематоксин-еозин по Heidenhain-у (340) и сагласно препорукама Gurr-а (341): на почетку су плочице са ткивним пресецима излагане пуферу формалдехида 10 секунди, онда опране у текућој води, затим потапане два минута у Mayer-ов хематоксин (Merck), испиране један минут у текућој води и напослетку бојене алкохолним еозином (Merck) у трајању од једног минута. Након бојења исечци су дехидрирани тако што су потапани у серију растућих концентрација алкохола и то следећим редом: најпре један минут у 85%-тном алкохолу, затим два пута по 50 секунди у 96%-тном и на крају два пута по 50 секунди у апсолутном алкохолу. Након бојења и дехидратације, уследио је поступак просветљавања потапањем у мешавину ксилола и алкохола у односу 1:1, 50 секунди, а затим два пута по 50 секунди само у ксилолу. На крају је на ткивне исечке нанет Канада балзам (Canada balsam, Centrohem, Србија) а препарати прекривени покровним стаклима. Овако припремљени

ткивни исечци су, након 24-часовног сушења, анализирани светлосном микроскопијом (10x и 40x).

3.7. Имунохистохемијска детекција митохондријалних протеина хуманог порекла

Имунохистохемијски смо детектовали присуство hMSC у ткивним исечцима јетре и плућа, мишева оболелих од тумора дојке а који су осим туморских интравенски примили и hMSC. Ткивни исечци су рутински фиксирани у 4% формалдехиду, дехидрирани у алкохолу различитих концентрација, очишћени у ксилену и укалупљени у парафину. Укалупљени узорци ткива су сечени на дебљину од 4-5 μm , затим депарафинизирани прањем два пута по 10 минута у ксилену и рехидратисани у опадајућим концентрацијама алкохола (100%, 96%, 70%, 50%). Имунохистохемијско бојење је извршено стрептавидин-биотин методом. Укратко, исечци су депарафинизирани и инкубирани у 3% водоник пероксиду како би се блокирала активност ендogene пероксидазе, затим кувани у микроталасној пећници 20 минута у 10 mmol/L натријум цитрату (pH 6.0) и инкубирани са моноклонским антителима на хумане митохондријалне протеине 60 минута (MAВ-12730, Millipore). Након примарних антитела, додали смо биотинизирана секундарна антитела и за детекцију користили АВС метод. Да би се реакција видела коришћени су peroxidase substrate 3,3-Diaminobenzidine- H₂O₂ и хематоксилин. Препарате смо посматрали користећи светлосни микроскоп (Zeiss Axioskop 40, Jena, Germany).

3.8. Имунохистохемијско одређивање експресије STAT3 молекула у туморском ткиву

Имунохистохемијом смо одређивали експресију STAT3 молекула у препаратима примарних тумора изолованих из мишева експерименталних и контролних група. Депарафинизирани исечци тумора су најпре кувани 12 минута (2 x 6 минута) у 10mM Na-цитрату. Затим су препарати третирани са 3% H₂O₂ у метанолу 10 минута са циљем инактивације ендogene пероксидазе. Тако припремљени исечци тумора су обележени примарним антителима (у разблажењу 1:200): анти-STAT3 (Santa Crus) и остављени на 4°C преко ноћи. Препарати су затим инкубирани у присуству биотинилизованог козјег

анти зечјег IgG (енгл. biotinylated goat anti rabbit IgG, Sigma Chemical Co.) и стрептавидин-биотин комплекса (енгл. streptavidin-biotin-horseradish peroxidase complex, ДАКО, Denmark) у трајању од 30 минута на температури од 37°C. Да би се реакција видела коришћени су peroxidase substrate 3,3-Diaminobenzidine- H₂O₂ и хематоксилин. Препарате смо посматрали користећи светлосни микроскоп (Zeiss Axioskop 40, Jena, Germany). Оне ћелије које су биле браон боје сматрали смо као позитивне, односно то су биле ћелије за које смо сматрали да експримирају STAT3 молекул. Процент ћелија које експримирају STAT3 молекул у односу на укупан број ћелија.

3.9. Семи-квантитативно одређивање броја и величине метастатских колонија

У овој студији су семиквантитативно 35.-ог дана после убризавања туморских ћелија одређивани просечан број метастаза по мишу, као и величина метастатских колонија и то користећи програм Autodesk AutoCAD 2009, на прецизан и једноставан начин квантификује број и величину метастатских колонија у целом препарату плућа и јетре. Овај метод смо користили за семи-квантитативно одређивање број и величина метастатских колонија у свим нашим експериментима.

Препарате смо, након бојења хематоксилин-еозином, посматрали светлосним микроскопом (увећање 100×) и фотографисали дигиталним апаратом водећи рачуна да фотографишемо цео препарат. Затим смо фотографије експортовали у новокреирани документ: Autodesk AutoCAD 2009.dwg file. Коришћењем „*polyline*” опције означили смо поља метастатских колонија са увећаним вишеједарним ћелијама, јасно ограничена од околног плућног ткива, чиме смо креирали тзв. „*polyline*” регионе. Софтвер је израчунао површину целокупне фотографије, али и површину сваког од оивичених некротичних поља, „*polyline*” региона. Након фотографисања целокупног препарата, проценат некротичног ткива у целој јетри (N) смо израчунали користећи формулу:

$$N = V_t \times 100 / A_t$$

где је: A_t (A total) збир укупних површина сликаних фотографија ($A_t=A_1+A_2+\dots+A_n$, n представља укупан број фотографија)

B_t (B total) збир површина оивчених некротичних поља, односно „polyline” региона ($B_t=B_1+B_2+\dots+B_m$, m представља број „polyline” региона).

3.10. Изолација леукоцита из слезине

BALB/c мишеви су жртвовани у атмосфери засићеној диетилетром тридесет петог дана после субкутаног убризгавања у четврту млечну жлезду 2×10^4 4T1 ћелија у 50 μ l DMEM-а и мишеви који су истог дана осим туморских интравенски примили хумане ММЋ у различитим концентрацијама. Истог дана су жртвовани и мишеви који нису третирани туморским ћелијама. Свим мишевима су екстирпирани слезине а затим је читав поступак изолације спленоцита, односно лимфоцита изведен на $+4^\circ\text{C}$. Најпре је клипом шприца протиснута слезина кроз ћелијско сито (cell strainer, BD Pharmingen, USA) у епрувету од 50ml уз додавање 5ml медијума (RPMI-1640; PAA Laboratories GmbH са додатком 10% FBS-а). Овако раздвојене појединачне ћелије су центрифугиране 5 минута на 350G. Супернатант је одливен, а на ћелијски талог је додато 5ml раствора за лизирање (4mg EDTA, 100mg NaHCO_3 , 826mg NH_4Cl , растворено у 100ml ddH₂O), и инкубирано 5 минута на леду. Даље лизирање заустављено је додавањем 5ml RPMI-1640 (10% FBS). Затим су ћелије центрифугиране, супернатант је одливен а талог ресуспендован у 8ml RPMI-1640 (10% FBS). Да би се избегла контаминација спленоцита хистиоцитима слезине, ћелије су још једном пропуштене кроз ћелијско сито. Овако добијена суспензија појединачних спленоцита коришћена је у даљим испитивањима (за проточну цитометрију и тест цитотоксичности). Након изолације, приликом бројања ћелија одређивана је и њихова вијабилност помоћу *trypan-blue*-а под светлосним микроскопом и у експерименталном раду су коришћене само суспензије ћелија са вијабилношћу већом од 90%.

3.11. Анализа популација мононуклеарних ћелија слезине проточном цитометријом

У овом туморском моделу је између осталог примењена и проточна цитофлуорометрија како би се одредила релативна заступљеност и апсолутан број различитих субпопулација Т лимфоцита, НК и НКТ ћелија слезина. Након изолације, приликом бојења је одређивана и њихова вијабилност помоћу *trypan-blue-a* под светлосним микроскопом и у свим експериментима вијабилност ћелија је износила између 90% и 95%.

3.11.1 Обележавање ћелијских мембранских маркера

У идентификацији мембранских маркера за фенотипизацију и одређивање функционалног фенотипа субпопулација мононуклеарних ћелија слезине примењена су анти-мишја моноклонска антитела специфична за различите молекуле, обележена различитим флуоресцентним бојама (Табела 2.). На 5×10^5 ћелија ресуспендованих у 50 μ l пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*; BD) додата је одговарајућа количина моноклонских антитела примарно обележених различитим флуоресцентним бојама у одређеним комбинацијама:

1. CD3 PE, CD8 FITC
2. CD3 PE, CD4 FITC
3. CD3 PE, НКp46 *PerCP-CyTM5.5*
4. CD4 FITC, IL-17 PE, TNF- APC
5. CD4 FITC, IL-10 APC, IFN- γ PE
6. CD4 FITC, FoxP3 PE

	назив	клон	изотип	произвођач
1.	FITC anti-mouse CD4	RM4-5	IgG2a, κ	eBioscience
2.	PE anti-mouse CD3			
3.	FITC anti-mouse CD8			
4.	PerCP-Cy TM 5.5 anti-mouse CD335 NKp46	29A1.4	IgG2a κ	BD Pharmingen
5.	APC anti-mouse IL-10	JES5-16E3	IgG2b	BD Pharmingen
6.	APC anti-mouse TNF	MP6-XT22	IgG1	BD Pharmingen
7.	PE anti-mouse Foxp3	MF23	IgG2b	BD Pharmingen
8.	PE anti-mouse IL-17F	O79-289	IgG1, κ	BD Pharmingen
9.	PE anti-mouse IFN-γ	XMG1.2	IgG1, κ	BD Pharmingen

Табела 2. Примарно конјугована моноклонска антитета

Спленоцити/лимфоцити су такође инкубирани и са одговарајућим изотипским контролама (Табела 3). Бојење изотипским контролама помаже нам да разграничимо специфично од неспецифичног бојења.

1.	PE Hamster Isotype Control	B81-3	IgG2a	BD Pharmingen
2.	FITC Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a	BD Pharmingen
3.	APC Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a	BD Pharmingen
4.	PerCP-Cy TM 5.5 Rat Isotype Control	R35-95	IgG2a	BD Pharmingen
5.	FITC Rat Isotype Control	B39-4	IgG1 λ	BD Pharmingen

Табела 3. Изотипске контроле

Сва антитета за површинско бојење, као и изотипске контроле, коришћена су у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења у суспензији спленоцита ($V \approx 80 \mu\text{l}$) буду 1:100. Затим је талог ћелија са антителима краткотрајно вортексован и онда је уследила њихова инкубација у мраку на температури од $+4^\circ\text{C}$ у трајању 20 минута. По истеку инкубације, ћелије су "опране" додавањем 1,5ml хладног пуфера за бојење (енгл. Staining Buffer, BD) и онда су центрифугиране 5 минута на 400G. Потом је одливен супренатант и талог ћелија је ресуспендован у 350 μl пуфера за бојење. Непосредно након процедуре бојења ћелије су анализирани на проточном цитометру FACSCaliber (BD) помоћу CELLQUEST софтвера (BD). Уколико у даљем тексту није другачије назначено, за

цитометријску анализу коришћен је регион (енгл. Gate) моноклеарних ћелија у FSC/SSC плоту. Регистровано је најмање 20.000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу CELLQUEST софтвера (BD) и WinMDI 2.9 софтвера.

3.12. Интрацелуларно бојење цитокина

Бојење интрацелуларних цитокина изведено је по BD *Cytofix/Cytoperm*TM методи. Према подацима из литературе, како би се детектовале ћелије које продукују цитокине, за стимулацију ћелија се користе различите *in vitro* методе (283; 284; 285; 286; 287; 288; 289; 290; 291; 292). Углавном се користе различити поликлонски активатори: конканавалин А (Con-A), фитохемаглутинин, стафилококни ентеротоксин β , липополисахарид (LPS), моноклонска антитела специфична за TCR/CD3 комплекс (са или без антитела на костимулаторне рецепторе, као што је CD28) и естри форбола са калцијум јонофором (енгл. *phorbol esters plus calcium ionophore*). У овом истраживању ћелије су стимулисане форбол миристат ацетатом (енгл. *Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA; Sigma*) и јономицином (енгл. *Ionomycin; Sigma*), који покрећу активност протеин киназе С (енгл. *Protein kinase C*, РКС) и инфлукс јона калцијума у ћелију, што индукује експресију цитокина у ћелији претходно активираној физиолошким стимулусима (293). Трајање инкубације од 4 до 6 часова је оптимално за већину цитокина, јер је дужа инкубација удружена са појавом цитотоксичних ефеката поменутих активатора. У току *in vitro* стимулације ћелија користе се инхибитори интрацелуларног транспорта протеина, BD GolgiStopTM (садржи моненсин) и BD GolgiPlugTM (садржи брефелдин А). Блокирање интрацелуларног транспорта поменутих инхибиторима резултира акумулацијом већине цитокина у ендоплазматском ретикулуму или Голџи комплексу, па је тако повећана могућност детекције ћелија које продукују цитокине. Моненсин и брефелдин А имају дозно и временски зависан цитотоксични ефекат, па излагање ћелија овим агенсима мора бити ограничено, инкубације дуже од 12 часова су токсичне за ћелије.

3.12.1. Стимулација ћелија

Суспензија појединачних моноклеарних изолованих из мозга, кичмене мождине и регионалног лимфног чвора (1×10^6 /ml) припремљена у комплетном медијуму (RPMI 1640) је стимулирана инкубацијом на 37°C ($5\%\text{CO}_2$) у присуству РМА (*Sigma*; 50ng/ml) и јонофора (*Ionomycin, Sigma*; 500ng/ml). У суспензију је додат и BD GolgiStop™ (0,7μl/ml) који блокира секрецију цитокина и повећава њихову интрацелуларну акумулацију. После 4 сата инкубације ћелије су опране и ресуспендоване у комплетном медијуму, а потом пребачене у пластичне епрувете (*FALCON round-bottom test tubes, BD*) за имунофлуоресцентно бојење.

Даље процедуре су обављане на $+4^\circ\text{C}$.

3.12.2. Бојење површинских антигена

Епитопи површинских маркера могу да се оштете фиксацијом и пермеабилитацијом, па се површинско бојење обавља пре фиксације ћелија. Тако је на 1×10^6 моноклеарних ресуспендованих у 50μl пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer; BD*) додавана одговарајућа количина примарно конјугованих моноклонских антитела специфичних за површинске антигене. Ћелије су такође инкубиране и са одговарајућим изотипским контролама (Табела 3). Сва антитела за површинско бојење коришћена су у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења, у суспензији ћелија буду 1:100. Ћелије су инкубиране 30 минута на $+4^\circ\text{C}$, у мраку.

3.12.3. Фиксација ћелија и пермеабилитација ћелијске мембране

Након инкубације са примарно конјугованим антителима за површинске антигене, моноклеари су опрани два пута у пуферу за бојење (1ml/епрувети; 300G). Ћелијски талог је ресуспендован у 250μl *Cytofix/CytoPerm™* раствора (*BD Pharmingen*) и инкубиран 20 минута на $+4^\circ\text{C}$. Затим су ћелије опране два пута у *Perm/Wash™* пуферу (*BD Pharmingen*; 1ml/епрувети; 300G).

3.12.4. Бојење интрацелуларних цитокина

Ћелијски талог је ресуспендован у 50µl Perm/Wash™ пуфера и додата су примарно конјугована моноклонска антитела специфична за цитокине. Сва антитела коришћена су у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења буду 1:100. Ћелије су инкубиране 30 минута на +4°C, у мраку. Након инкубације, ћелије су опране у Perm/Wash™ пуферу (1ml/епрувети; 300G). Ћелијски талог је ресуспендован у 350µl пуфера за бојење и анализиран на проточном цитометру. Уколико у даљем тексту није другачије назначено, за цитометријску анализу коришћен је регион (енгл. Gate) моноклеарних ћелија у FSC/SSC плоту. Регистровано је најмање 20.000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу CELLQUEST (BD) и FlowJo (Tree Star) софтвера.

3.13. Интрацелуларно бојење транскрипционих фактора Foxp3

Први корак у овој процедури је површинско бојење CD4 маркера: на 1×10^6 ћелија изолованих из испитиваног органа, ресуспендованих у 50µl пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*, BD Pharmingen), додата је одговарајућа количина FITC-анти-CD4 антитела у таквој концентрацији да је финално разблажење антитела у суспензији било било 1:100. Ћелије су инкубиране 20 минута у мраку на температури од +4°C са поменутиим антителима а такође и са одговарајућом изотипском контролом. Након инкубације ћелије су опране два пута у пуферу за бојење (1ml/епрувети; 250G), а ћелијски талог је ресуспендован у 2ml хладног пуфера за фиксацију (енгл. *mouse Foxp3 Fixation Buffer*, BD Pharmingen) и инкубиран 30 минута на +4°C у мраку. Затим су ћелије опране два пута у пуферу за пермеабилizацију (енг. *mouse Foxp3 Permeabilization buffer*, BD Pharmingen), загрејаном до собне температуре (2ml/епрувети; 300G). Након уклањања супернатанта уследила је пермеабилizација ћелија у 2ml пуфера за пермеабилizацију, 30 минута у мраку на температури 37°C. По завршеној инкубацији ћелије су опране у пуферу за бојење (2ml/епрувети; 300G). На крају је уследила инкубација са антителима за Foxp3 транскрипциони фактор која су претходно разблажена у пуферу за бојење да финално разблажење у суспензији ћелија буде 1:100. Након инкубације (20 минута у мраку на

собној температури) ћелије су опране у пуферу за бојење (2ml/епрувети; 300G). Ћелијски талог је ресуспендован у 350µl пуфера за бојење и анализиран на проточном цитометру. Регистровано је најмање 20.000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу *CELLQUEST* (BD) и *FlowJo* (*Tree Star, Ashland, OR*) софтвера.

3.14. Изолација ефекторских ћелија слезине

Тридесет петог дана експеримента жртвовани су сви мишеви и то како из експерименталних група тако и мишеви обе контролне групе. Свим мишевима су извађене слезине из којих су изоловане ћелије (суспензија појединачних ћелија). Један део тако изолованих ћелија коришћен је за мерење укупне цитотоксичности а остатак је искоришћен за одређивање цитотоксичности појединих ћелијских субпопулација ($CD8^+$ Т лимфоцити и NK ћелије).

3.14.1. Негативно селекционисање $CD8^+$ Т лимфоцита помоћу магнетних куглица

$CD8^+$ Т лимфоцити су издвајани из моноклеарних ћелијских суспензија методом негативне селекције уз помоћ кита *Dynal[®] Mouse T Cell Negative Isolation Kit* (Invitrogen), тако што је 1×10^7 претходно изолованих ћелија ресуспендовано у 100µl пуфера 1 [PBS (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) w/0.1% BSA и 2mM EDTA (pH 7.4)]. Овако припремљене ћелије су инкубирани (20 минута на 2-8°C) у 20µl FBS-а са 20µl *Antibody Mix*-а (Invitrogen) који садржи различита антитела специфична за све остале ћелијске популације и субпопулације (изузев за $CD8^+$ ћелије): $CD4^+$ Т лимфоците, В лимфоците, моноцит/макрофаге, NK ћелије, дендритске ћелије, еритроците и гранулоците. По истеку инкубације ћелије су пране у пуферу 1 (2ml/епрувети; 300G) а талог је ресуспендован у 800µl пуфера 1 и у суспензије је додавано по 200µl претходно опраних магнетних куглица *Mouse Depletion Dynabeads* (Invitrogen). Прање магнетних куглица подразумева да се жељени волумен куглица помеша *ana partes* са пуфером 1, а епрувета са ресуспендованим куглицама остави у снажном магнетном пољу (Invitrogen) 1 минут. После одливања супернатанта, епрувета се уклања из магнетног поља а талог ресуспендује у почетном

(жељеном) волумену пуфера 1. Уследила је инкубација на 18-25°C у трајању од 15 минута уз повремено мешање, затим су ћелије ресуспендоване у 6ml пуфера и епрувета са ћелијама постављена у магнетно поље (Invitrogen) у трајању од два минута. Тако су у супернатанту остали само негативно селектовани CD8⁺ Т лимфоцити, који су потом опрани (4ml/епрувети; 300G), ресуспендовани у 500µl комплетног медијума. На послетку је одређен број и вијабилност оваквих ћелија, које су даље коришћене као ефекторске ћелије у МТТ тесту цитотоксичности.

3.14.2. Позитивно селекционисање НК ћелија помоћу магнетних куглица

Из суспензије моноклеарних ћелија (3×10^7) позитивном селекцијом помоћу кита *Dynal[®] Mouse CD49b isolating kit* (Invitrogen) издвајане су НК ћелије, тако што су ћелије ресуспендоване у 500µl пуфера 1 [PBS (без Ca²⁺ и Mg²⁺) w/0.1% BSA и 2mM EDTA (pH 7.4)] и инкубиране (15 минута на 2-8°C) са 25µl *FlowCompTM Mouse CD49b* антитела (Invitrogen). По истеку инкубације ћелије су пране у пуферу 1 (2ml/епрувети; 350G) а талог ресуспендован у 500µl пуфера 1. Таквој суспензији је додавано 75µl претходно опраних магнетних куглица *m49b Dynabeads* (Invitrogen), припремљених на описан начин, а након 15 минута стајања уз повремено мешање на температури 2-4°C ћелије су ресуспендоване у 6ml пуфера, а епрувета са ћелијама постављена је у магнетно поље (Invitrogen) два минута, након чега је одливен супернатант. Преостале ћелије (позитивно селектоване НК ћелије) су инкубиране (30 минута на 20-25°C уз повремено мешање) у 1ml пуфера *FlowCompTM Release buffer* (Invitrogen) и потом постављене у магнетно поље два минута. Супернатант са слободним ћелијама (ослобођених магнетних куглица) је пребачен у чисту епрувету, опран (4ml/епрувети; 300G) и ресуспендован у 500µl комплетног медијума. Одређен је број и вијабилност ових ћелија. Овако добијене НК ћелије су коришћене као ефекторске ћелије у МТТ тесту цитотоксичности.

3.15. МТТ тест цитотоксичности

Цитотоксичка активност ефекторских ћелија (Е) и то како укупних ћелија изолованих из слезине тако и $CD8^+$ Т лимфоцита и NK ћелија одређивана је МТТ тестом цитотоксичности. Тест се користи за утврђивање процента вијабилних ћелија након инкубације *target* (циљаних) ћелија (Т) са ефекторским ћелијама. Као *target* ћелије коришћене су ћелије туморске линије 4Т1. Тест је извођен у микротитар плочама (МТР) са 96 бунарчића са равним дном (SARSTED).

Тест мери активност ензима сукцинат дехидрогеназе (митохондријална редуктаза) који је активан само у живим ћелијама. Одабир супстрата за овај ензим тако да пролази кроз ћелијске мембране а да мења боју током реакције, омогућује корелацију интензитета промењене боје и броја живих ћелија. Тако компонента МТТ-а (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) тетразолијум (жуте боје) током редукције прелази у формаган (љубичасти продукт) па је интензитет љубичасте боје обрнуто пропорционалан броју мртвих ћелија. Тест се практично изводи тако што се **првог дана** у МТР постављају *target* ћелије припремљене на следећи начин: из ћелијске културе 4Т1 се подигну субконфлуентне ћелије у логаритамској фази раста, краткотрајним третирањем трипсином, и после провере вијабилности ресуспендују у комплетном медијуму (5×10^4 ћелија/ml комплетног медијума) тако да у сваком бунарчету буде по 5×10^3 ћелија у волумену од 100 μ l. МТР су центрифугирне 10 минута на 100G (да би ћелије што пре адхерирале за дно) и инкубиране преко ноћи (37°C; 5% CO₂). **Другог дана** је одливен супернатант и у свако бунарче додате су ефекторске ћелије у волумену од 100 μ l. Након додавања ефекторских ћелија, плоче су центрифугирне 10 минута на 100G, да би се убрзао контакт таргета и ефектора, и инкубиране преко ноћи (37°C; 5% CO₂). Ефекторске ћелије (Е) су кокултивисне са *target* ћелијама (Т) у трипликатима и у четири различита односа (337, 338, 356, 357). Ти односи су били за спленоците и ћелије изоловане из лимфног чвора 1:100, 1:50, 1:20 и 1:10, а за адхерентне ћелије, изоловане $CD8^+$ Т лимфоците и NK ћелије 1:10, 1:5, 1:2 и 1:1. **Трећег дана** теста најпре је одливен супернатант из МТР, а онда су све плоче пажљиво опране три пута са по 200 μ l комплетног медијума за свако бунарче. Након испирања у бунарчиће је сипано 100 μ l радног раствора МТТ па је уследила инкубација у трајању 4 часа (37°C; 5% CO₂). Радни раствор МТТ-а направљен је

разблаживањем МТТ штока (5mg МТТ/ml PBS-a) 1:5 у комплетном медијуму. Овај радни раствор као и комплетни медијум загрејани су до 37 °С. По истеку инкубације одливан је супернатант а у бунарчиће је додато по 200µl DMSO/глицински пуфер (175µl DMSO; Sigma и 25µl глицински пуфер), да би се растворили кристали формазана. Након 30 минута на собној температури уз мешање на шејкеру читава се оптичка густина на Microplate reader-у (Zenyth, Anthos, UK) на таласној дужини од 570nm (за сваки узорак у трипликату).

Процент цитотоксичности је одређиван према формули (294):

$$\text{цитотоксичност(\%)} = \left[1 - \frac{\text{ефекторске и туморске ћелије}}{\text{ефекторске ћелије (апсорбанца)}} \right] \times 100$$

Цитотоксичност је изражавана и кроз литичке јединице LU₂₀/10⁷ ћелија. Литичка јединица сумарно приказује цитотоксички потенцијал за четири различита односа Т: Е.

3.16. Мерење серумске концентрације IL-4, IL-10, TGF-β, IFN-γ, IL-17 и TNF-α

Тридесетпетог дана експеримента, након жртвовања животиња узета им је крв из трбушне аорте, инсулинским системом (шприц и игла G21), и центрифугирана 10 минута на 300G. Затим је серум за сваког појединачног миша издвојен аутоматском пипетом и остављен на -20°C до извођења анализе.

Концентрације цитокина (IL-4, IL-10, TGF-β, IFN-γ, IL-17 и TNF-α) у серуму одређиване су комерцијалним ELISA китовима специфичним за мишје цитокине (Mouse IL-4 DuoSet ELISA Development kit; Mouse IL-10 DuoSet ELISA Development kit; mouse TGF-β DuoSet ELISA Development kit, R&D Systems, USA; Mouse IFN-γ DuoSet ELISA Development kit; Mouse IL-17 DuoSet ELISA Development kit, R&D Systems, USA; mouse TNF-α /TNFSF1A DuoSet ELISA Development kit, R&D Systems, USA).

Стандарди су пре употребе растворени у PBS-у (pH 7.2), тако да почетне концентрације буду 2000pg/ml. Од оваквих штокова направљена су серијска растућа разблажења у 7 тачака у комерцијалном растварачу, према упутству произвођача.

100µl радне концентрације везујућег антитела (енгл. Capture Antibody) сипано је у бунарчиће полистиренских микротитар плоча (енгл. microtiter plate- MTP) са 96 бунарчића са равним дном (SARSTED). Плоче су прелепљене адхезивном фолијом (енгл. ELISA Plate Sealers) и остављене преко ноћи на собној температури, након чега су бунарчићи испрани пуфером за испирање (енгл. Wash Buffer) у аутоматској машини за испирање MTP-а. Затим је у све бунарчиће додат блокирајући пуфер (Block Buffer, 1% BSA у PBS-у) финалног волумена 300µl и MTP су остављене минимум један сат на собној температури, а потом испране пуфером за испирање. Сви узорци су претходно разблажени 10 пута у дејонизованој води. Разблажени узорци и припремљени стандарди насути су у MTP, прекривени адхезивном фолијом и остављени два сата на собној температури. Након инкубације и испирања MTP, у све бунарчиће је додато 100µl радне концентрације детекционог антитела (енгл. Detection Antibody), плоче су обложене адхезивном фолијом и поново остављене два сата на собној температури. Плоче су потом испране, а у бунарчиће сипано 100µl радне концентрације Streptavidin-HRP (енгл. Streptavidin horseradish peroxidase). Инкубација на собној температури и без директног излагања светлости прекинута је након 20 минута, испирањем MTP-а. У бунарчиће је сипано 100µl раствора субстрата (енгл. Substrate Solution: Color reagent A + Color reagent B, 1:1). Двадесет минута касније, додато је 50µl стоп раствора (енгл. Stop Solution: 2N H₂SO₄) и апсорбанца је мерена одмах у сваком бунарчету, помоћу Microplate reader-а (Zenyth, Anthos, UK) подешеног на 450nm.

Све измерене вредности су умањене за вредности апсорбанце слепе пробе (дејонизована вода). На основу измерених вредности стандарда направљена је стандардна крива, а помоћу ње су израчунате вредности за сваки појединачан узорак. Сви узорци су мерени у трипликату.

3.17. Статистичка обрада података

Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 13. Анализа линеарне регресије је коришћена за испитивање корелације између две варијабле. Пре статистичке обраде података, прво је тестирана нормалност расподеле вредности анализираних параметара (величина узорка одређује врсту теста који се користи). Уколико су вредности имале нормалну расподелу коришћен је параметарски *Student*-ов *t* тест, док је у случају одступања од нормалне расподеле коришћен непараметарски *Mann-Whitney*-ев тест. У анализама где су поређене више од две групе, коришћени су параметарски ANOVA (енгл. *analysis of variance*, ANOVA) или непараметарски *Kruskal-Wallis*-ов тест. Резултати експеримента су изражени као средња вредност \pm стандардна грешка (SE) за приказивање клиничких скорова, а остали резултати су приказани као средња вредност + стандардна девијација (SD). За статистички значајну разлику у добијеним вредностима између група сматра се када је $*p < 0.05$, док је статистички веома значајна разлика када је $** p < 0.01$.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Интравенска апликација hMSC поспешује раст примарног тумора дојке на дозно зависан начин

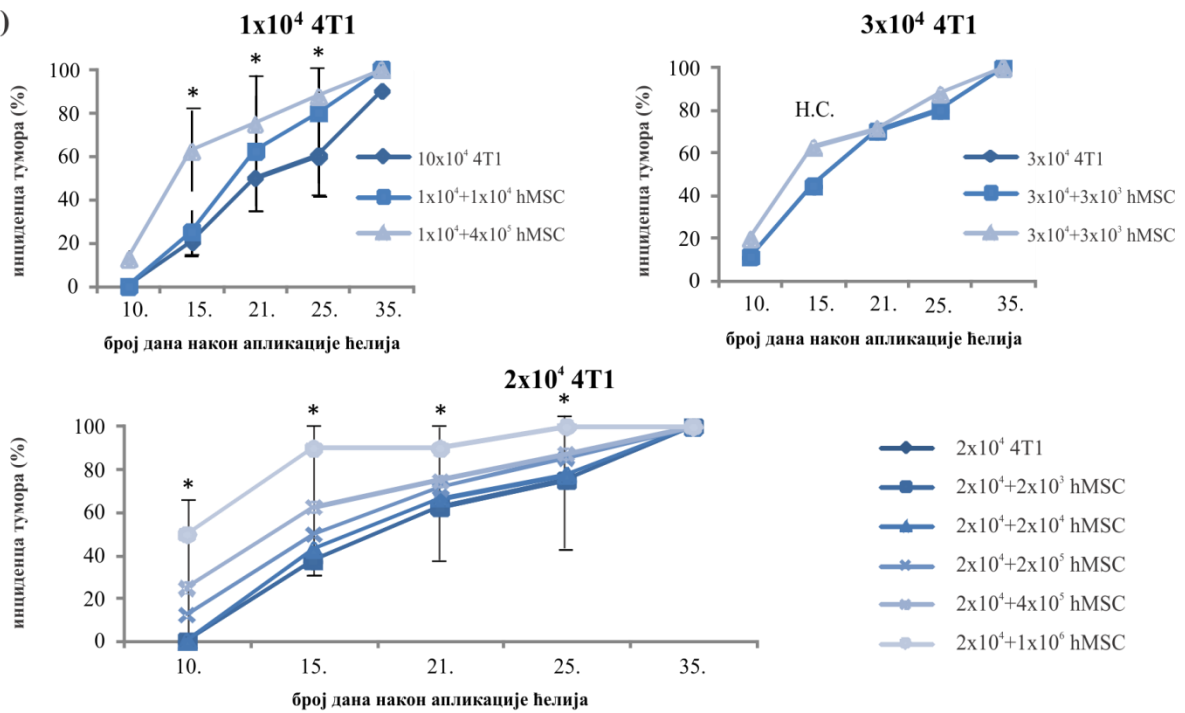
Да би се утврдило да ли и у ком броју hMSC утичу на раст примарног тумора коришћени су инбредне мишице BALB/c соја ("wild type", WT) којима су у четврту млечну жлезду убризгаване 4T1 туморске ћелије. Бројне студије су проучавале утицај MSC на раст тумора, тачније њихове про- или антитуморске активности (169, 168, 203, 204, 227, 228). Различит број туморских и MSC ћелија као и њихови међусобни нумерички односи коришћени у овим истраживањима очигледно су значајно допринели контрадикторности резултата у погледу утицаја MSC на раст тумора (274, 280, 295).

У овом истраживању вариран је број hMSC (од 2×10^3 до 1×10^6) убризгаваних интравенски мишицама истог дана када су им у четврту млечну жлезду трансплантиране ћелије 4T1 тумора у концентрацијама од 1×10^4 до 3×10^4 (Табела 1). Појављивање тумора је праћено палпацијом, два пута недељно, док је укупан волумен одређиван 35-ог дана експеримента, односно приликом жртвовања животиња.

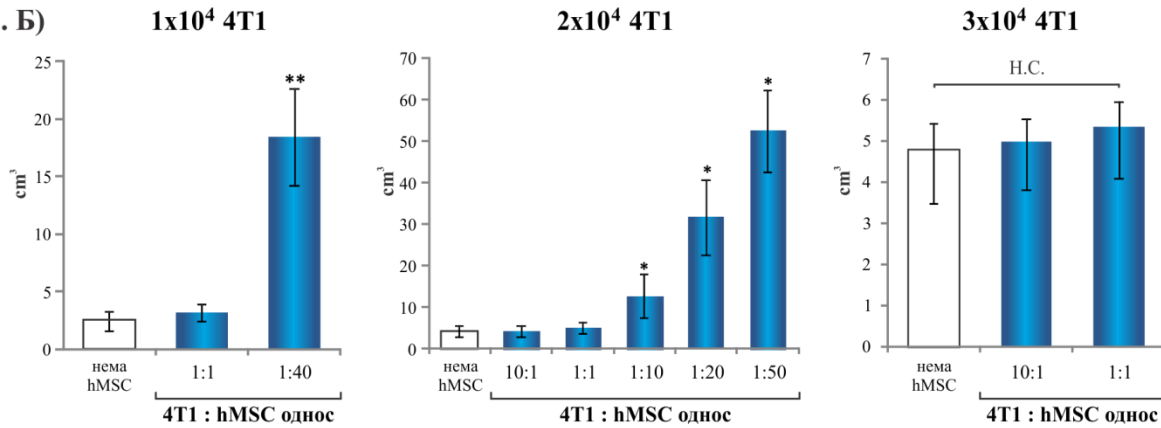
АПЛИКОВАНЕ ЋЕЛИЈЕ	ВОЛУМЕН ТУМОРА (cm ³) средња вредност ± SEM
1×10^4 4T1	0.249±0.08
1×10^4 4T1 + 1×10^4 hMSC	0.32±0.07
1×10^4 4T1 + 4×10^5 hMSC	1.84±0.42
2×10^4 4T1	0.41±0.01
2×10^4 4T1 + 2×10^3 hMSC	0.42±0.01
2×10^4 4T1 + 2×10^4 hMSC	0.50±0.01
2×10^4 4T1 + 2×10^5 hMSC	1.26±0.5
2×10^4 4T1 + 4×10^5 hMSC	3.16±0.8
2×10^4 4T1 + 1×10^6 hMSC	5.25±0.98
3×10^4 4T1	0.47±0.06
3×10^4 4T1 + 3×10^3 hMSC	0.49±0.05
3×10^4 4T1 + 3×10^4 hMSC	0.53±0.06

Табела 1. Ефекат бројчаног однос 4T1 и hMSC на волумен тумора 35-ог дана. Приказани су различити бројчани односи туморских и матичних ћелија и уочава се јасна корелација између броја апликованих hMSC и волумена тумора.

1. А)

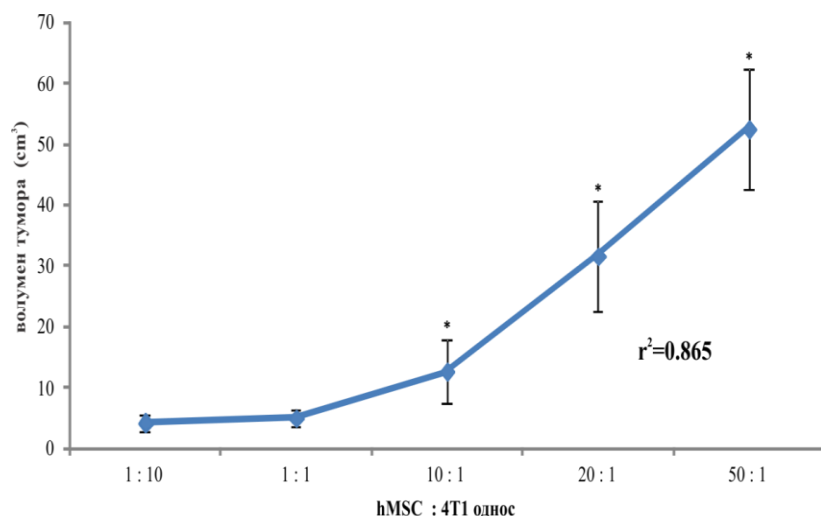


1. Б)



Графикон 1. Системски апликоване hMSC повећавају инциденцу појављивања и волумен тумора. Експериментални тумор дојке је индукован убризгавањем различитог број 4T1 туморских ћелија са или без системски апликованим hMSC у концентрацијама од 2×10^3 до 1×10^6 . Инциденца појављивања (1А) и волумен тумора (1Б) су приказан као средња вредност \pm SEM три независна експеримента са укупно 27 BALB/c мишева (* $p < 0.05$). Статистичка значајност одређивана је *Kruskal-Wallis* тестом. Скраћеница Н.С.-није сигнификантно.

Приказани резултати показују да се код BALB/c мишева који су примили hMSC, палпабилни тумор појављује раније (**Графикон 1А**) и да је запремина примарног тумора 35-ог дана (**Графикон 1Б**) експеримента знатно већа ($p < 0.05$; **Графикон 1**). На време појављивања палпабилног тумора и његову запремину не утиче број 4Т1 ћелија већ број системски апликованих hMSC. У том циљу анализирана је повезаност односа 4Т1: hMSC и запремине примарног тумора 35-ог дана експеримента и као што се види на **Графикону 2**, анализом линеарне регресије показано је да постоји јака позитивна корелација између волумена тумора и овог односа. У свим даљим експериментима овог истраживања коришћено је 2×10^4 4Т1 и 4×10^5 hMSC (најмањи број апликованих 4Т1 и hMSC који показује разлику у инциденци појављивања и волумену примарног тумора а даје најдуже преживљавање мишева).



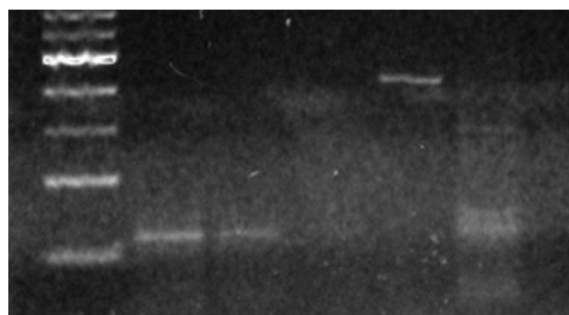
Графикон 2. Однос 4Т1: hMSC утиче на раст тумора. Линеарном регресијом је показана статистички значајна корелација између броја ињектованих hMSC и волумена тумора. ($R^2 = 0.865$). Волумени примарних тумора су приказани као средње вредности \pm SEM из три посебна експеримента.

4.2. hMSC одлазе у туморско ткиво и удаљене органе и у неким од њих опстају и до 35-ог дана

Након што је уочено да hMSC поспешују раст тумора испитано је да ли hMSC, апликоване интравенски, поседују тропизам и за туморско ткиво. У том циљу анализирана је способност и селективност миграције системски апликованих hMSC.

У до сада објављеној литератури познато је да мезенхималне матичне ћелије поседују способност миграције и инкорпорације у туморску средину (84, 191). Тропизам MSC за туморско ткиво зависи како од директног контакта са другим ћелијама тако и од бројних паракриних сигнала (177, 179). Мишеви су жртвовани првог и трећег дана након апликације ћелија, када је и утврђивано постојање ДНК хуманог порекла у крви, лимфном чвору, слезини, јетри, плућима и туморском ткиву (Слика 1. Б). Хумани *CYP1A1* ген је коришћен за детекцију ДНК хуманог порекла у сваком узорку мишјег ткива након екстракције ДНК.

1. А)



MW β-actin β-actin CYP1A1
маркер (337 bp) (337 bp) (312 bp)

1. Б)

време апликације hMSC	1	3
крв		
лимфни чворови		
слезина		
јетра		
плућа		
четврта млечна жлезда / тумор		

Слика 1. Биодистрибуција hMSC у ксеногеном домаћину. А) Репрезентативна фотографија електрофорезе на гелу, где су детектовани производи *CYP1A1* (312 bp) и β -actin гена (337 bp) и приказан MW маркери. Величина маркера је представљена као 1 μ g ДНК за 1 kb-ДНК лествице. Б) Репрезентативни узорци PCR анализе показују миграцију hMSC. Хумани *CYP1A1* ген, без укрштене реактивности са мишјом ДНК, детектован је у тумору, крви, лимфном чвору, слезини, јетри и плућима 1. и 3. дана експеримента. Приказане су репрезентативне фототографије из 3 различита експеримента са по 9 мишева; MW маркери-енгл. molecular weight markers.

Хумани *CYP1A1* ген без унакрсне реактивности са мишјом ДНК је детектован PCR анализом у тумору, крви, лимфном чвору, слезини, јетри и плућима првог и трећег дана

експеримента. На **Слици 1.** приказане су репрезентативне фотографије анализе амплификованих продуката добијених PCR реакцијом са хуманим *CYP1A1* прајмерима и геномском ДНК миша. Показано је да hMSC након системске администрације у имунокомпетентне BALB/c мишеве, мигрирају до тумора и других удаљених органа.

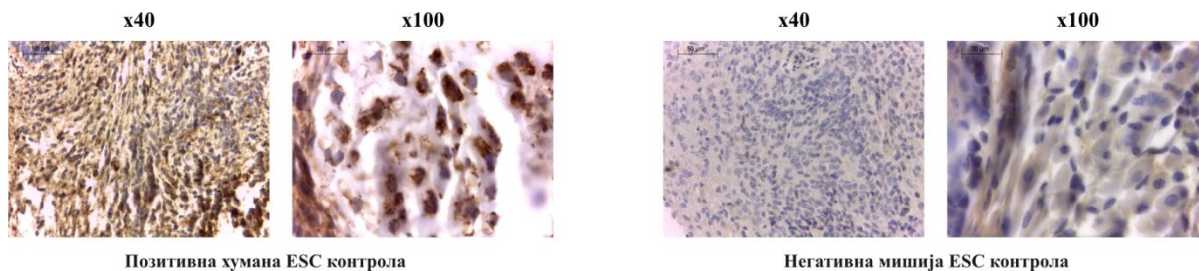
Мало се зна о томе колико MSC могу опстати у туморском и другим ткивима, као и какав ефекат остварују на удаљене органе.

Како је показана биодистрибуција и потенцијал hMSC да мигрирају до различитих ткива у BALB/c мишу, у наставку истраживања испитивано је и колико дуго hMSC могу да преживе у ксеногеном домаћину. Дакле, због чињенице да је детекција хуманих митохондрија сигуран показатељ присуства хуманих ћелија, покушана је детекција митохондријалних протеина хуманог порекла у ткиву плућа и јетре мишева којима су системски апликоване hMSC, имунохистохемијском техником.

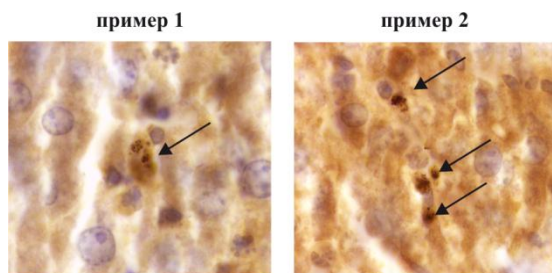
35-ог дана експеримента, испитивано је присуство митохондријалних протеина хуманог порекла коришћењем анти-хуманих митохондријалних антитела. Као што је приказано на **Слици 2. Ц**, hMSC су присутне 35-ог дана у ткиву јетре док их у плућима трансплантираних мишева нема (**Слика 2. Д**).

2. А)

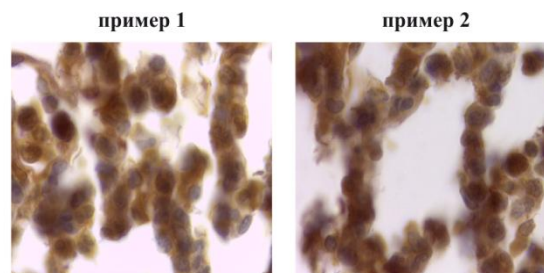
2. Б)



2. Ц)



2.Д)



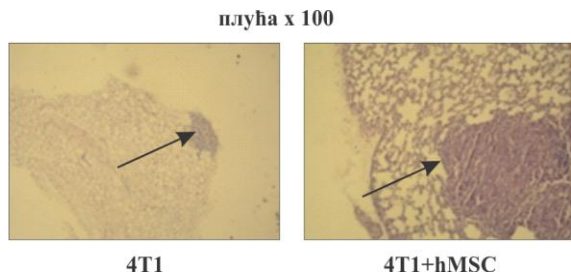
Слика 2. Имунохистхемијска детекција хуманих митохондријалних протеина. Фотомикрографије показују присуство хуманих митохондријалних маркера у ткивима (2А и 2Ц). Позитивни сигнали су детектовани у хуманој ESC контролној групи (2А) и у јетри мишева који су примили 2×10^4 4Т1 и 4×10^5 hMSC (2Ц), али нема убедљивих доказа о позитивно обојеним ћелијама у плућима исте експерименталне групе мишева (2Д). Скраћенице: ESC-embryonic stem cell.

4.3. Системска администрација hMSC поспешује раст метастатских колонија

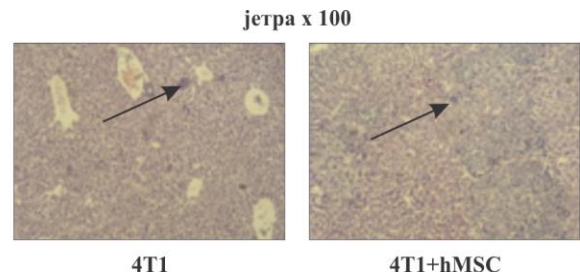
Нека од ранијих истраживања показују да утицај MSC на метастазирање и величину метастатских колонија зависи од врсте туморске линије карцинома дојке и начина апликовања ових ћелија (169). У том циљу патохистолошком анализом ткивних исечака препарата плућа и јетре испитивано је да ли hMSC, апликоване интравенски, могу утицати на метастазирање примарног 4Т1 тумора.

Код свих мишева (експерименталне 4Т1+hMSC и контролне 4Т1 групе) биле су присутне метастазе у јетри и плућима. Патохистолошка анализа ткивних исечака плућа и јетре показала је значајно веће метастатске колоније у експерименталној 4Т1+hMSC групи мишева (Слика 3. А) у поређењу са метастатским колонијама у ткивима плућа и јетре код 4Т1 контролне групе мишева (Слика 3. Б).

3. А)



3. Б)

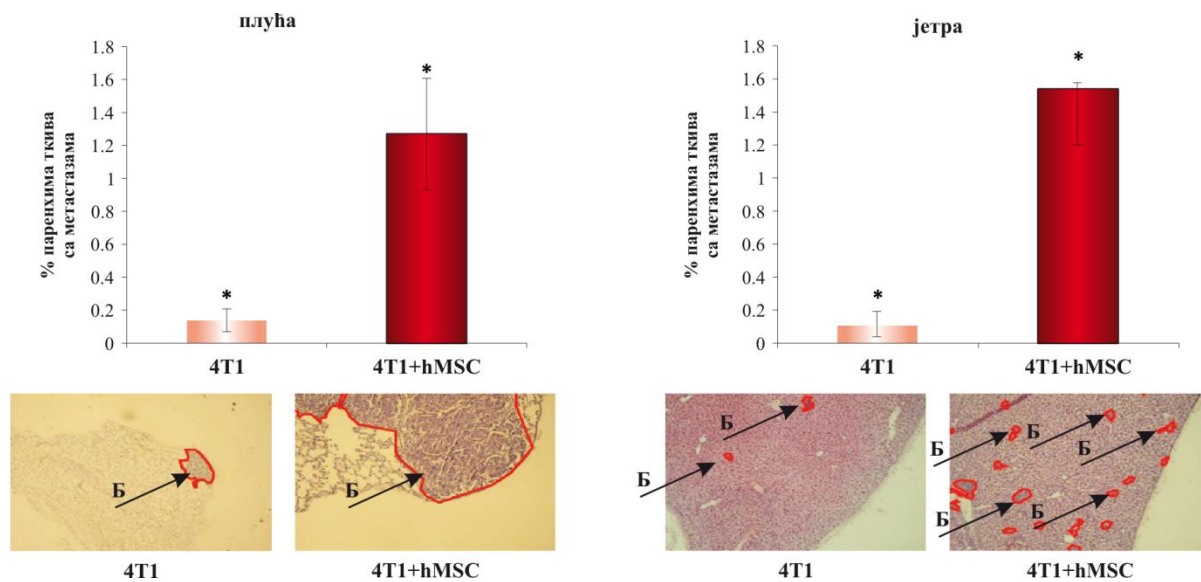


Слика 3. Репрезентативни исечци плућа и јетре обојени стандарним патохистолошким бојењем (H&E). Метастатска поља су означена стрелицама (увећање x 100).

Резултати дескриптивне хистологије потврђени су и семи-квантитативном методом коришћењем програма Autodesk AutoCAD 2009 (Слика 4). Статистички значајно већи проценат метастатског ткива ($p < 0.05$) је уочен у плућима и јетри мишева третираних hMSC (Слика 4) у поређењу са истим ткивима мишева не третираних истим ћелијама (Слика 4. А и Б).

4. А)

4. Б)



Слика 4. Семи-квантитативни метод за одређивање величине метастатских колонија. У поређењу са 4T1+hMSC групом мишева, статистички значајно мањи проценат метастатског ткива уочен је у плућима ($0,14 \pm 0,07\%$ vs. $1,27 \pm 0,34\%$) и јетри ($0,11 \pm 0,08\%$ vs. $1,54 \pm 0,04\%$) мишева из 4T1 групе. На графикону су представљени резултати 3 експеримента са 9 мишева по групи (средња вредност \pm SEM, $p < 0.05$), док је сликама приказан метод рада у програму Autodesk AutoCAD 2009 (са „Б“ су обележена метастатска поља).

До сада приказани резултати јасно показују да интравенска апликација hMSC промовише метастазирање 4T1 експерименталног тумора дојке.

4.4. На експресија STAT3 молекула у туморском ткиву не утичу инјектиране hMSC

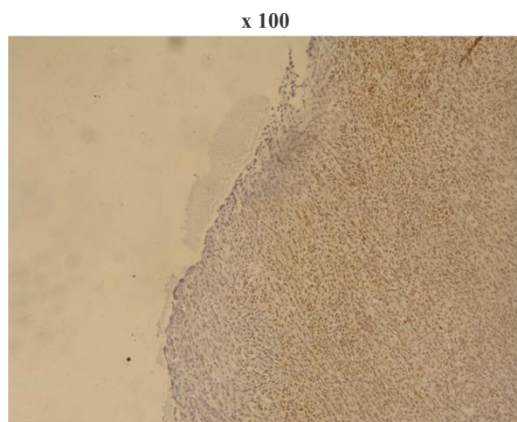
Након што је уочено да системски апликоване hMSC поседују тумор промовишуће способности испитивани су и могући механизми ових ефеката.

Деценијама су истраживања у области биологије тумора фокусирана на проналажењу и проучавању нових онкогена и њихових активатора или репресора (7, 8). Последњих година откривени су бројни нови онкогени међу којима је и *STAT3* (40). Активирани, то јест фосфорилисани *STAT3* учествује у онкогенези тумора дојке (45) а његову активацију могу покренути бројни аутокрини и паракрини фактори раста секретовани из различитих ћелија (51).

У наставку истраживања испитивано је да ли hMSC убрзава прогрессију тумора тако што утичу на фосфорилацију STAT3. Имунохистохемијски је анализирана експресија фосфорилисаног STAT3 у туморском ткиву 4T1+hMSC (Слика 5. А) мишева и поређена са експресијом овог молекула у истој врсти ткива код 4T1 мишева (Слика 5. Б).

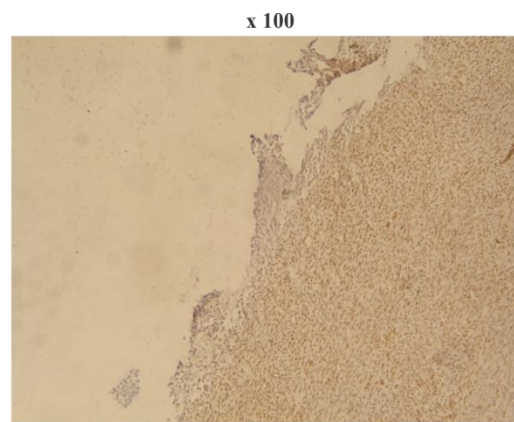
Разлика у експресији фосфорилисаног STAT3 између 4T1+hMSC и 4T1 групе, није статистички значајна, што је и приказано на репрезентативним фотографијама (Слика 5).

5. А)



4T1

5. Б)



4T1+hMSC

Слика 5. Имунохистохемијска детекција фосфорилисаног STAT3. На репрезентативним фотографијама уочавају се позитивни сигнали (браон обојене ћелије) у туморском ткиву и 4T1+hMSC (5А) и 4T1 (5Б) групе. Анализом експресије од стране три независна посматрача, није детектована разлика у експресији STAT3.

Након што је показано да hMSC не мењају експресију STAT3, а како је у ранијим студијама показано да MSC могу деловати на ћелије имунског система, у наставку истраживања испитиван је утицаја hMSC на имунски одговор оваквих мишева.

4.5. Интравенска апликација hMSC не мења укупну целуларност слезине али утиче на нумеричке односе лимфоцитних популација и субпопулација

Укупна целуларност као и заступљеност појединих лимфоцитних популација као што су Т лимфоцити (296) и NK ћелије (297) могу бити измењени у животињама оболелим од

малигнома. Добро је познато је да постојање тумора утиче на промену целуларности слезине (298), а не постоје подаци да ли убризгавање hMSC може променити укупну целуларност и заступљеност појединих субпопулација у слезини. Зато је у следећем кораку проточном цитофлуорометријом анализирана популација моноклеарних ћелија у слезини.

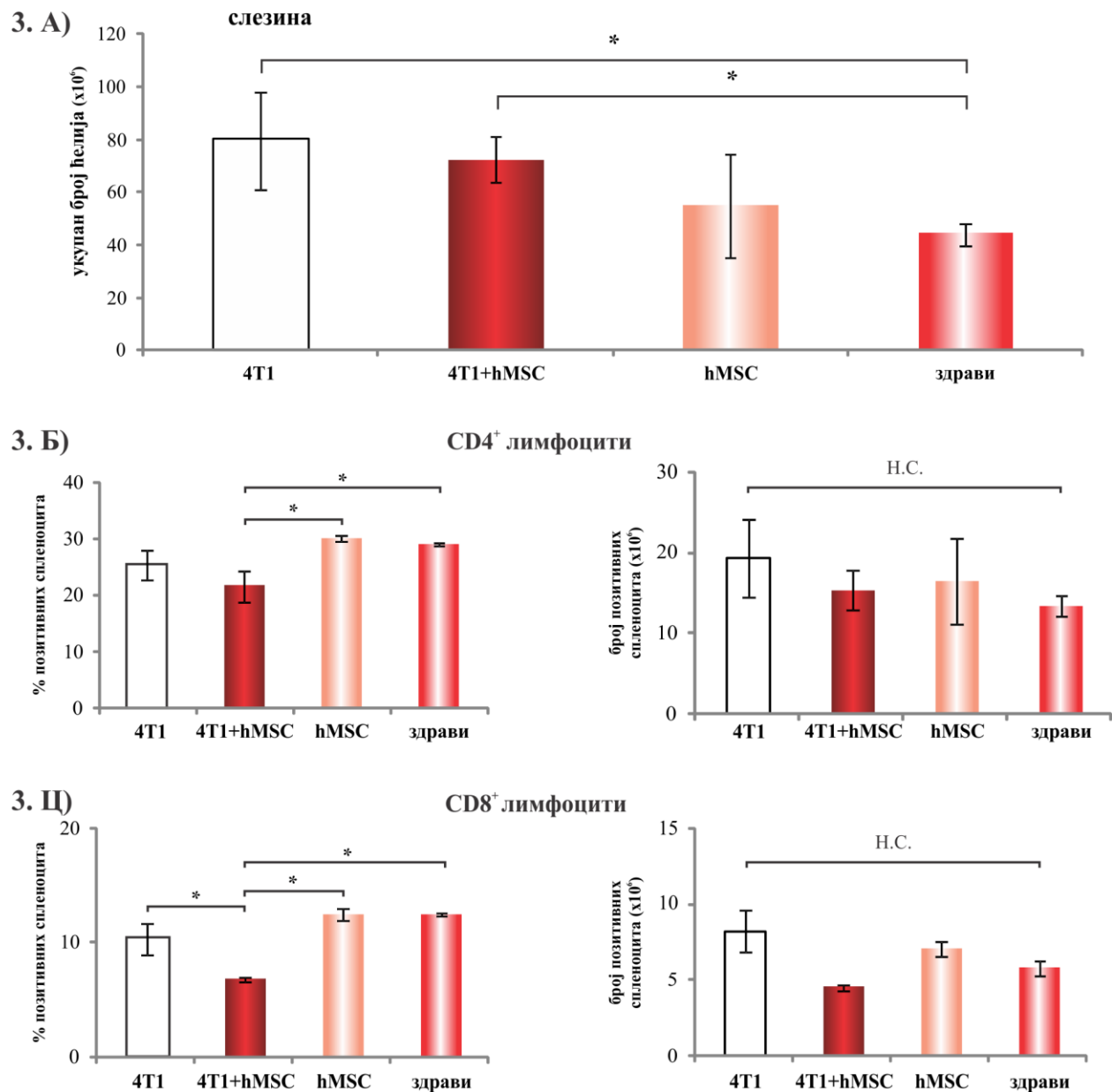
У том циљу коришћени су инбредни мишеви BALB/c соја ("wild type", WT). Укупно 36 мишева подељено је у четири групе. Прву експерименталну групу чинили су мишеви којима је у четврту млечну жлезду апликовано 2×10^4 4T1 ћелија и означена је као 4T1 група (n=9). У другој експерименталној групи били су мишеви којима је у четврту млечну жлезду апликовано 2×10^4 4T1 ћелија, а системски кроз репну вену 4×10^5 hMSC, група је означена као 4T1+ hMSC (n=9). Трећа група је била контролна и њу су чинили мишеви којима је системски кроз репну вену апликовано 4×10^5 hMSC, означена као hMSC група (n=9). Четврта група такође контролна, је састављена од здравих мишева, то јест мишева који нису третирани ни једном врстом ћелија а боравили су у истим условима као претходне три групе, и означена као здрава група (n=9). Сви мишеви експерименталних и контролних група су жртвовани 35 дана након апликације ћелија.

Целуларност слезине. Укупан број ћелија у слезини битно се разликује само између групе здравих и експерименталних група (4T1 и 4T1+hMSC). Укупан број ћелија у слезини у 4T1 групи ($79.6 \pm 18.3 \times 10^6$) као и у 4T1+hMSC групи ($72.3 \pm 8,7 \times 10^6$), статистички је значајно већи у поређењу са групом здравих мишева ($44.0 \pm 4,1 \times 10^6$; $p < 0.05$), док у поређењу са контролном hMSC ($54.8 \pm 19.6 \times 10^6$; $p > 0.05$) није детектована статистичка значајност (**Графикон 3. А**). Очигледно да системска апликација hMSC не утиче на повећање целуларности слезине, а регистроване статистички значајне разлике су вероватно последица развоја тумора.

Нумерички однос лимфоцитних популација и субпопулација. Регистроване су значајне разлике у релативној заступљености појединих лимфоцитних популација између испитиваних група BALB/C мишева. Анализом фенотипа моноклеарних ћелија присутних у слезини, детектоване су разлике у релативној заступљености CD4⁺ Т лимфоцита (**Графиконом 4. А приказани су репрезентативни дотплотови**).

Иако је у групи 4T1+hMSC детектован најмањи проценат CD4⁺ Т ћелија (21.6±2.7%), статистички значајна разлика потврђена је само између ове групе и обе контролне (hMSC 30.0±0.4% и здраве 29.0±0.2%; p<0.05). Никакве разлике у апсолутном броју CD4⁺ Т лимфоцита у испитиваним групама нису детектоване (**Графикон 3. Б**).

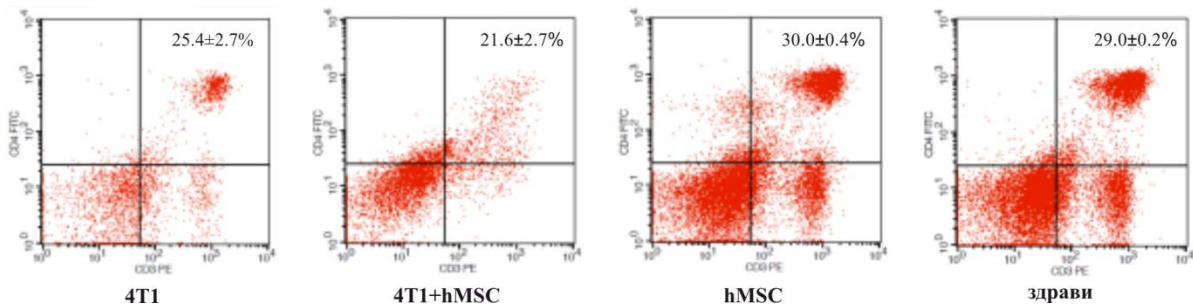
Убризавање hMSC утицало је на смањење процента CD8⁺ Т лимфоцита у групи 4T1+hMSC (6.8±0.2%) мишева у поређењу са свим осталим групама (4T1 10.3±1.6%, p<0.05; vs hMSC 12.5±0.5% vs здраве 12.5±0.1%; p<0.01), међутим као што се може видети на **Графикону 3. Ц**, разлике у апсолутним бројевима ових ћелија иако истосмерне не досежу ниво статистичке значајности (**Графиконом 4. Б приказани су репрезентативни дотплотови**).



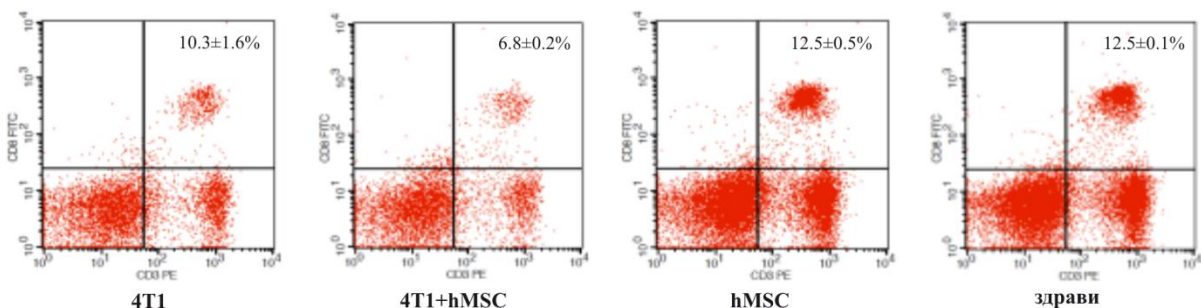
Графикон 3. Цитометријска анализа ћелијског састава слезине 35-ог дана експеримента. А) Целуларност слезине мишева значајно је измењена 35. дана експеримента само између групе здравих и експерименталних 4T1 и 4T1+hMSC група мишева (* $p < 0.05$). Б) У 4T1+hMSC групи детектован је најмањи проценат CD4⁺ Т ћелија и статистички значајан само према контролним групама (* $p < 0.05$), међугрупне разлике у апсолутном броју ових ћелија није било ($p > 0.05$ или скр. Н.С.-није сигнификантно). Ц) Убризавање hMSC изазвало је у слезини значајно смањење процента CD8⁺ Т лимфоцита код 4T1+hMSC мишева у поређењу са свим осталим групама, што није у корелацији са апсолутним бројем ових ћелија

(* $p < 0.05$). Приказане вредности су средња вредност \pm SEM једног репрезентативног експеримента са укупно 9 мишева у свакој групи. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney*-евим тестом.

4. А)



4. Б)



Графикон 4. Репрезентативни дот плетиви цитометријске анализе слезине. Приказани су репрезентативни дот плетови CD4⁺ (А) и CD8⁺ (Б) ћелија свих експерименталних и контролних група.

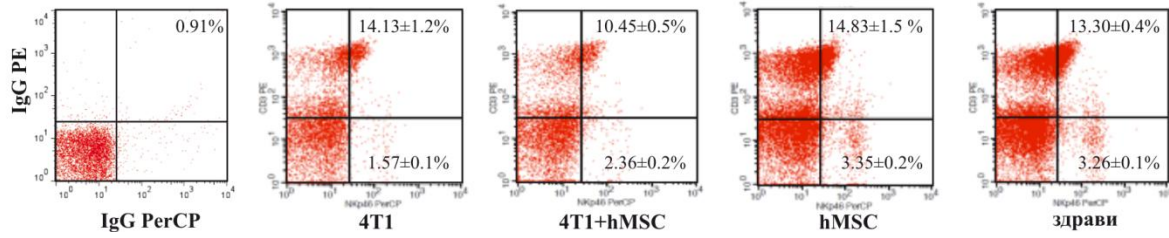
Заступљеност CD3⁻NKp46⁺ (NK) и CD3⁺NKp46⁺ (NKT-like) лимфоцита. NK ћелије су дефинисане као CD3⁻NKp46⁺. NKp46⁺ (CD335) је трансмембрански гликопротеин који је сврстан у фамилију цитотоксичких рецептора (енгл. Natural Cytotoxicity Receptor, NCR) и селективно је експримиран на NK ћелијама мишева како незрелим тако и зрелим (299-302). Овај молекул експримиран је и на неким субпопулацијама NKT ћелија као што су CD3⁺NKp46⁺ Т лимфоцит то јест NKT-like (303). Иако лиганд за овај рецептор још није познат зна се да NKp46 рецептор игра значајну улогу у елиминацији вирусом инфицираних и туморских ћелија (299-302).

Као што се види на **Графикону 5. Б**, постоји статистички значајан пад ($p < 0.05$) процентуалне заступљености NK ћелија у обе експерименталне групе (4T1 $1.6 \pm 0.1\%$; 4T1+hMSC $2.3 \pm 0.2\%$) у поређењу са контролним групама (hMSC $3.4 \pm 0.2\%$; здраве $3.2 \pm 0.1\%$; $p < 0.05$), док разлике у апсолутном броју ових ћелија нису регистроване (4T1 $1.4 \pm 0.3 \times 10^6$ vs 4T1+hMSC $1.7 \pm 0.4 \times 10^6$ vs hMSC $1.9 \pm 0.4 \times 10^6$ vs здраве $1.5 \pm 0.1 \times 10^6$; $p > 0.05$). **Графиконом 5. А** приказани су репрезентативни дот плотови.

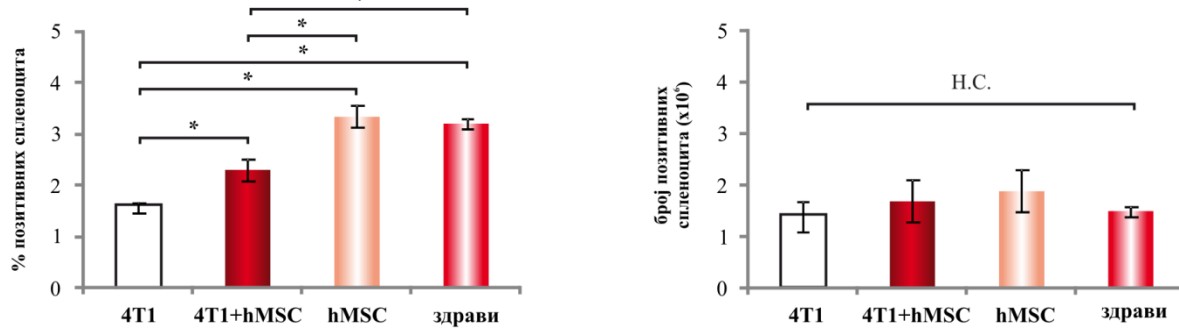
NKT ћелије играју важну улогу у антитуморском имунском одговору а њихов антитуморски потенцијал показан је у бројним студијама (304, 305). Стога смо у овој студији анализирали процентуалну заступљеност и апсолутни број $CD3^+NKp46^+$ NKT-like ћелија.

Уочили смо да је статистички значајно мањи проценат NKT-like ћелија 35-ог дана експеримента присутан у слезини 4T1+hMSC мишева ($10.45 \pm 0.5\%$) у поређењу са процентом ових ћелија у слезини преостале три групе мишева (4T1 $14.1 \pm 1.2\%$ vs hMSC $14.8 \pm 1.5\%$ vs здраве $13.3 \pm 0.4\%$; $p < 0.05$). Апсолутни број NKT-like ћелија у слезини 4T1+hMSC ($5.6 \pm 1.0 \times 10^6$) ових мишева је значајно мањи у поређењу са 4T1 групом ($12.4 \pm 5.6 \times 10^6$; $p < 0.05$) али не и у односу са hMSC ($8.1 \pm 2.6 \times 10^6$; $p > 0.05$) и здравом групом ($6.1 \pm 1.4 \times 10^6$; $p > 0.05$). Статистички значајна разлика је забележена и између 4T1 и здравих мишева ($p < 0.05$) (**Графикон 5. Ц**).

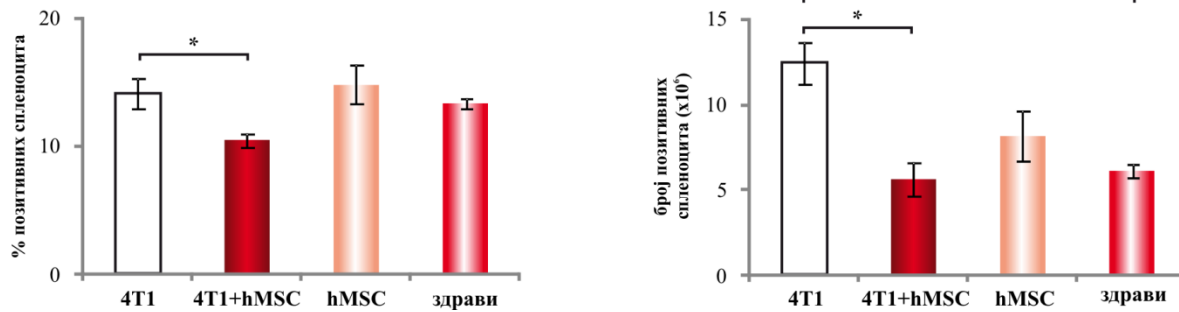
5. A)



5. Б) CD3⁺NKp46⁺



5. Ц) CD3⁺NKp46⁺NKT-like

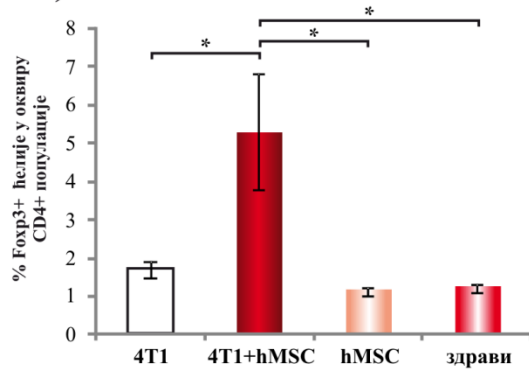


Графикон 5. Системска администрација hMSC не утиче на заступљеност NK ћелија, али значајно смањује удео NKT-like ћелија. А) Приказани су репрезентативни дот плотови CD3⁺NKp46⁺ NK и CD3⁺NKp46⁺ NKT-like ћелија за све експерименталне и контролне групе. Б) Пад процентуалне заступљености CD3⁺NKp46⁺ NK ћелија детектован је у обе експерименталне групе у поређењу са контролним (*p<0.05), док разлика у апсолутном броју ових ћелија није детектована. Ц) Статистички значајно мањи проценат и апсолутан број CD3⁺NKp46⁺ NKT-like ћелија 35-ог дана експеримента детектован је у слезини 4T1+hMSC мишева у поређењу са преостале три групе мишева (*p>0.05). Приказане вредности су средња вредност ± SEM једног репрезентативног експеримента са укупно 9 мишева у свакој групи. Статистичка значајност одређивана је Mann-Whitney-евим тестом.

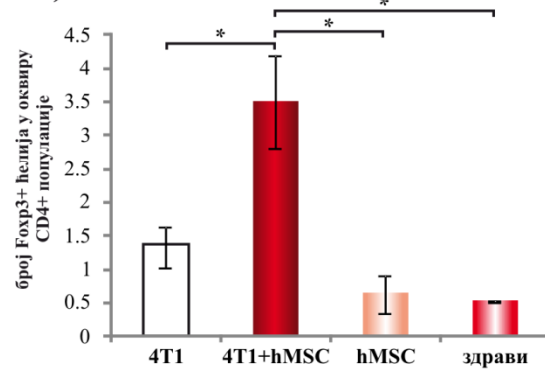
Регулаторни Т лимфоцити. Бројне студије указују на повећан број $CD4^+Foxp3^+T$ и $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ регулаторних лимфоцита током имунског одговора на различите туморе (306, 307). Ови лимфоцити играју значајну улогу у регулацији урођеног и стеченог антитуморског имунског одговора (308). MSC поспешују генерисање регулаторних лимфоцита што је један од начина да заштите туморске ћелије од ефекторских ћелија имунског система (309).

Стога је у овој студији анализирана заступљеност $Foxp3^+$ Т регулаторних лимфоцита у оквиру $CD4^+$ популације ћелија у слезини 4T1, 4T1+ hMSC, hMSC и здравих мишева 35-ог дана експеримента. Значајно повећање процента (**Графикон 6. А**; $p<0.05$) и апсолутног броја (**Графикон 6. Б**; $p<0.05$) $Foxp3^+$ Т регулаторних лимфоцита, у оквиру $CD4^+$ популације, детектовано је у слезини 4T1+hMSC мишева, у поређењу са заступљеношћу ових ћелија у слезини преостале три групе мишева. **Графиконом 6. Ц** приказан је репрезентативни дот плот.

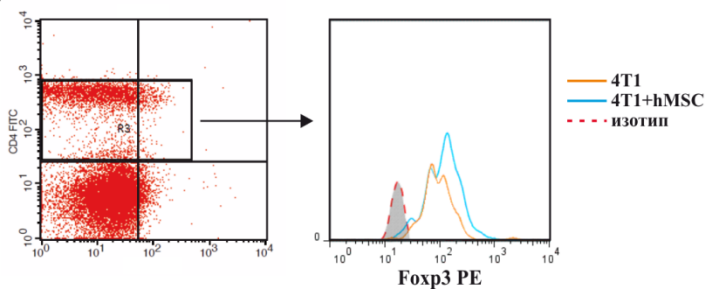
6. А)



6. Б)



6. Ц)



Графикон 6. Интравенски апликоване hMSC утичу на заступљеност Foxp3⁺ Т регулаторних лимфоцита у оквиру CD4⁺ ћелија у слезини мишева којима је индукован тумор дојке. А) Забележена је разлика у процентима Foxp3⁺Т регулаторних лимфоцита између 4T1+hMSC мишева (5.3±1.5%) у поређењу са остале три групе (4T1 1.7±0.2% vs hMSC 1.1±0.1% vs здраве 1.2±0.1%; *p<0.05). Б) Такође, значајна разлика детектована је и у укупном броју регулаторних ћелија између 4T1+hMSC мишева (3.5±0.7 ×10⁶) и преостале три групе (4T1 1.3±0.3 ×10⁶ vs hMSC 0.62±0.3 ×10⁶ vs здраве 0.5±0.01 ×10⁶; *p<0.05). Ц) Приказан је репрезентативни дот-плот Foxp3⁺ ћелија у оквиру CD4⁺ популације. Приказане вредности су средња вредност ± SEM једног репрезентативног експеримента са укупно 9 мишева у свакој групи. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney*-евим тестом.

До сада приказани резултати јасно показују да системска администрација hMSC смањује удео Т, НК, NKT-like лимфоцита, а повећава заступљеност регулаторних Т лимфоцита, што фаворизује настанак имunosупресивног окружења и може бити један од основних фацилитирајућих механизма важних за раст и метастазирање тумора.

4.6. Интравенска апликација hMSC смањује цитотоксичку активност укупних спленоцита, NK ћелија и CD8⁺ Т лимфоцита

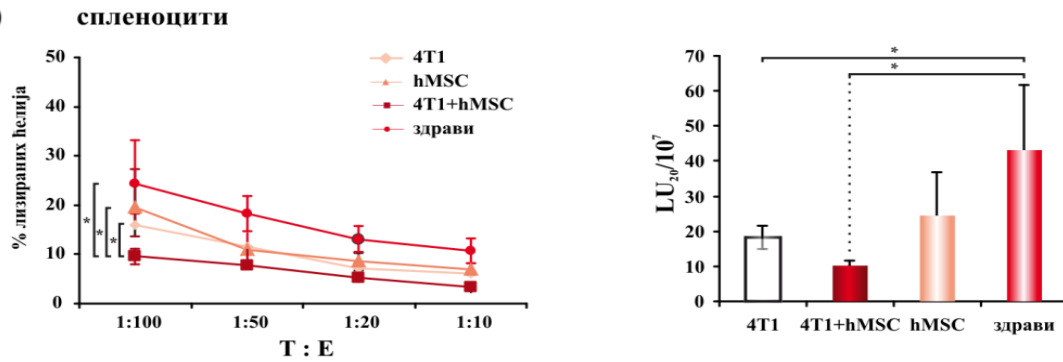
Тридесетпетог дана након системске администрације hMSC регистрована је смањена цитотоксичка активност укупних спленоцита у 4Т1+hMSC групи ($10.2 \pm 1.3 \text{ LU}_{20}/10^7$) у поређењу са здравим ($43.3 \pm 18.4 \text{ LU}_{20}/10^7$) али не и у поређењу са 4Т1 и hMSC групама ($p < 0.05$; **Графикон 7. А**).

У покушају да се прецизније одреди које субпопулације доприносе смањеној цитотоксичности спленоцита изолованих из 4Т1+hMSC мишева испитана је цитотоксичност CD8⁺Т лимфоцита и NK ћелија. Утврђено је да је цитотоксичност CD8⁺Т лимфоцита (изолованих негативном селекцијом на магнетном сепаратору) знатно смањена код 4Т1+hMSC ($165.7 \pm 20.3 \text{ LU}_{20}/10^7$) у поређењу са цитотоксичном способности CD8⁺Т лимфоцита изолованих из преостале три групе мишева (4Т1 $267.7 \pm 30.5 \text{ LU}_{20}/10^7$; $p < 0.05$ vs hMSC $466.0 \pm 51.4 \text{ LU}_{20}/10^7$; $p < 0.01$ vs здраве $343.4 \pm 52.8 \text{ LU}_{20}/10^7$; $p < 0.05$; **Графикон 7. Б**).

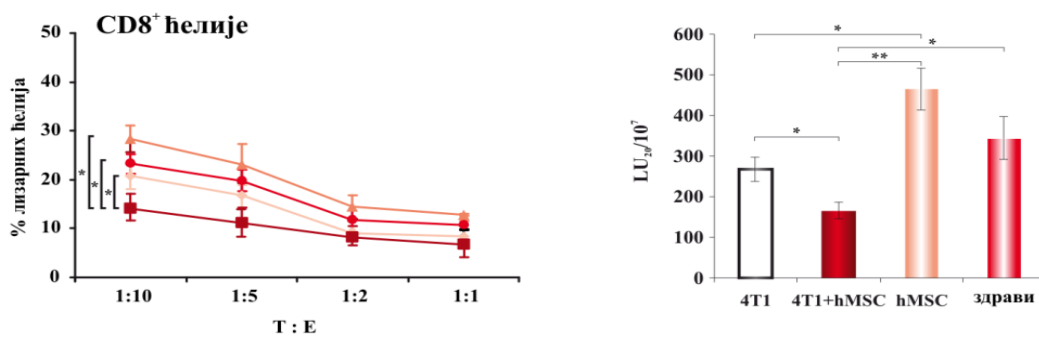
Потом су изоловане и CD49b⁺ NK ћелије (позитивном селекцијом на магнетном сепаратору) и испитана њихова цитотоксичност. NK ћелије из слезине 4Т1+hMSC мишева исказују значајно мању цитотоксичку активност ($213.8 \pm 47.8 \text{ LU}_{20}/10^7$) него NK ћелије из преостале три групе мишева (4Т1 $591.5.7 \pm 58.5 \text{ LU}_{20}/10^7$ vs hMSC $792.8 \pm 119.8 \text{ LU}_{20}/10^7$ vs здраве $1388.4 \pm 104.0 \text{ LU}_{20}/10^7$; $p < 0.01$; **Графикон 7. Ц**).

Приказани резултати цитотоксичне активности различитих субпопулација спленоцита показују да је цитотоксичност укупних спленоцита значајно мања код 4Т1+hMSC мишева и да је разлика у цитотоксичности највероватније последица умањене активности и CD8⁺Т лимфоцита и NK ћелија, настале због имуномодулаторних активности hMSC.

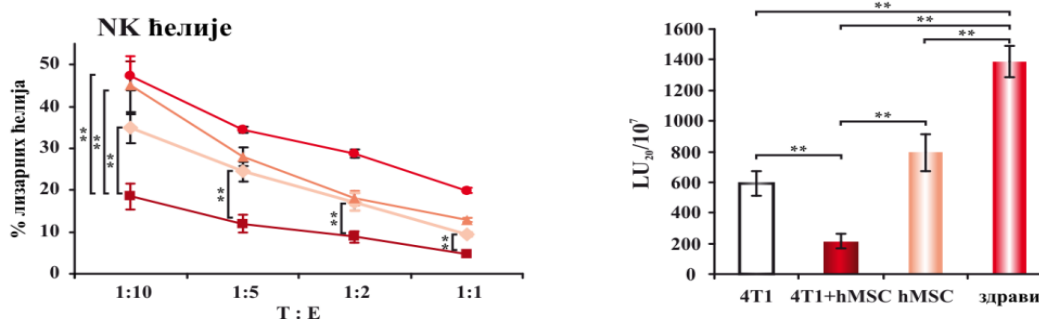
7. А)



7. Б)



7. Ц)



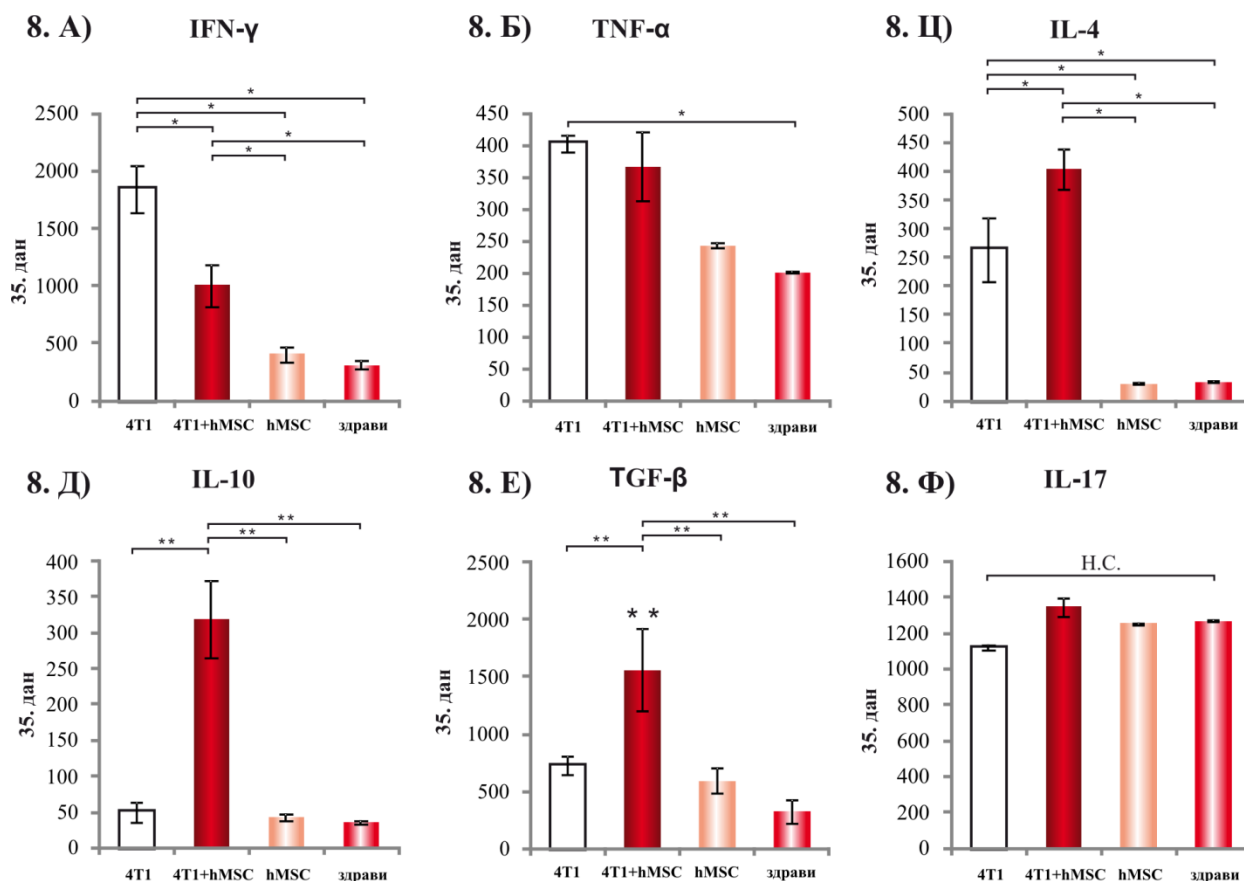
Графикон 7. Системска апликација hMSC смањује цитотоксичност укупних спленоцита, CD8⁺T лимфоцита и NK ћелија према 4T1 туморским ћелијама. Цитотоксичност ефекторских ћелија (спленоцити, CD8⁺T лимфоцити и NK ћелије) испитивана је четворочасовним МТТ тестом према 4T1 таргет ћелијама, у 4 различита односа ефектор: таргет. Резултати су представљени као средње вредности процената цитотоксичности и као литичке јединице (LU₂₀/10⁷), које су прерачунате на основу процената цитотоксичности за 4 различита односа ефектор: таргет. А) Цитотоксичност укупних спленоцита је значајно мања код 4T1+hMSC мишева у поређењу са 4T1, hMSC и здравим мишевима (*p<0.05). Б) Цитотоксичност CD8⁺T лимфоцити се такође разликује се између 4T1+hMSC и 4T1 (*p<0.05), hMSC (** p<0.01) и здравих мишева (*p<0.05). Ц) Цитотоксичност NK ћелије је најмања код 4T1+hMSC мишева и показује статистичку разлику према свим преосталим групама 4T1, hMSC и здравих мишева (** p<0.01). Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM из три експеримента, сваки са 9 мишева по групи. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney*-евим тестом.

4.7. Системска администрација hMSC повећава ниво Th2 цитокина у серуму током антитуморског имунског одговора

Имунски одговор на туморе преобладајуће ангажује цитотоксичне CD8⁺T лимфоците и NK ћелије. MSC поседују имуносупресивне способности као што су инхибиција цитотоксичке активности NK ћелија (121) и инхибиција пролиферације T лимфоцита кроз продукцију IL-10 (310). Након детекције редуковане цитотоксичке активности CD8⁺T лимфоцита и NK ћелија, као и повећаног броја T регулаторних лимфоцита узрок снижене антитуморске активности лимфоцита је тражен у могућој поларизацији Th1 у Th2 одговор. У покушају добијања одговора на ово питање мерен је ниво цитокина у серуму, 35-ог дана мишевима експерименталних (4T1 и 4T1+hMSC) и контролних група (hMSC и здрави). Концентрација тражених цитокина (IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β , IL-17 и TNF- α) у серуму је одређивана колориметријском методом односно комерцијалним ELISA китовима специфичним за мишје цитокине.

Као што је приказано на **Графикону 8. А**, интравенска апликација hMSC узроковала је пад проинфламаторног IFN- γ у серуму мишева 4T1+hMSC групе (1005.8 \pm 188.1 pg/ml) у поређењу са 4T1 групом (1848.2 \pm 206.1 pg/ml; $p < 0.05$). Статистички значајно већи ниво IL-4 (**Графикон 8. Б**; $p < 0.05$), IL-10 (**Графикон 8. Ц**; $p < 0.01$) и TGF- β (**Графикон 8. Д**; $p < 0.01$) забележен је у серуму 4T1+hMSC мишева у поређењу са 4T1 мишевима (4T1+hMSC (pg/ml) vs 4T1 (pg/ml): 405.1 \pm 34.7 vs 264.5 \pm 56.0 (IL-4); 318.6 \pm 54.1 vs 50.2 \pm 13.7 (IL-10); 1562.1 \pm 354 vs 723.1 \pm 81 (TGF- β)).

Разлике у концентрацији IL-17 између 4T1 (1269.5 \pm 43.03 pg/ml) и 4T1+hMSC (1251.9 \pm 93.86 pg/ml) нису детектоване (**Графикон 8. Е**), док су разлике серумских концентрација TNF- α детектоване само између 4T1 и групе здравих мишева (4T1 201.8 \pm 35.7 pg/ml vs здрави 403.86 \pm 61.04 pg/ml, $p < 0.05$; **Графикон 8. Ф**).



Графикон 8. Вредности цитокина у серуму експерименталних и контролних група мишева. Ниво серумског IL-4, IL-10 и TGF- β је статистички значајно виши код 4T1+hMSC мишева 35-ог дана експеримента у поређењу са 4T1, hMSC и здравим мишевима. Ниво серумског IFN- γ је значајно нижи код 4T1+hMSC мишева у поређењу са 4T1 мишевима. Серумски ниво IL-17 не показује међугрупне разлике. Разлика у онцентрацијама TNF- α детектована само између 4T1 и здравих мишева. Не постоји значајна разлика у нивоу серумских цитокина између контролних група ($p > 0.05$ или скр. Н.С.-није сигнификантно). Представљени резултати 3 експеримента са 9 мишева по групи (средња вредност \pm SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney*-евим тестом.

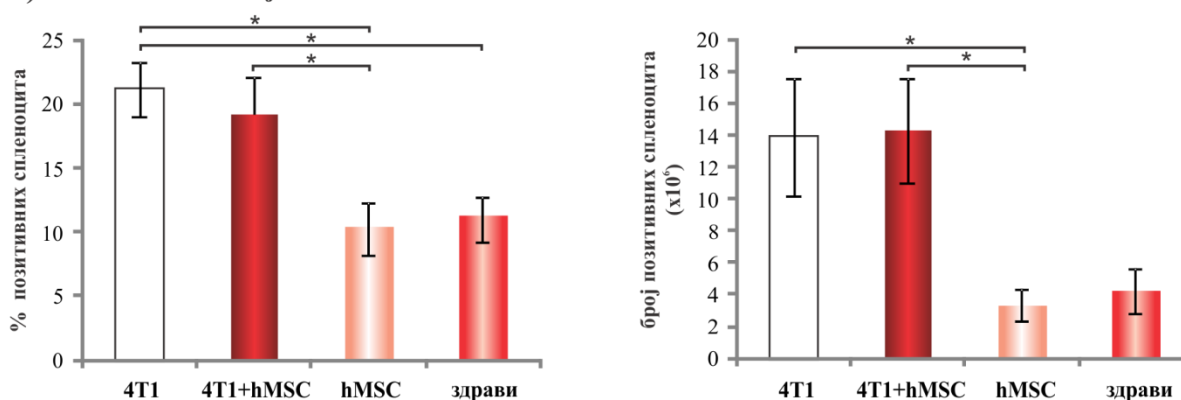
Приказани резултати недвосмислено показују да интравенски апликоване hMSC могу модулисати имунски одговор у експерименталном моделу тумора дојке у правцу протуморског Th2 одговора.

4.8. hMSC мењају нумерички однос IL-10⁺/IFN- γ ⁺ CD4⁺, тако што повећавају број IL-10⁺CD4⁺ Т лимфоцита у слезини

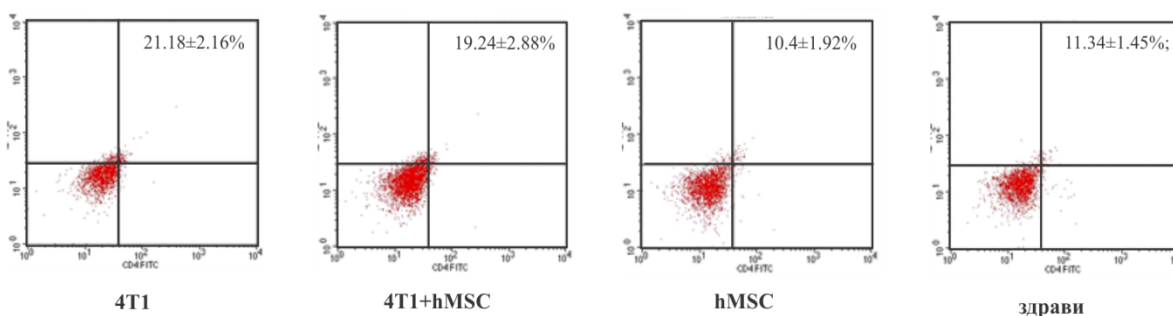
Након што је уочено да у серуму 4Т1+hMSC постоји значајан пораст нивоа Th2 цитокина (**Графикон 8.**), испитано је да ли је ова промена последица измењеног цитокинског профила ћелија слезине. У том циљу, проточном цитометријом, мерена је продукција цитокина у издвојеним CD4⁺ ћелијама слезине 35-ог дана.

Као што је приказано на **Графикону 9. А**, анализирана је заступљеност IL-4⁺CD4⁺ Т ћелија у слезинама експерименталних и контролних BALB/с мишева. Резултати показују да мишеви у обе експерименталне групе показују значајно већу процентуалну и апсолутну заступљеност IL-4⁺CD4⁺ Т ћелија у поређењу са мишевима из контролних група. **Графиконом 9. Б** приказани су репрезентативни дот плотови.

9. А) CD4⁺IL-4⁺ ћелије



9. Б)



Графикон 9. Заступљеност IL-4⁺CD4⁺ Т ћелија у слезини експерименталних и контролних мишева.

А) Обе експерименталне групе имају статистички значајно већи проценат CD4⁺ Т ћелија које продукују IL-4 у поређењу са контролним групама (4T1 21.18±2.16 vs 4T1+ hMSC 19.24±2.88% vs hMSC 10.40±1.92 vs здрави 11.34±1.45%; *p<0.05). Б) Такође иста међугрупна разлика забележена је када су анализирани бројчани односи IL-4 продукујућих CD4⁺ Т ћелија између експерименталних и контролних група (4T1 13.93±3.69 vs 4T1+ hMSC 14.30±3.30 x10⁶ vs hMSC 3.30±0.98 vs здрави 4.25±1.38 x10⁶; *p<0.05).

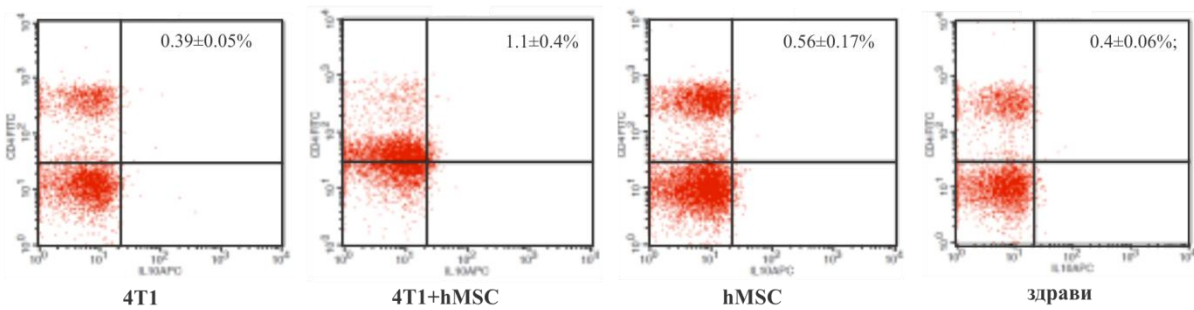
Очигледно да hMSC не утичу на промену броја IL-4⁺CD4⁺ Т ћелија у слезинама мишева којима је трансплантиран тумор. Док IL-4 игра кључну улогу у настанку Th2 фенотипа, главни имуносупресивни цитокин кога продукују Th2 ћелије је IL-10. Познато је да од баланса Th1/Th2 директно зависе исходи многих имунских реакција (311), па је стога је у наставку истраживања анализирана процентуална и апсолутна заступљеност лимфоцита који продукују IL-10, као и нумеричка заступљеност лимфоцита који продукују IFN-γ (функционалног маркера Th1 фенотипа) у слезини.

Забележен је статистички значајан пораст процентуалне и апсолутне заступљености броја CD4⁺IL-10⁺ ћелија код 4T1+hMSC мишева у односу на 4T1 и здраве мишеве (**Графикон 11. А**; p<0.05). Са друге стране, иако је регистровано смањење процента CD4⁺ IFN-γ⁺

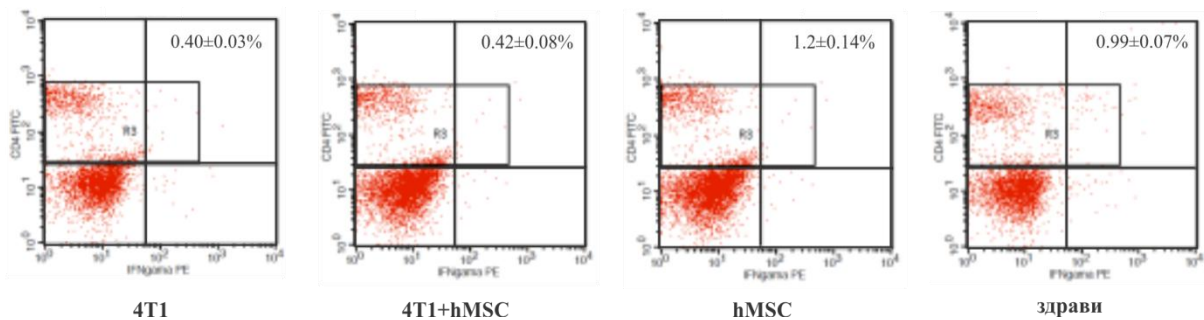
ћелија у експерименталним групама, ова разлика не одржава статистички значајан ниво када се упореде апсолутни бројеви позитивних ћелија (**Графикон 11. Б**). **Графиконом 10. Б** приказани су репрезентативни дот плотови.

Апсолутни количници $IL-10^+/IFN-\gamma^+$ лимфоцита су значајно већи у групи 4T1+hMSC у поређењу са односом из свих осталих група, очигледно због повећања апсолутног броја $IL-10^+$ лимфоцита у слезини сваког појединачног миша док се број $IFN-\gamma^+$ ћелија није значајно мењао (**Графикон 11. Ц**).

10. А)

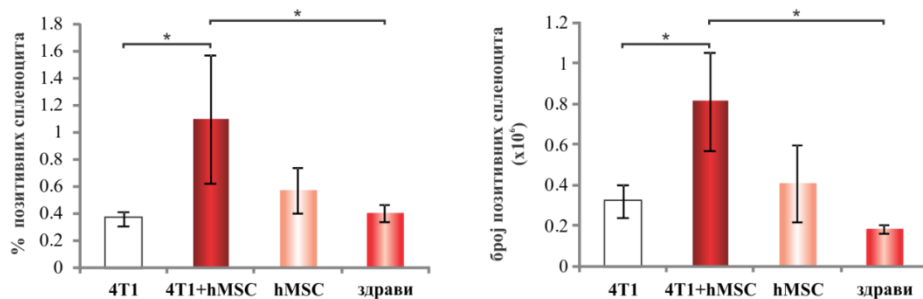


10. Б)

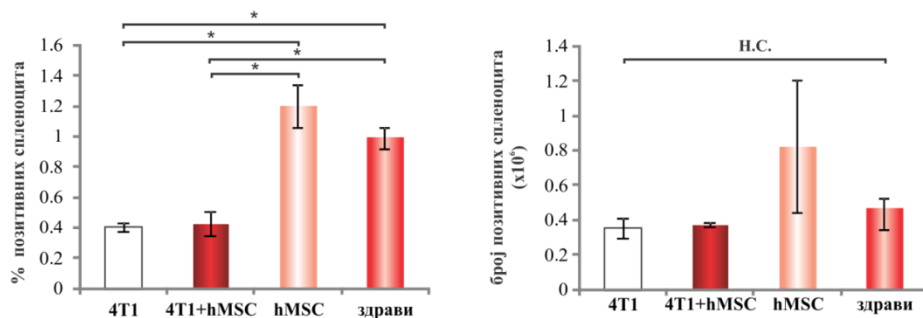


Графикон 10. Репрезентативни дот плотови. Приказани су репрезентативни дот плотови CD4⁺ ћелија које продукују IL-10 (**А**) и IFN- γ (**Б**) за све експерименталне и контролне групе.

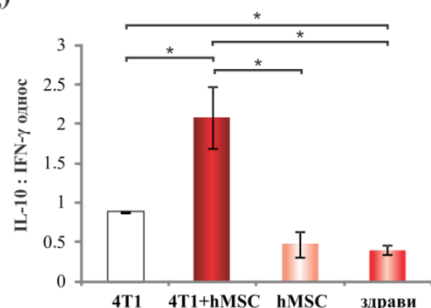
11. А) CD4⁺IL-10⁺ ћелије



11. Б) CD4⁺IFN-γ⁺ ћелије



11. Ц) IL-10 : IFN-γ однос



Графикон 11. Процент цитокин продукујућих ћелија у слезини експерименталних и контролних мишева. А) Забележена је разлика у процентима CD4⁺ ћелија које продукују IL-10 између 4T1+hMSC мишева (1.1±0.4%) у поређењу са остале три групе (4T1 0.39±0.05% vs hMSC 0.56±0.17% vs здраве 0.4±0.06%; * p<0.05), што је у корелацији са разликама у апсолутном броју осим за групу hMSC мишева (4T1+hMSC 0.81±0.24 x10⁶ у поређењу са 4T1 0.32±0.01 x10⁶, * p<0.05; здраве 0.18±0.02 x10⁶, * p<0.05; hMSC 0.4±0.19 x10⁶, p>0.05). Б) Обе групе мишева којима је индукован тумор имају значајно мањи проценат CD4⁺ ћелија које продукују IFN-γ (4T1 0.40±0.03%; 4T1+hMSC 0.42±0.08%) у поређењу са контролним групама (hMSC 1.2±0.14% vs здраве 0.99±0.07%; * p<0.05), док међугрупна разлика у апсолутном броју није детектована (4T1 0.35±0.06 x10⁶ vs 4T1+hMSC 0.37±0.01 x10⁶ vs hMSC 0.82±0.38 x10⁶ vs здраве 0.46±0.06 x10⁶; p>0.05 или скр. Н.С.-није сигнификантно). Ц) IL-10 : IFN-γ однос апсолутних бројева позитивних ћелија је највећи у 4T1+hMSC (2.08±0.39) у поређењу са свим осталим групама (4T1 0.87±0.09 vs hMSC 0.47±0.16 vs здраве 0.4±0.06). Приказане вредности су средња вредност ± SEM једног репрезентативног експеримента са укупно 9 мишева у свакој групи. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney*-евим тестом.

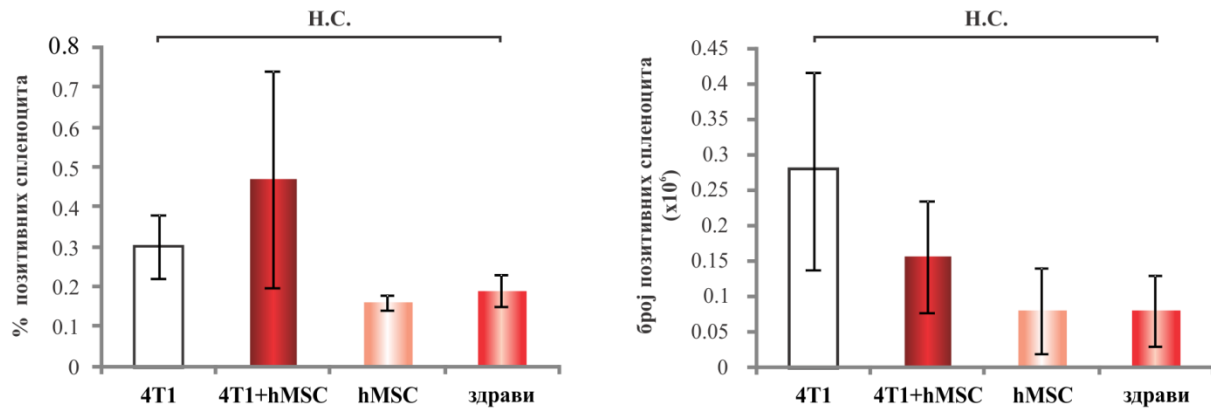
Поређењем нивоа цитокина у серуму (**Графикон 8.**) и укупног броја цитокин продукујућих ћелија (**Графикон 9. и 11.**) присутних у слезини 4T1+hMSC мишева 35-ог дана експеримента, уочава се јасна корелација између серумског нивоа IL-10 и заступљености CD4⁺ Т ћелија које продукују IL-10, као и између серумског нивоа IFN- γ и присуства IFN- γ продукујућих CD4⁺ Т лимфоцита. Значајан пораст серумског нивоа IL-10 у 4T1+hMSC мишевима корелира са повећаним уделом IL-10 продукујућих CD4⁺ Т ћелија у слезини ових животиња. Такође, CD4⁺ Т лимфоцити који продукују IFN- γ показују најмању заступљеност (иако није статистички значајно) у слезини 4T1+hMSC мишева, што корелира са ниским нивоом IFN- γ , забележеним у серуму ових мишева. Још један доказ о утицају hMSC на Th2 забележен је анализом IL-10⁺/IFN- γ ⁺ односа апсолутних бројева који је највећи у слезини 4T1+hMSC мишева.

4.9. hMSC не мењају удео IL-17⁺ и TNF- α ⁺ продукујућих CD4⁺ спленоцита

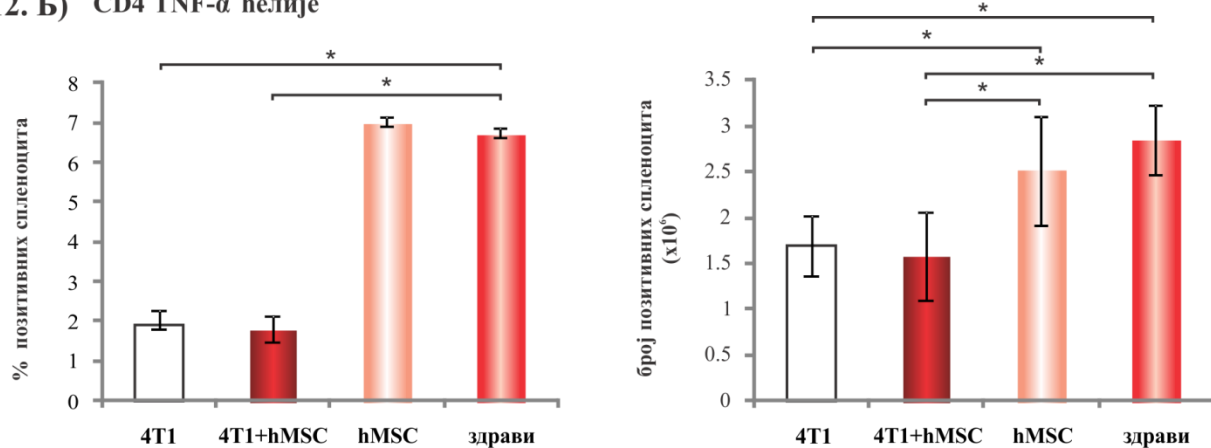
Осим Th1/Th2 баланса, значајну улогу на раст и метастазирање тумора могу имати и Th17 ћелије (312) као и један од главних антитуморских цитокина TNF- α (313). Иако разлике серумских нивоа ових цитокина нису забележене проверена је продукција ових цитокина у лимфоцитима слезине.

Проточном цитометријом измерени су проценат и број IL-17⁺ односно TNF- α ⁺ CD4⁺ ћелија у слезини, у току антитуморског имунског одговора (**Графиконом 13.** представљени су репрезентативни дот плотови). Нисмо детектовали значајну разлику у процентуалној заступљености и апсолутном броју IL-17⁺ CD4⁺ ћелија међу групама 35-ог дана експеримента (**Графикон 12. А;** $p > 0.05$), док је разлика у процентуалној заступљености TNF- α ⁺ CD4⁺ ћелија регистрована између експерименталних и контролних група (**Графикон 12. Б;** $p < 0.05$).

12. А) CD4⁺IL-17⁺ ћелије

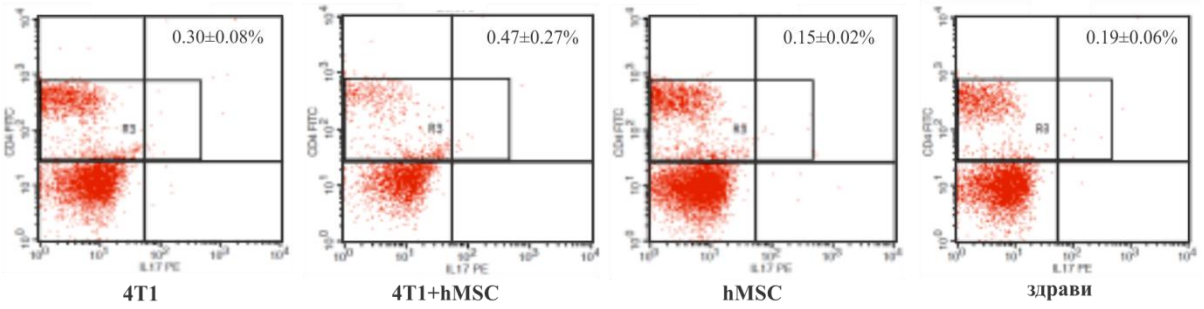


12. Б) CD4⁺TNF-α⁺ ћелије

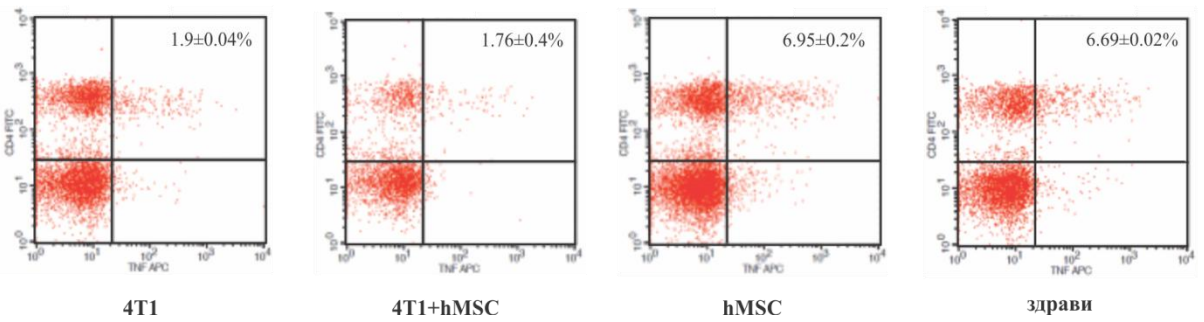


Графикон 12. Процент IL-17⁺ и TNF-α⁺ CD4⁺ продукујућих ћелија у слезини експерименталних и контролних мишева. А) Није регистрована међугрупна разлика у процентима (4T1 0.30±0.08% vs 4T1+hMSC 0.47±0.27% vs hMSC 0.15±0.02% vs здраве 0.19±0.06%; p>0.04) и апсолутном броју CD4⁺ ћелија које продукују IL-17 (4T1 0.28±0.14 x10⁶ vs 4T1+hMSC 0.16±0.08 x10⁶ vs hMSC 0.08±0.06 x10⁶ vs здраве 0.08±0.05 x10⁶; p>0.05). Б) Постоји статистички значајна разлика у процентуалној заступљености CD4⁺ ћелија које продукују TNF-α⁺ у корист контролних hMSC (6.95±0.2 %) и здравих (6.69±0.2 %) мишева према мишевима из експерименталних 4T1 (1.9±0.4 %) и 4T1+hMSC (1.76±0.4 %) група *p<0.05. Број укупних TNF-α⁺ CD4⁺ ћелија се значајно разликује између експерименталних група и групе здравих мишева (4T1 1.69±0.33 vs 4T1+hMSC 1.58±0.48 x 10⁶ vs здраве 2.85±0.38 x10⁶; *p<0.05) док та разлика није детектована према hMSC мишевима (2.51±0.6 x 10⁶; p>0.05). Ц) Приказани су репрезентативни дот плотови CD4⁺ ћелија које продукују IL-17⁺ за све експерименталне и контролне групе. Д) Приказани су репрезентативни дот плотови CD4⁺ ћелија које продукују TNF-α⁺ за све експерименталне и контролне групе. Приказане вредности су аритметичке средине ± SEM 4 од 9 животиња, из два посебна експеримента. Статистичка значајност одређивана је *Mann-Whitney*-евим тестом.

13. A)



13. Б)



Графикон 13. Репрезентативни дот плотови. Приказани су репрезентативни дот плотови CD4⁺ ћелија које продукују IL-17 (А) и TNF-α (Б) за све експерименталне и контролне групе.

На основу свих приказаних резултата очигледно је да системска администрација hMSC у експерименталном моделу тумора дојке повећава заступљеност Th2 лимфоцита који продукују IL-10 као и Т регулатрних лимфоцита у слезини оболелих мишева што ће за последицу имати повећање концентрације имуносупресивних цитокина у циркулацији и следствену убрзану прогресију карцинома дојке.

5. ДИСКУСИЈА

Бројне студије показале су да MSC поспешују раст тумора (169, 204, 203), као и што постоје радови који показују супротно односно да ове ћелије успоравају раст тумора (168-227), па је тако показано да MSC генетски модификоване за прекомерну продукцију IFN- β , инхибирају фосфорилацију STAT3 у малигним ћелијама и на тај начин успоравају раст примарног тумора дојке и формирање удаљених метастаза (314).

Стога је у првом делу истраживања испитивано да ли интравенски апликоване hMSC изоловане из периферне крви здравог донора, утичу на раст и метастазирање експерименталног тумора дојке. Забележено је раније појављује палпабилног тумор у групи мишева којима су системски апликоване hMSC (**Графикон 1. А**), такође је показано да волумен примарног тумора зависи од броја употребљених hMSC (**Графикон 1. Б и 2**), а метастатска поља у плућима и јетри су значајно већа у мишева који су уз туморске ћелије примали и hMSC (**Слике 3. и 4**).

Будући да ниво експресије STAT3 може бити одлучујући за брзину напредовања тумора други део истраживања је базиран на анализи ефеката hMSC на експресију STAT3, али је показано да системска администрација hMSC не утиче на експресију STAT3 у туморском ткиву (**Слика 5**),

Један од начина помоћу којих би hMSC могле остварити своје протуморске ефекте је и модулација имунског одговора (115, 213, 212), што је овим истраживањима недвосмислено и показано. hMSC су способне да створе имуносупресивну протуморску средину у којој преобладају Th2 имунски одговор (**Графикон 8**), са повишеним уделом Т регулаторних лимфоцита (**Графикон 6**), што води у смањење цитотоксичких механизма и то како CTL тако и NK и NKT ћелија (**Графикон 7. Б и Ц; Графикон 5. Ц**).

5.1. hMSC мигрирају у тумор, опстају у удаљеним органима и промовишу раст тумора и метастазирање на дозно зависан начин

Истраживања о ефектима MSC на раст тумора су контрадикторна, а врло битан фактор који доприноси добијању оваквих резултата је и хетерогеничност MSC популација које се користе у експериментима. Процес изолације и карактеризације MSC, се заснива на њиховој способности адхеренције, присуству и одсуству одређених површинских маркера и диференцијацији која показује њихову мултипотентност (70, 71, 72). На овај начин и са овим критеријумима изоловане MSC популације су хетерогене, суштински се разликују, што указује на неопходност проналажења специфичнијих маркера што би омогућило изолацију хомогене популације чији би ефекти на раст тумора били међусобно компарабилнији. Скорија истраживања показују да би један такав маркер могао бити и NG2 (315).

Резултати овог истраживања по први пут показују да hMSC изоловане из периферне крви здравог донора, апликоване интравенски истог дана када је и трансплантиран 4T1 тумор, промовишу раст овог тумора (**Графикон 1**).

Показано је да ефекти MSC на раст тумора битно зависе од времена и начина апликације MSC у организам. Три студије у којима су MSC апликоване након већ установљеног тумора, забележиле су инхибицију раста ових тумора (316-318), такође ако се ове ћелије примене истовремено када се и иницира тумор саопштени инхибиторни ефекти у многоне зависе од начина и места њихове апликације или од примењеног броја интравенски администрираних ћелија (168, 228).

Ипак много је већи број студија у којима су детектовани тумор промовишући ефекти MSC (референце). У већини оваквих студија MSC и туморске ћелије су коинјектиране (319-321). Присуство MSC у туморској микросредини током раног развоја тумора може олакшати процесе који су неопходни за раст тумора, као што је на пример ангиогенеза, па тако MSC коинјектирање са ћелијама карцинома панкреаса, повећавају густину крвних судова (177). Постоји и студија која показује супротно, то јест да MSC могу индуковати апоптозу ендотелних ћелија и на тај начин онемогућити раст експерименталног модела меланома (317).

Ефекти MSC на туморски раст умногоне могу зависити од броја примењених ћелија и то како од броја туморских тако и од броја MSC, тачније од међусобног односа ових бројева. Тако је у истраживањима која су показала да MSC промовишу раст тумора коришћен углавном већи количник MSC/туморске ћелије, мада има изузетака па је тако само 10% MSC од укупног броја инјектираних ћелија довољно да значајно убрза раст тумора плућа и глиома (322). *Ringden* и сарадници (323) су показали да у одређеним условима MSC могу утицати на раст тумора на дозно зависан начин, што је у складу и са резултатима добијеним у овде приказаној студији из којих се јасно види да брзина раста тумора и његово метастазирање у много већој мери зависи од броја hMSC него од броја коинјектираних туморских 4T1 ћелија (**Графикон 1**), тачније волуменом примарног тумора дојке је у директној корелацији са бројем апликованих hMSC (**Графикон 2**).

С обзиром да путеви миграције MSC и њихова крајња одредишта још нису довољно испитани нас је интересовало куда одлазе hMSC након системске апликације и могу ли се наћи у тумору. Приказани резултати показују да се интравенски апликоване hMSC, првог и трећег дана након апликације, детектују у тумору али и у крви, лимфном чвору, слезини, јетри и плућима (**Слика 1. Б**).

Иако механизми и путеви миграције MSC још увек нису у потпуности расветљени ипак је добро познато да ендогене и егзогене MSC мигрирају под утицајем недовољно разјашњених паракриних сигнала продукованих у микросредини, на различите начине, оштећених ткива и доприносе регенерацији и репарацији ткивних оштећења *in situ* (324, 325). У овим процесима учествују многи фактори међу којима су хемокини, цитокини, фактори раста и екстрацелуларни (326-328). Познато је да солидни тумори на својој периферији, стварају микросредину која је слична оној у оштећеном ткиву и која преноси физичке и хемијске сигнале стреса на суседна ткива, па су процеси важни за развој и прогресију тумора а слични онима који су укључени у репарацију ткива (178). Тумори се зато справом могу сматрати местима ткивних оштећења или цитирајући *Dvorak*-а то је „рана која никада не оздрави“ (178). Све речено се односи и на егзогене MSC при чему квалитет и квантитет ових процеса јасно зависе од биолошких својстава туморске микросредине као и од нативног тропизма коришћених MSC ћелија (329, 330).

У овој, као и у другим студијама показано је да ксено- и алогене MSC одлазе у разна ткива међу којима су и плућа (Слика 1. Б). Резултати студија показују да се MSC врло кратко задржавају у плућима и да после одређеног времена одлазе у јетру и слезину (331, 332). Међутим постоје и резултати који показују да највећи проценат интравенски апликованих MSC умире у првих 72 сата (333).

У том циљу је у овом истраживању испитиван опстанак и локализација hMSC 35-ог дана након интравенске инфузије у имунокомпетентне BALB/с мишеве којима је индукован тумор дојке. Резултати ове студије су у корелацији са другим студијама у којима је показано да егзогене MSC *in vivo* могу да живе дуг временски период (334). Наиме, добијени резултати показују да се 35-ог дана hMSC могу детектовати у јетри, али не и у плућима 4T1+ hMSC мишева (Слика 2). Овај налаз је сличан претходним истраживањима која су показала скраћен боравак MSC у плућима у најразличитијим моделима болести, уз дуготрајно задржавање у јетри и слезини (335, 336). У прилог тога говоре и студије у којима је недвосмислено показан благотворан терапијски учинак ових ћелија у различитим експерименталним моделима болести (337-339), па и онда када присуство ових ћелија није детектабилно (340), делимично објашњење овог феномена недавно су понудили *Li* и сарадници показујући да макрофаги, након фагоцитозе апоптотичних MSC, мењају своја имуномодулаторна својства (341-342).

Након анализе миграције егзогених hMSC, испитиван је утицај ових ћелија на метастазирање експерименталног тумора дојке. У до сада доступној литератури, забележено је да MSC могу утицати на прогресију примарних тумора стимулативно или инхибиторно, варијабилности у овим резултатима могу се приписати различитим пореклом MSC, типу тумора као и експерименталном моделу.

Резултати ове студије је по први пут показују да hMSC апликоване интравенски у релативно малом броју, промовишу формирање удаљених метастаза, прецизније речено, 35-ог дана експеримента учесталост и величина метастатских поља у плућима и јетри била је значајно већа у 4T1+hMSC групи у поређењу са мишевима из 4T1 групе (Слике 3. и 4). Добијени резултати су у складу са резултатима студије *Karnoub*-а и сарадника (169) која прометастатске ефекте MSC објашњава способношћу ових ћелија да секретују хемокин CCL5, за који ћелије тумора имају рецептор. Такође, MSC своје прометастатске ефекте

могу остварити секрецијом фактора који олакшавају пролаз туморских ћелија кроз базалну мембрану (343), као и модификацијом метастатских ниша помоћу ангиогенетским као и факторима раста (344). Протуморски ефекти hMSC могу настати и као последица директног контакта MSC са туморским ћелијама и/или дејством солубилних фактора помоћу којих MSC стимулишу пролиферацију туморских ћелија (345-347). Супротни ефекти MSC показани у малом броју истраживања забележени су у свега неколико туморских модела (168, 228).

У наставку истраживања испитивани су могући механизме путем којих hMSC остварују своје протуморске ефекте.

5.2. Интравенски апликоване hMSC не мењају степен фосфорилације STAT3 у примарном тумору

Перманентна фосфорилација STAT3 игра важну улогу у генези неких тумора (348-350). Истраживања ћелијских линија хуманих карцинома дојке показала су да пет од девет тестираних линија има константну активност STAT3 (49). Клиничка испитивања STAT3 забележила је активност STAT3 у туморском ткиву али не и у ћелијама околног нормалног ткива (349). STAT3 се сматра онкогеном, међутим његова онкогеничност се није могла проучавати на мишевима са делецијом овог гена јер је *STAT3* неопходан за ембрионални развој мишева и његов недостатак је леталан (351, 352). Скорија истраживања су показала да STAT3 игра кључну улогу у развоју како примарног тако и метастатског тумора дојке (349, 353). Колики је значај STAT3 у онкогенези тумора дојке показује и експериментална студија у којој је инактивација STAT3 молекула довела до повлачења примарног и метастатског тумора (352).

Бројна истраживања до сада су потврдила да су метастазе резултат интеракције између туморских и ћелија из њиховог микроокружења (314). Процес којим ћелије тумора граде примарни тумор или мигрирају у удаљена ткива је компликован али се верује да је имунски систем и то првенствено његова целуларна компонента, важан део овог процеса. Малигни тумори обично избегавају имунске механизме тако што стварају имуносуперсивну средину утичући на сазревање DC и стварање T регулаторних

лимфоцита (354-362). Резултати истраживања показују да је STAT3 молекула укључен у већину ових догађаја и да не функционише само као иницијатор онкогенезе већ је укључен у интеракције између туморских ћелија и њиховог микроокружења (363). Солидни тумори као што је и тумор дојке, креирају микроокружења која су слична онима у репарацији ткива која индукују миграцију MSC до места оштећења (169, 178). Показано је да MSC могу отићи у ткиво тумора дојке и секретовати солубилне факторе који утичу на његов раст (182, 198, 364). Један од молекула у туморским ћелијама, на које цитокини секретовани из MSC могу утицати је и STAT3. Показано је да MSC, генски модификовани тако да продукују IFN- β у вишку, одлазе у ткиво тумора дојке, инхибирају фосфорилацију STAT3 и на тај начин успоравају раст примарног тумора дојке као и формирање удаљених метастаза (314).

У складу са овим сазнањима и претходно приказаним налазима да hMSC промовишу раст тумора и метастаза, испитано је да ли је фосфорилацију STAT3 у туморском ткиву могуће објашњење регистрованих феномена. Анализа експресије фосфорилисаног STAT3 је показала да апликација hMSC не мења степен фосфорилисаности STAT3 у примарном тумору (**Слика 5**).

Могуће објашњење оваквих резултата се можда налази у чињеници да је експресија STAT3 испитивана 35-ог дана експеримента и то само у примарном тумору, а судећи према налазима *Lieblein*-а и сарадника паракрино узрокована фосфорилација STAT3 у туморским ћелијама је краткотрајан и пролазан догађај за који је *in vitro* показано да након дејства паракриних солубилних фактора постоји у кратком временском оквиру (од 30-ог минута до 48-ог сата) унутар кога се одржава фосфорилација STAT3 (365). Фосфорилисање STAT3 мења фенотип туморских ћелија у инвазивни који фаворизује метастазирање (366), па је могуће да су туморске ћелије са фосфорилисаним STAT3 населиле удаљена ткива и да је потенцијалну разлику у фосфорилацији можда требало потражити у метастатским пољима удаљених органа.

5.3. Интравенска апликација hMSC смањује процентуални удео NKT-like ћелија док истовремено повећава заступљеност Т регулаторних лимфоцита у слезини не мењајући укупну целуларност слезине

Слезина има важну улогу у регулацији имунског одговора на туморе. Лимфоцити из слезине могу уништити туморске ћелије или супротно олакшати раст тумора што ће зависити од баланса активационих и инхибиторних механизма (367).

Морфолошке промене у слезини, као и промене биолошких активности спленоцита изолованих из мишева оболелих од тумора, забележене су у различитим стадијумима туморског раста. Обзиром да је познато да величина слезине, тежина и број спленоцита расте са порастом тумора (368), анализирана је целуларност слезине мишева свих експерименталних и контролних група (**Графикон 3. А**).

Добијени резултати указују да мишеви из 4Т1+hMSC групе имају значајно целуларнију слезину од мишева контролних група али мање целуларну него 4Т1 мишеви, иако разлика не досеже ниво статистичке значајности.

Ex vivo умножене MSC поседују способност да супримирају имунски одговор *in vitro* и *in vivo* (115, 131). Многобројни су начини којима MSC могу супримирати пролиферацију и функцију ћелија имунског система укључујући Т и В лимфоцити, НК и антиген презентујуће ћелије (369). MSC супримирају пролиферацију CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцита стимулисних митогенима (204, 370). Ову способност исказују и алогене и аутологе MSC па је јасно да за ову супресију није неопходна МНС рестрикција. Сходно налазима ових истраживања и добијеним резултатима о целуларности слезине, анализирана је заступљеност субпопулација Т лимфоцита и показано је да убризгавање hMSC истовремено са 4Т1 ћелијама значајно смањује процентуалну заступљеност и CD4⁺ и CD8⁺ лимфоцита у слезини 35-ог дана експеримента (**Графикон 3. Б и Ц**), што сугерише да hMSC своју антипролиферативну имуносупресивну активност исказују и *in vivo*.

У слезини су присутне и NKT ћелије. Ове ћелије су јединствена мала популација лимфоцита, која има значајну улогу у регулисању имунског одговора. Као ћелије које припадају урођеном имунском систему, а поседују и TCR и имају већ синтетисане mRNA за цитокине што им омогућује промтну синтезу цитокина након активације што

умногоме може врло рано да одреди природу и квалитет антиген специфичног Т ћелијског одговора. Јасно је да ове ћелије играју важну улогу у регулисању имунског одговора на трансплантате, туморе, аутоантигене и инфективне агенсе (371). Ове улоге остварују како секрецијом инфламаторних цитокина тако и цитотоксичким способностима (372, 373).

Сам назив NKT ћелије, произилази из чињенице да поседују маркере који се налазе и на NK и на Т лимфоцитима, дефинисане су као субпопулација Т лимфоцита са неким особинама NK ћелија као што су експресија цитотоксичких рецептора: NKp46 (374), NK1.1 или DX5 антигена код мишева, или CD56 молекула код људи (375). NKT ћелије су хетерогена популација и класификују се на основу репертоара TCR-а и експресије корцептора на: CD1d зависне са инваријантним TCR-ом (Тип I) или варијабилним TCR-ом (Тип II) и CD1d независне ограничене MHC-ом (NKT-like или Тип III) (376-378).

NKp46 припада групи цитотоксичких рецептора и може покренути усмрћивање туморских ћелија ангажовањем мембранских лиганда на овим ћелијама (379-381). *Walzer* и сарадници детектовали су NKp46 на CD3⁺ ћелијама миша такозваним CD1d-независним NKT-like ћелијама, док присуство овог рецептора није детектовано на CD1d-зависним NKT (382).

NKT ћелије се углавном налазе у тимусу, јетри, слезини и коштаном сржи, а ретко у лимфном чвору и цревима (383-387). Тимус и јетра садрже углавном NKT ћелије које припадају CD1d зависној субпопулацији, на супрот томе, слезина и коштаног срж садрже и CD1d зависне и CD1d независне NKT субпопулације (383).

Очигледно је да се на основу функционалних особина и анатомске локализације NKT ћелије налазе на самој граници урођеног и стеченог имунског система или боље рећи чине мост између њих (388, 389).

Бројне *in vitro* студије су показале широк спектар имунорегулаторних ефеката MSC на ћелије урођеног имунског система (390-394). Међутим, малобројне су студије у којима се испитивао утицај hMSC на NKT ћелије. Једну од таквих студија извели су *Prigione* и сарадници и забележили да hMSC не само да *in vitro* инхибирају експанзију NKT ћелија (директним међућелијским контактом и секрецијом солубилних фактора) већ и смањују

продукцију IFN- γ након активације ових ћелија, а притом не мењају њихов цитотоксички потенцијал (395).

Да су NKT ћелије важан део антитуморског имунског одговора показују и бројна истраживања у која су показала да NKT ћелије учествују у елиминацији туморских ћелија (373, 396, 397). Осим директне интеракције са туморским ћелијама, NKT ћелије антитуморске ефекте остварују и деловањем на друге имунске ћелије. NKT ћелије, активирани туморским ћелијама, продукују IFN- γ који стимулише NK и CTL и на тај начин повећава антитуморску цитотоксичност (239, 397, 398). IFN- γ је неопходан фактор у NKT ћелијском антитуморском одговору, што доказује и студија са IFN- γ дефицитарним мишевима који не могу развити антитуморски одговор (239, 397). Веза између NKT и NK ћелија може бити важан фактор у антитуморском одговору, као што је и показано у два туморска модела (B16F10 и RM-1) (399).

Знајући да NKT ћелије имају значајну антитуморску улогу и да на њихову функцију *in vitro* могу утицати hMSC, у наставку овог истраживања испитивано је да ли интравенски апликоване hMSC могу утицати на заступљеност NKT-like ћелија у слезини и на тај начин допринети промоцији протуморске средине у 4T1+hMSC мишевима. Добијени резултати показују да системска администрација hMSC смањује процентуални и бројчани удео CD3⁺NKp46⁺ NKT-like ћелија у слезини 4T1+hMSC мишева (**Графикон 5. Ц**).

Колико је битна заступљеност и функција NKT ћелија показано је многим студијама. Па тако *Tahir* и сарадници детектују значајно смањење броја NKT ћелија у циркулацији пацијената са узнапредовалим карциномом плућа (400). Такође, исти аутори констатују смањену продукцију IFN- γ у NKT ћелијама периферне крви оболелих од карцинома простате (400). У другим студијама јасно је *in vitro* показано да NKT ћелија, изоловане из периферне крви пацијената оболелих и од других солидних тумора, смањено пролиферишу и продукују мању количину цитокина (401). Јасно је да NKT ћелије оболелих од различитих канцера исказују нумеричке и функционалне дефекте.

Да NKT ћелијски антитуморски одговор може бити умањен дејством неких имунских ћелија показали су Azuma и сарадници у студији о T регулаторним ћелијама у којој је

показано да $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Т регулаторне ћелије супримирају антитуморску активност NKT односно њихову пролиферацију, продукцију цитокина и цитотоксичку активност (402).

Т регулаторни лимфоцити представљају посебну субпопулацију Т лимфоцита, коју чине ћелије различитог фенотипа и различитих функционалних карактеристика (403-405). Лимфоцити који исказују регулаторну функцију регистровани су и у оквиру $CD8^+$, $CD4^+$ али и у оквиру $\gamma\delta$ -TCR популација лимфоцита (406). Регулаторни Т лимфоцити могу настати на два начина: из тимуса где се генерисање транскрипционог фактора $FoxP3^+$ догодило током позитивне селекције конвенционалних $CD4^+$ и други начин је да настану на периферији где бројни фактори могу индуковати експресију $FoxP3^+$ у Т лимфоцитима (407). Истраживања показују да је TGF- β главни регулатор развоја тимусних Treg али и кључни цитокин за хомеостазу и функцију периферних Treg (408).

Регулаторни Т лимфоцити су важни у контроли имунског одговора јер имају способност да супримирају пролиферацију Т лимфоцита и продукцију цитокина (409). Повишен број регулаторних Т ћелија је детектован у многим болестима, међу којима су и канцери. Тумори избегавају имунски одговор ангажовањем најмање две врсте супресорских ћелија као што су мијелоидне супресорске ћелије и Т регулаторни лимфоцити (410; 411; 412). Доказ за то је и студија на 4T1 моделу аденокарцинома дојке (413) у коме је показано да туморске ћелије могу продуковати GM-CSF, IL-1 β и TGF- β и тиме иницирати настанак мијелоидних супресорских ћелија и Treg што омета антитуморске ефекторске механизме и омогућује бржу прогресију тумора (414). Treg супримирају ћелијски одговор директно или инхибицијом антиген презентујућих ћелија (415, 416). Ова супресија одиграва се путем међућелијског контакта у који су укључени FasL/Fas и PD1/B7-H1 (417, 418) или путем секреције имуносупресивних цитокина: IL-10, TGF- β , IL-27 и IL-35 (419-423). У прилог написаном речито говори и студија у 4T1 моделу карцинома дојке у којој развој метастаза у плућима директно зависи од присуства Treg (412).

На експанзију и индукцију периферних Treg утичу бројни фактор. Скорије је показано да IDO може индуковати експресију $FoxP3$ и на тај начин конвертовати класичне $CD4^+CD25^-$ Т ћелије у регулаторне $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ ћелије (424). IDO је солубилни имуносупресивни фактор, кога у знатној мери продукују MSC, конститутивно или током

интеракција са циљним ћелијама, и који је укључен у имуномодулацију коју остварују ове ћелије (148, 160). Осим утицаја на стварање CD4⁺CD25⁺ Treg, MSC након контакта са Т лимфоцитима ослобађају солубилни HLA-G5 чиме могу утицати на експанзију већ постојећих и развој нових високо функционалних CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Treg (425). Осим тога на ову експанзију MSC могу утицати и секрецијом Th2 цитокина и то првенствено TGF-β и IL-10, што је и показано *in vitro* и *in vivo* у експерименталним моделима тумора дојке (309) и трансплантације срца (426).

У овде приказаном истраживању убризгавање hMSC, истовремено са трансплантацијом 4T1 ћелија, значајно смањује проценат и број Treg у слезини таквих мишева (**Графикон 6**).

Добијени резултати стриктно упућују на то да системски апликоване hMSC могу умањити заступљеност CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита и NKT-like ћелија, док истовремено промовишу експанзију регулаторних Т лимфоцита.

5.4. Интравенска апликација hMSC смањује цитотоксичку активност укупних спленоцита, CD8⁺ Т лимфоцита и NK ћелија

Након што је одређен удео појединих субпопулација лимфоцита у слезини, испитиван је и цитотоксички капацитет укупних спленоцита и утврђено је да спленоцити оболелих мишева којима су убризгане hMSC показују смањену цитотоксичност (**Графикон 7. А**). Да би сазнали која је ћелијска популација „одговорна“ за смањену цитотоксичност, *in vitro* је испитивана цитотоксичка активност изолованих CD8⁺ Т лимфоцита и NK ћелија. Забележена је значајно смањена антитуморска цитотоксичка активност и то како CD8⁺ Т лимфоцита тако и NK ћелија (**Графикон 7. Б и 7. Ц**). Механизам којим hMSC могу умањити функцију ових ћелија је још увек тема бројних истраживања и зависи од особина hMSC и активационог статуса цитотоксичких лимфоцита.

Ефекторски CD8⁺ CTL су ћелије које препознају цитосолне антигене презентоване у комплексу са молекулом I класе МНС и стога су од суштинског значаја за уништавање инфицираних и туморских ћелија. CTL настају активацијом зрелих CD8⁺ Т лимфоцита на антиген презентујућим ћелија и способне су да на периферији убију ћелију на којој су

препознале исти антиген, тако што ослобађају цитотоксички садржај својих гранула или тако што својим лигандима ангажују проапоптотске рецепторе циљаних ћелија (427, 428).

MSC апликоване у терапеутске сврхе имају потенцијал да успоре одбацивања калема као и да утичу на друге болести посредоване имунским системом, путем директних ефеката на CTL или инхибицијом Th1 одговора који је неопходан за пуну активацију CTL (427). Корисни терапијски ефекти могу се постићи и администрацијом алогених MSC јер, како су показали *Rasmusson* и сарадници, CTL домаћина не реагују на алогене MSC иако ове ћелије исказују стране молекуле I класе MHC (428). Иста група истраживача, али и други аутори, је показала да, у условима мешане лимфоцитне културе, MSC додаване током примарне стимулационе фазе инхибирају развој па тиме и цитотоксичку функцију CTL. MSC додаване током цитотоксичке ефекторске фазе нису утицале на функцију већ активираних или вирус специфичних CTL (139, 429, 430).

Имунопротективна улога MSC се делимично може објаснити утицајем ових ћелија на генерисање CD8⁺ Treg лимфоцита (431). У недавној студији *Patel* и сарадника, показано је да MSC додате кокултури ћелија тумора дојке и леукоцита периферне крви, повећавају број Treg лимфоцита и продукција Th2 цитокина, а истовремено инхибирају пролиферацију CTL и секрецију гранзима B, што је значајно смањило усмрћивање туморских ћелија (309).

Овде приказани резултати, смањене функције CD8⁺ T лимфоцита након апликације hMSC, су сагласни са претходно наведеним резултатима студија у којима су показани имуносупресивни утицаји MSC на CD8⁺ лимфоците. Ипак, неопходне су и друге *in vivo* студије како би се овај феномен испитао и како би се у потпуности разумеле сложене интеракције између MSC, T лимфоцита и туморских ћелија. Ова сазнања омогућила би безбеднију примену MSC код особа које имају неоткривене туморе или њихове рецидиве. Ови резултати као и други експериментални и клинички докази упућују на то да MSC директно и индиректно супримирају генерисање антиген-специфичних CTL и подстичу настанак Treg лимфоцита, а остаје отворено питање да ли MSC могу значајно инхибирати имунски одговор већ постојећих CD8⁺ меморијских T лимфоцита (432).

Како је у претходном делу истраживања показано да интравенски апликоване hMSC не мењају заступљеност **NK ћелија** у слезини оболелих мишева (**Графикон 5. Б**), у наредним испитивањима је истражено да ли коинјектирање hMSC и туморских ћелија утиче на цитотоксичку активност ових ћелија и детектовано је значајно смањење антитуморске цитотоксичке активности NK ћелија изолованих из слезине ових мишева (**Графикон 7. Ц**).

NK или урођеноубилачке ћелије су велики гранулирани лимфоцити урођеног имунског система, које играју кључну улогу у раној одбрани од инфекција и туморских ћелија (123). NK ћелије не исказују CD3 молекула, код људи карактерише их експресија CD56 (433), а код мишева NKp46⁺ молекула (302). NK ћелије обављају ефекторске функције секрецијом IFN- γ , TNF- α , GM-CSF и бројних хемокина који учествују у генерисању раног имунског одговора (434) и цитотоксичким деловањем. Усмрћивање циљаних ћелија обављају дегранулацијом (ослобашање перфорина и гранзима) и директним контактом (435). Активација NK ћелија зависи од баланса сигнала који се преносе кроз активацијске и инхибиторне рецепторе (433). Поред тога што су у стању да ефикасно усмрћују измењене ћелије, ове ћелије обављају имуномодулаторну функцију урођеног и стеченог имунског одговора секрецијом цитокина (436).

У бројним студијама проучавани су ефекати MSC на активацију и пролиферацију NK ћелија (370, 437, 438). Показано је *in vitro* да MSC, на дозно зависан начин, укидају пролиферативне ефекте IL-15 на NK ћелије (123, 439). Своје антипролиферативне ефекте MSC остварују и међућелијским контактом и продукцијом солубилних фактора (123, 440). MSC *in vitro* ометају активацију NK ћелија делујући како на активационе тако и на инхибиторне рецепторе (441-443).

Показано је и да MSC *in vitro* смањују продукцију IFN- γ из IL-2-ом стимулираних NK ћелија (115) и да овај утицај зависи од броја MSC (123, 444). Цитокини које секретују NK ћелије посредују у елиминацији патогених, инфицираних и туморских ћелија и модулирају развој адаптивног имунског одговора (445), па би тако имуносупресивно дејство MSC на NK ћелије могло не само да смањи активност урођеног имунског система већ и да битно утиче на поларизацију и ефекте стеченог имунског одговора.

5.5. Интравенски апликоване hMSC убрзавају раст експерименталног тумора дојке креирањем имуносупресивне средине

Имунски одговор на туморске ћелије првенствено захтева ангажовање CTL лимфоцита и NK ћелија, а ефикасност овог одговора у многоме ће зависити од продукције проинфламаторних цитокина. Како је ово истраживање недвосмислено показало да апликовање hMSC редукује цитотоксичност CD8⁺ Т лимфоцита и NK ћелија, а повећава број Т регулаторних лимфоцита у слезини, претпостављено је да је могуће објашњење поларизација Th1 у Th2 одговор.

Из тог разлога утврђиван је утицај убризганих hMSC на концентрацију Th1 цитокина (IFN- γ и TNF- α) и показано је да hMSC битно смањују продукцију IFN- γ , за који се зна да игра круцијалну улогу за функцију и активацију NK ћелија док ефекат ових ћелија на концентрације TNF- α у серуму није детектован (**Графикон 8. А и 8. Б**). Смањење концентрације IFN- γ пратило је значајно повећање нивоа IL-4, IL-10 и TGF- β у серуму мишева којима су уз 4T1 убризгаване и hMSC (**Графикон 8. Ц, Д, Е**). Будући да је улога IL-17 у настанку и прогресији неких тумора добро документована као и да на ниво продукције овог цитокина у неким експерименталним моделима могу утицати и hMSC (446), одређиван је и ниво IL-17 (**Графикон 8. Ф**). Међутим утицај hMSC на концентрацију овог цитокина није регистрован.

Дисбаланс у концентрацијама мерених цитокина регистрован у серуму (IFN- γ vs IL-4, IL-10, TGF- β) али и поремећени нумерички односи и функција ефекторских и цитокин-продукујућих мононуклеара у слезини јасно указују да коинјектирање hMSC са 4T1 ћелијама узрокује снажну системску имуносупресију услед померања Th1/Th2 баланса на страну Th2 лимфоцита и повећаним удела Treg у регулацији имунског одговора.

У одговор имунског система на канцере укључени су и механизми урођене и механизми стечене имуности (447-449). Иако је улога Т лимфоцита у антитуморском имунском договору добро документована (448-453) сви детаљи ангажовања ових ћелија и даље нису сасвим расветљени, поготову они који се односе на функционисање функционалних фенотипова CD4⁺ Т лимфоцита у различитим фазама развоја тумора и имунског одговора. Функционални фенотипови CD4⁺ Т лимфоцита укључених у одговор на канцере су: Th1,

Th2, Th17 и Treg лимфоцити. Функционални фенотипови дефинисани су способностима секреције различитих цитокина (454-456). Th1 доминантно секретују IFN- γ и TNF- α који су значајни за индукцију ћелијског имунског одговора, док Th2 супримирају ћелијску имуност појачавајући хуморални имунски одговор што су последице доминантне продукције IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13 (457, 458). Th17 лимфоцити су важни за настанак запаљења, јер обезбеђују брзо „регрутовање“ неутрофилних леукоцита и макрофага услед појачане продукције IL-17 (459, 456). Treg лимфоцити своју функцију обављају између осталог, тако што појачано продукују TGF- β и IL-10 (309).

Поларизација одговора Th има вишеструки утицај на антитуморски одговор. Сматра се да централну улогу у поларизацији имунског одговора имају цитокини, који својим дејством на друге ћелија, регулишу антитуморски имунски одговор. На поларизацију имунског одговора односно на ниво продукције различитих цитокина у овде приказаном моделу, осим туморских ћелија утичу и MSC.

Како је ово истраживање недвосмислено показало да апликовање hMSC редукује цитотоксичност CD8⁺ Т лимфоцита и NK ћелија, а повећава број Т регулаторних лимфоцита у слезини, претпостављено је да је могуће објашњење поларизација Th1 у Th2 одговор.

Из тог разлога утврђиван је утицај убрзиганих hMSC на концентрацију Th1 цитокина (IFN- γ и TNF- α) и показано је да hMSC битно смањују продукцију IFN- γ , за који се зна да игра круцијалну улогу за функцију и активацију NK ћелија док ефекат ових ћелија на концентрације TNF- α у серуму није детектован (**Графикон 8. А и 8. Б**).

Индукција Th1 ћелија се догађа када се CD4⁺ Т лимфоцити активирају у присуству IL-12, IFN- γ и IL-27 (460), а IFN- γ је кључни цитокин кога производе ове ћелије. Осим њих IFN- γ производе и друге ћелије као што су CD8⁺ Т, NKT и NK ћелије (461, 462). IFN- γ индукује инфилтрисање туморског ткива макрофагама и цитотоксичким лимфоцитима (450), повећава експресију МНС молекула на туморским ћелијама олакшавјући њихову елиминацију механизмима стечене имуности (463). TNF- α је првобитно именован по способности да индукује хеморагијску некрозу у солидним туморима, одтада су многобројне *in vitro* и *in vivo* студије документовале контрадикторне функције овог цитокина, укључујући индукцију апоптозе, активацију, преживљавање и/или пролиферацију туморских ћелија (464, 465). До сада објављени. а нама доступни подаци

указују да MSC супримирају како функцију формираних Th1 тако и диференцијацију Th0 у функционални фенотип Th1 (466, 467). Резултати овде приказане студије, потврдили су да hMSC утичу на секрецију IFN- γ . У студији експерименталног колитиса *Gonzalez* и сарадници су показали да ксеногене, алогене и аутологе MSC способне да значајно умање прогресију болести редуковањем секреције IFN- γ из Th1 ћелија уз истовремено повећање броја Т регулаторних лимфоцита (468).

Смањење концентрације IFN- γ пратило је значајно повећање нивоа IL-4, IL-10 и TGF- β у серуму мишева којима су уз 4T1 убризгаване и hMSC (**Графикон 8. Ц, Д, Е**).

Диференцијација Th2 ћелија се догађа када се CD4⁺ Т лимфоцити активирају у присуству IL-4, кога поред IL-5, IL-9, IL-10 и IL-13 производе и саме Th2 ћелије (427, 469). Већина студија указује да Th2 поларизација резултира продукцијом фактора раста и цитокина који промовишу раст примарног тумора и метастазирање (470). Сматра се и да IL-4 мења функционалне карактеристике CD8⁺ лимфоцита и значајно смањује њихов цитотоксички потенцијал (471, 472).

Постоје докази да hMSC могу фаворизовати диференцијацију у Th2 фенотип. *Vai* и сарадници (473) су показали у експерименталном алергијском енцефаломијелитису да хумане MSC индукују Th2 ћелије, тачније забележили су већи ниво Th2 цитокина (IL-4 и IL-5) уз значајну редуцију Th1/Th17 цитокина (IL-17, IFN- γ , TNF и IL-12). Сличне резултате добили су и *Fiorina* и сарадници који су детектовали померање Th1/Th2 равнотеже у правцу Th2 фенотипа после администрирања алогених MSC (474).

Будући да је у овом ради регистровано значајно повећање концентрација Th2 цитокина у серуму и значајно повећан број регулаторних Т лимфоцита у слезинама оболелих мишева третираних hMSC (**Графикон 6**), у даљем току истраживања испитани су ефекти убризгавања ових ћелија на ниво TGF- β у серуму.

TGF- β је цитокин кога у великој мери продукују Treg, међутим он је и неопходан фактор за стварање периферних Treg и Th17 (469, 475). TGF- β се везује за површинске рецепторе на ћелији и активира међусобно повезане мултипле сигналне путеве. Најновије информације указују на то да међусобни баланс ових сигнала може променити крајње ефекте деловања TGF- β и то од оних који директно супримирају пролиферацију

канцерских ћелија до оних који промовишу туморску прогресију (476). *Patel* и сарадници су показали директне и индиректне протективне ефекте TGF- β на ћелије карцинома дојке, а да су егзогене MSC главни извор овог цитокина (309).

Овде приказана студија је потврдила да hMSC узрокују пораст TGF- β у серуму оболелих мишева (**Графикон 8. Е**). Будући да је познато да је TGF- β један од неопходних фактора за развој Th17 фенотипа, проверено је да ли hMSC утичу на ниво IL-17 у серуму.

Значај IL-17 у имунском одговору на туморе још увек није довољно познат. Док нека истраживања указују да IL-17 промовише раст и развој тумора стимулисањем ангиогенезе (312, 477), дотле други истраживачи тврде да IL-17 индукује ћелијски имунски одговор одговоран за одбацивање тумора (478, 479). Мали број студија се бавио проучавањем ефеката MSC на Th17 ћелије или продукцију IL-17, а резултати добијени у овим студијама су у великој мери контрадикторни. Једна *in vivo* студија је показала да примена MSC током развоја експерименталног алергијског енцефаломијелитиса смањује продукцију IL-17, IFN- γ , TNF- α и IL-23, уз истовремено повећање продукције TGF- β и IL-4 (480). Супротно, *Carrion* и сарадници су забележили да MSC промовишу Th17 уз истовремену инхибицију Th1 ћелија (481). Овде приказана студија није потврдила ни један од ових налаза јер hMSC нису промениле ниво IL-17 у серуму оболелих животиња (**Графикон 8. Ф**).

Дисбаланс у концентрацијама мерених цитокина регистрован у серуму (IFN- γ vs IL-4, IL-10, TGF- β) али и поремећени нумерички односи и функција ефекторских и цитокин-продукујућих мононуклеара у слезини јасно указују да коинјектирање hMSC са 4Т1 ћелијама узрокује снажну системску имunosупресију услед померања Th1/Th2 баланса на страну Th2 лимфоцита и повећаним удела Трег у регулацији имунског одговора.

Налаз да hMSC повећава ниво Th2 цитокина у серуму оболелих мишева имплицирао је питање да ли је уочена разлика последица активности ефекторских цитокин-продукујућих ћелија у слезини мишева?

Јасно је показано да hMSC не утичу значајно на број IL-4⁺CD4⁺ Т лимфоцита у слезини оболелих мишева (**Графикон 10**). Иако је број CD4⁺ Т лимфоцита који продукују IFN- γ , TNF- α као и IL-17 био смањен те разлике нису достигле ниво статистичке значајности (**Графикон 12. Б, 13. Б и 13. А**). Већа заступљеност CD4⁺ ћелија које продукују IL-10⁺ у

слезини оболелих мишева третираних са hMSC је јасно статистички потврђена (**Графикон 12. А**) тако да је количник апсолутних бројева IL-10⁺/IFN- γ ⁺ ћелија статистички значајно повећан у тој групи мишева (**Графикон 12. Ц**).

Да MSC заиста могу утицати на продукцију цитокина показано је *in vitro* студијама, које показују да ове ћелије значајно редукују генерисање Th1 ћелија у мешаној култури лимфоцита (467, 482), као и *in vivo* истраживањима која документују да MSC повећавају продукцију IL-10 и IL-13 уз истовремено смањење секреције IFN- γ из Т лимфоцита (483).

На основу свих приказаних резултата очигледно је да системска администрација hMSC, у експерименталном моделу тумора дојке, повећава заступљеност Th2 лимфоцита који продукују IL-10 као и Т регулатрних лимфоцита у слезини оболелих мишева што ће за последицу имати повећање концентрације имуносупресивних цитокина у циркулацији и следствену убрзану прогресију карцинома дојке, што се мора имати увиду приликом потенцијалне системске примене MSC у различитим патолошким стањима.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Системска апликација hMSC:

1. Убрзава раст и метастазирање мишјег 4Т1 карцинома дојке при чему не утиче на активацију STAT3 пута у туморском ткиву
2. Смањује број и цитотоксичку функцију ћелија неспецифичне (NK и NKT-like) и специфичне (CD8) имуности у слезини оболелих мишева
3. Мења нумерички однос Th1/Th2 у корист Th2 IL-10⁺ лимфоцита и повећава удео CD4⁺ FoxP3⁺ T_{reg} ћелија у слезини
4. Следствено повећава ниво IL-4, IL-10 и TGF- β а смањује концентрацију IFN- γ у циркулацији

На основу свих приказаних резултата очигледно је да интравенска апликација hMSC у експерименталном моделу тумора дојке повећава заступљеност Th2 и T_{reg} лимфоцита у слезинама оболелих мишева што има за последице повећање концентрације имunosупресивних цитокина у циркулацији, снижене активности цитотоксичких ћелија неспецифичне и специфичне имуности и следствену убрзану прогресију карцинома дојке што се мора имати у виду приликом потенцијалне системске примене MSC у различитим патолошким стањима.

СМАЊЕНА ЦИТОТОКСИЧКА
ФУНКЦИЈА

СКРАЋЕНИЦЕ

ADCC	цитотоксичност зависна од антитела
ABC метод	(енгл. Avidin-Biotin peroxidase Complex)
ALCAM	(енгл. activated leukocyte cell adhesion molecule)
BRCA1 и 2	(енгл. Breast cancer type 1 and 2 susceptibility protein)
CCDN1	(енгл. G1/S-specific cyclin-D1)
CDH-1	(енгл. Cadherin-1)
c-ERBB2	(енгл. V-Erb-B2 Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2)
CCL	(енгл. chemokine)
CCR и CXCR	(енгл. chemokine receptors)
CFU-F	(енгл. Colony-Forming Units-Fibroblastic)
CYP1A1	(енгл. Cytochrome P450, family 1, subfamily A)
CSF-1	(енгл. Colony Stimulating Factor-1) фактор-1 стимулације колоније
CTL	цитототоксички Т лимфоцити (енгл. Cytotoxic T Lymphocytes)
ДНК	дезоксирибонуклеинска киселина
DLL	(енгл. Delta-like protein)
DCs	(енгл. Dendritic cells)
DAMPs	(енгл. damage-associated molecular pattern)
DMEM	(енгл. Dulbeccecos Modified Eagles Medium)
DMSO	(енгл. Dimetil sulfoksid)
EGF	(енгл. Epidermal Growth Factor) фактор раста епидерма
hEGF R	(енгл. Basic Epidermal Growth Factor Receptor)
ELISA	(енгл. Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
FBS	фетални говеђи серум (енгл. Fetal Bovine Serum)
GM-CSF	(енгл. Granulocyte- macrophage colony-stimulating factor)
hMSC	(енгл. human mesenchymal stem cells)

HLA-G5	(engl. Human leukocyte antigen-G5)
HGF	(engl. Hepatocyte growth factor)
HO1	(енгл. Heme oxygenase 1)
H&E	хематоксилин и еозин (енгл. Hematoxylin & Eosin)
ICAM-1	интраћелијски адхезивни молекул-1 (енгл. Intracellular Adhesion Molecule-1)
IFN	интерферон
IL	интерлеукин
IL-R	рецептори за интерлеукине
IGFR	(енгл. Insulin-like Growth Factor Receptor)
ICAM	(енгл. Intercellular Adhesion Molecule)
IDO	(енгл. Indolamin-2,3-Dioxygenase)
КАРА2G	(енгл. 2X KAPA2G Robust HotStart ReadyMix)
LIF	(енгл. Leukemia Inhibitory Factor)
LNGFR	(енгл. Low-Affinity Nerve Growth Factor Receptor)
MCAM	(енгл. Melanoma Cell Adhesion Molecule)
MIC	(енгл. MHC class I polypeptide-related sequence)
M2	алтернативно активирани макрофаги
MSC	(енгл. Mesenchymal Stem Cells)
mRNA	информациона рибонуклеинска киселина
MHC	главни комплекс гена ткивне подударности (енгл. Major Histocompatibility Complex)
NG2	(енгл. nerve/glial antigen 2)
NK ћелије	урођене убилачке ћелије (енгл. Natural Killer Cells)
NKT ћелије	(енгл. Natural Killer T Cells)
NKT-like ћелије	(енгл. Natural Killer T Cells-like)
NKG2D	активациони рецептор (енгл. Natural Killer Group 2, Member D)
NKp30	(енгл. Natural killer cell p30-related protein)
NOD–SCID	(енгл. Non-Obese Diabetic–Severe Combined Immunodeficiency)

PDGF	(енгл. platelet derived growth factor)
PDGFR	(енгл. platelet derived growth factor receptor)
pD1	(енгл. programmed cell death 1)
PECAM-1	(енгл. platelet/endothelial cell adhesion molecule 1)
pGe2	(енгл. ProstaGlandin E2)
PAF	активирајући фактор тромбоцита (енгл. Platelet-Activating Factor)
PCR	реакција ланчаног умножавања (енгл. Polimerase Chain Reaction)
PBS	(енгл. Phosphate Buffered Salline)
RB-1	(енгл. Retinoblastoma protein 1)
RAG2	активациони ген 2 рекомбинације (енгл. Recombination-Activating Gene 2)
STAT	(енгл. Signal transducer and activator of transcription)
TAF	(енгл. Tumour-Associated Fibroblasts)
TGFβRI и II	(енгл. transforming growth factor beta receptor I and II)
TNF	(енгл. tumor necrosis factor-alpha)
TNF RI и II	(енгл. tumor necrosis factor-alpha receptor I and II)
TP53	(енгл. tumor protein p53)
T_{reg}	(engl. T regulatory cells)
Thy-1	(енгл. Thymocyte antigen 1)
Th1, 2 и 17 ћелије	помагачки Т лимфоцити (engl. T helper cells 1, 2 and 17)
TCR	(енгл. T cell receptor)
TLRs	(енгл. Toll-like receptors)
VCAM-1	(енгл. Vascular Cell Adhesion Protein)

7. ЛІТЕРАТУРА

1. DeVita B, Helman JC, Rosenberg CA. *CANCER Principles & Practice of Onkology*, 7th Edition 2008.
2. DeMichele A, Weber BL. Inherited genetic factors. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Osborne CK, eds. *Disease of the Breast*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:221-36.
3. Neuman E, Ladha MH, Lin N, Upton TM, Miller SJ, DiRenzo J, Pestell RG, Hinds PW, Dowdy SF, Brown M, Ewen ME. Cyclin D1 stimulation of estrogen receptor transcriptional activity independent of cdk4. *Mol Cell Biol*. 1997 Sep;17(9):5338-47.
4. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*. 2000 Sep 28;407(6803):538-41.
5. Dickson RB, Lippman ME. Autocrine and paracrine growth factors in the normal and neoplastic bPhiladelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000:303.
6. Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, Popescu NC, Hahn WC, Weinberg RA. Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev*. 2001 Jan 1;15(1):50-65.
7. Dickson RB, Lippman ME. Oncogenes, suppressor genes, and signal transduction. In: Harris J, Lippman ME, Morrow M, eds. *Diseases of the breast*. Philadelphia: Lippincott–Raven, 2000:281.
8. Liao DJ, Dickson RB. c-Myc in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2000 Sep;7(3):143-64.
9. Schreiber-Agus N, Meng Y, Hoang T, Hou H Jr, Chen K, Greenberg R, Cordon-Cardo C, Lee HW, DePinho RA. Role of Mxi1 in ageing organ systems and the regulation of normal and neoplastic growth. *Nature*. 1998 Jun 4;393(6684):483-7.
10. Feltes CM, Kudo A, Blaschuk O, Byers SW. An alternatively spliced cadherin-11 enhances human breast cancer cell invasion. *Cancer Res*. 2002 Nov 15;62(22):6688-97.

11. Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 1992 Mar 15;52(6):1399-405.
12. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 2004 Jun 25;117(7):927-39.
13. Li J, Sahagian GG. Demonstration of tumor suppression by mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor. *Oncogene.* 2004 Dec 16;23(58):9359-68.
14. Tao K, Fang M, Alroy J, Sahagian GG. Imagable 4T1 model for the study of late stage breast cancer. *BMC Cancer.* 2008 Aug 9;8:228.
15. Yoneda T, Michigami T, Yi B, Williams PJ, Niewolna M, Hiraga T. Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. *Cancer.* 2000 Jun 15;88(12 Suppl):2979-88.
16. Dexter DL, Kowalski HM, Blazar BA, Fligiel Z, Vogel R, Heppner GH. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 1978 Oct;38(10):3174-81.
17. Miller FR, Miller BE, Heppner GH. Characterization of metastatic heterogeneity among subpopulations of a single mouse mammary tumor: heterogeneity in phenotypic stability. *Invasion Metastasis.* 1983;3(1):22-31.
18. Horvath CM, Wen Z, Darnell JE Jr. A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes Dev.* 1995 Apr 15;9(8):984-94.
19. Xu X, Sun YL, Hoey T. Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain. *Science.* 1996 Aug 9;273(5276):794-7.
20. Levy DE, Darnell JE Jr. Stats: transcriptional control and biological impact. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Sep;3(9):651-62.
21. Akira S. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells.* 1999;17(3):138-46.

22. Copeland NG, Gilbert DJ, Schindler C, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr, Mui AL, Miyajima A, Quelle FW, Ihle JN, et al. Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics*. 1995 Sep 1;29(1):225-8.
23. Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, Clark R, Aguet M, Schreiber RD. Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*. 1996 Feb 9;84(3):431-42.
24. Durbin JE, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. Targeted disruption of the mouse Stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell*. 1996 Feb 9;84(3):443-50.
25. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*. 1994 Jun 3;264(5164):1415-21.
26. Thierfelder WE, van Deursen JM, Yamamoto K, Tripp RA, Sarawar SR, Carson RT, Sangster MY, Vignali DA, Doherty PC, Grosveld GC, Ihle JN. Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells. *Nature*. 1996 Jul 11;382(6587):171-4.
27. Takeda K, Tanaka T, Shi W, Matsumoto M, Minami M, Kashiwamura S, Nakanishi K, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S. Essential role of Stat6 in IL-4 signalling. *Nature*. 1996 Apr 18;380(6575):627-30.
28. Liu X, Robinson GW, Gouilleux F, Groner B, Hennighausen L. Cloning and expression of Stat5 and an additional homologue (Stat5b) involved in prolactin signal transduction in mouse mammary tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 12;92(19):8831-5.
29. Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Wynshaw-Boris A, Hennighausen L. Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev*. 1997 Jan 15;11(2):179-86.
30. Teglund S, McKay C, Schuetz E, van Deursen JM, Stravopodis D, Wang D, Brown M, Bodner S, Grosveld G, Ihle JN. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*. 1998 May 29;93(5):841-50.

31. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. 1995 Aug 15;86(4):1243-54.
32. Akira S. IL-6-regulated transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997 Dec;29(12):1401-18.
33. Akira S, Nishio Y, Inoue M, Wang XJ, Wei S, Matsusaka T, Yoshida K, Sudo T, Naruto M, Kishimoto T. Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*. 1994 Apr 8;77(1):63-71.
34. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*. 1994 Apr 1;264(5155):95-8.
35. Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE Jr, Yancopoulos GD. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science*. 1995 Mar 3;267(5202):1349-53.
36. Duncan SA, Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. STAT signaling is active during early mammalian development. *Dev Dyn*. 1997 Feb;208(2):190-8.
37. Bonni A, Sun Y, Nadal-Vicens M, Bhatt A, Frank DA, Rozovsky I, Stahl N, Yancopoulos GD, Greenberg ME. Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science*. 1997 Oct 17;278(5337):477-83.
38. Boccaccio C, Andò M, Tamagnone L, Bardelli A, Michieli P, Battistini C, Comoglio PM. Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature*. 1998 Jan 15;391(6664):285-8.
39. Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, Lerner AC, Carter-Su C, Schwartz J, Jove R. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science*. 1995 Jul 7;269(5220):81-3.
40. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell*. 1999 Aug 6;98(3):295-303.
41. Yang J, Chatterjee-Kishore M, Staugaitis SM, Nguyen H, Schlessinger K, Levy DE, Stark GR. Novel roles of unphosphorylated STAT3 in oncogenesis and transcriptional regulation. *Cancer Res*. 2005 Feb 1;65(3):939-47.

42. Kasprzycka M, Marzec M, Liu X, Zhang Q, Wasik MA. Nucleophosmin/anaplastic lymphoma kinase (NPM/ALK) oncoprotein induces the T regulatory cell phenotype by activating STAT3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jun 27;103(26):9964-9. Epub 2006 Jun 9.
43. Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest*. 2002 May;109(9):1139-42.
44. Leslie K, Lang C, Devgan G, Azare J, Berishaj M, Gerald W, Kim YB, Paz K, Darnell JE, Albanese C, Sakamaki T, Pestell R, Bromberg J. Cyclin D1 is transcriptionally regulated by and required for transformation by activated signal transducer and activator of transcription 3. *Cancer Res*. 2006 Mar 1;66(5):2544-52.
45. Gritsko T, Williams A, Turkson J, Kaneko S, Bowman T, Huang M, Nam S, Eweis I, Diaz N, Sullivan D, Yoder S, Enkemann S, Eschrich S, Lee JH, Beam CA, Cheng J, Minton S, Muro-Cacho CA, Jove R. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2006 Jan 1;12(1):11-9.
46. Diaz N, Minton S, Cox C, Bowman T, Gritsko T, Garcia R, Eweis I, Wloch M, Livingston S, Seijo E, Cantor A, Lee JH, Beam CA, Sullivan D, Jove R, Muro-Cacho CA. Activation of stat3 in primary tumors from high-risk breast cancer patients is associated with elevated levels of activated SRC and survivin expression. *Clin Cancer Res*. 2006 Jan 1;12(1):20-8.
47. Turkson J, Kim JS, Zhang S, Yuan J, Huang M, Glenn M, Haura E, Sebti S, Hamilton AD, Jove R. Novel peptidomimetic inhibitors of signal transducer and activator of transcription 3 dimerization and biological activity. *Mol Cancer Ther*. 2004 Mar;3(3):261-9.
48. Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, Minton S, Muro-Cacho CA, Cox CE, Falcone R, Fairclough R, Parsons S, Laudano A, Gazit A, Levitzki A, Kraker A, Jove R. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene*. 2001 May 3;20(20):2499-513.
49. Garcia R, Yu CL, Hudnall A, Catlett R, Nelson KL, Smithgall T, Fujita DJ, Ethier SP, Jove R. Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ*. 1997 Dec;8(12):1267-76.

50. Dechow TN, Pedranzini L, Leitch A, Leslie K, Gerald WL, Linkov I, Bromberg JF. Requirement of matrix metalloproteinase-9 for the transformation of human mammary epithelial cells by Stat3-C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 20;101(29):10602-7.
51. Berclaz G, Altermatt HJ, Rohrbach V, Siragusa A, Dreher E, Smith PD. EGFR dependent expression of STAT3 (but not STAT1) in breast cancer. *Int J Oncol*. 2001 Dec;19(6):1155-60.
52. Amorino GP, Hamilton VM, Valerie K, Dent P, Lammering G, Schmidt-Ullrich RK. Epidermal growth factor receptor dependence of radiation-induced transcription factor activation in human breast carcinoma cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Jul;13(7):2233-44.
53. Grant SL, Hammacher A, Douglas AM, Goss GA, Mansfield RK, Heath JK, Begley CG. An unexpected biochemical and functional interaction between gp130 and the EGF receptor family in breast cancer cells. *Oncogene*. 2002 Jan 17;21(3):460-74.
54. Knüpfer H, Preiss R. Significance of interleukin-6 (IL-6) in breast cancer (review). *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Apr;102(2):129-35.
55. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:1-21.
56. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 1966 Dec;16(3):381-90.
57. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):71-4.
58. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Feb;12(2):126-31.
59. Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M, Hotta T, Ando K. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):1878-87.
60. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25.
61. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007 Oct 19;131(2):324-36.

62. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.* 2006 Feb;6(2):93-106.
63. Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol.* 2008 Apr;8(4):290-301.
64. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 28;97(7):3213-8.
65. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 2001 Oct 15;98(8):2396-402.
66. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FH, Willemze R, Fibbe WE, Kanhai HH. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood.* 2003 Aug 15;102(4):1548-9.
67. Nakahara H, Dennis JE, Bruder SP, Haynesworth SE, Lennon DP, Caplan AI. In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Exp Cell Res.* 1991 Aug;195(2):492-503.
68. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13(12):4279-95.
69. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol.* 2004 May;32(5):414-25.
70. Lennon DP, Caplan AI. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 2006 Nov;34(11):1604-5.
71. Docheva D, Padula D, Popov C, Mutschler W, Clausen-Schaumann H, Schieker MJ. Researching into the cellular shape, volume and elasticity of mesenchymal stem cells, osteoblasts and osteosarcoma cells by atomic force microscopy. *Cell Mol Med.* 2008 Apr;12(2):537-52.
72. Delorme B, Chateauvieux S, Charbord P. The concept of mesenchymal stem cells. *Regen Med.* 2006 Jul;1(4):497-509.

73. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*. 1991 Jul 1;78(1):55-62.
74. Stewart K, Walsh S, Screen J, Jefferiss CM, Chainey J, Jordan GR, Beresford JN. Further characterization of cells expressing STRO-1 in cultures of adult human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*. 1999 Aug;14(8):1345-56.
75. Schieker M, Pautke C, Haasters F, Schieker J, Docheva D, Böcker W, Guelkan H, Neth P, Jochum M, Mutschler W. Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence. *J Anat*. 2007 May;210(5):592-9.
76. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Apr;36(4):568-84.
77. Bobis S, Jarocho D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006;44(4):215-30.
78. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol*. 2002 Jul;30(7):783-91.
79. Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*. 2002 Dec;46(12):3349-60.
80. Bühring HJ, Battula VL, Treml S, Schewe B, Kanz L, Vogel W. Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Jun;1106:262-71.
81. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001;19(3):180-92.
82. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007 Oct 19;131(2):324-36.
83. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006 May;24(5):1294-301.

84. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007 Nov;25(11):2739-49.
85. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
86. Leo AJ, Grande DA. Mesenchymal stem cells in tissue engineering. *Cells Tissues Organs*. 2006;183(3):112-22.
87. Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester GR, Kaps C, Sittinger M. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem*. 2007 May 1;101(1):135-46.
88. Fox JM, Chamberlain G, Ashton BA, Middleton J. Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *Br J Haematol*. 2007 Jun;137(6):491-502.
89. Minguell JJ, Erices A, Conget P. Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med* (Maywood). 2001 Jun;226(6):507-20.
90. Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*. 2007 May 1;109(9):4055-63.
91. Croitoru-Lamoury J, Lamoury FM, Zaunders JJ, Veas LA, Brew BJ. Human mesenchymal stem cells constitutively express chemokines and chemokine receptors that can be upregulated by cytokines, IFN-beta, and Copaxone. *J Interferon Cytokine Res*. 2007 Jan;27(1):53-64.
92. Docheva D, Haasters F, Schieker M. Mesenchymal Stem Cells and Their Cell Surface Receptors *Current Rheumatology Reviews*. 2008;4:000-000.
93. Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med*. 2007 Jan-Feb;11(1):21-38.
94. Djouad F, Delorme B, Maurice M, Bony C, Apparailly F, Louis-Pence P, Canovas F, Charbord P, Noël D, Jorgensen C. Microenvironmental changes during

- differentiation of mesenchymal stem cells towards chondrocytes. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(2):R33.
95. Schieker M, Pautke C, Reitz K, Hemraj I, Neth P, Mutschler W, Milz S. The use of four-colour immunofluorescence techniques to identify mesenchymal stem cells. *J Anat.* 2004 Feb;204(2):133-9.
 96. Zhu H, Mitsuhashi N, Klein A, Barsky LW, Weinberg K, Barr ML, Demetriou A, Wu GD. The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells.* 2006 Apr;24(4):928-35. Epub 2005 Nov 23.
 97. Oldershaw R, Murdoch A, Brennan K, Hardingham T. The putative role of the notch ligand, jagged 1, in the mediation of the early events of human mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Int J Exp Pathol.* 2005;86:A47–A48.
 98. Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development.* 2004 Mar;131(5):965-73.
 99. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci.* 2003 Mar-Apr;10(2):228-41.
 100. Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol.* 2006 Nov;13(6):419-25.
 101. Noël D, Djouad F, Bouffi C, Mrugala D, Jorgensen C. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leuk Lymphoma.* 2007 Jul;48(7):1283-9.
 102. Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells.* 2008 Jan;26(1):99-107.
 103. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
 104. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve.* 1995 Dec;18(12):1417-26.
 105. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000; 61:364 –370.

106. Retraction. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001;98:2615-2625. *Blood*. 2009 Mar 5;113(10):2370.
107. Kohyama J, Abe H, Shimazaki T, Koizumi A, Nakashima K, Gojo S, Taga T, Okano H, Hata J, Umezawa A. Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent. *Differentiation*. 2001 Oct;68(4-5):235-44.
108. Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, El Manira A, Prockop DJ, Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 19;99(4):2199-204.
109. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3838-43.
110. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002 Jan;30(1):42-8.
111. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005 May 15;105(10):4120-6.
112. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2006 Aug 15;177(4):2080-7.
113. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*. 2007 Jan 15;83(1):71-6.
114. Li YP, Paczesny S, Lauret E, Poirault S, Bordigoni P, Mekhloufi F, Hequet O, Bertrand Y, Ou-Yang JP, Stoltz JF, Miossec P, Eljaafari A. Human mesenchymal stem cells license adult CD34⁺ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway. *J Immunol*. 2008 Feb 1;180(3):1598-608.

115. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815-22.
116. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):2214-9.
117. Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005 Apr;90(4):516-25.
118. Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol*. 2002 Dec;2(12):957-64.
119. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Biassoni R, Mingari MC, Moretta L. Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:619-48.
120. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:197-223.
121. Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*. 2006 Feb 15;107(4):1484-90.
122. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1327-33.
123. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006 Jan;24(1):74-85.
124. Poggi A, Prevosto C, Massaro AM, Negrini S, Urbani S, Pierri I, Saccardi R, Gobbi M, Zocchi MR. Interaction between human NK cells and bone marrow stromal cells induces NK cell triggering: role of NKp30 and NKG2D receptors. *J Immunol*. 2005 Nov 15;175(10):6352-60.

125. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):212-22.
126. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L, Pistoia V. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):151-62.
127. Fadeel B, Ahlin A, Henter JI, Orrenius S, Hampton MB. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood*. 1998 Dec 15;92(12):4808-18.
128. Craddock CG Jr, Perry S, Ventzke LE, Lawrence J S. Evaluation of marrow granulocytic reserves in normal and disease states. *Blood*. 1960 Jun;15:840-55.
129. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003 Feb 15;75(3):389-97.
130. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 2004 Jun 15;103(12):4619-21.
131. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1755-61.
132. Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res*. 2005 Apr 15;305(1):33-41.
133. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003 May 1;101(9):3722-9.

134. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2821-7.
135. Chabannes D, Hill M, Merieau E, Rossignol J, Brion R, Souillou JP, Anegon I, Cuturi MC. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007 Nov 15;110(10):3691-4.
136. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008 Feb 7;2(2):141-50.
137. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007 Jan 1;109(1):228-34.
138. Benvenuto F, Ferrari S, Gerdoni E, Gualandi F, Frassoni F, Pistoia V, Mancardi G, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells*. 2007 Jul;25(7):1753-60.
139. Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*. 2003 Oct 27;76(8):1208-13.
140. Rasmusson I, Uhlén M, Le Blanc K, Levitsky V. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 2007 Oct;82(4):887-93.
141. Morandi F, Raffaghello L, Bianchi G, Meloni F, Salis A, Millo E, Ferrone S, Barnaba V, Pistoia V. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens. *Stem Cells*. 2008 May;26(5):1275-87.
142. Pevsner-Fischer M, Morad V, Cohen-Sfady M, Rouso-Noori L, Zanin-Zhorov A, Cohen S, Cohen IR, Zipori D. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1422-32.
143. Tomchuck SL, Zvezdaryk KJ, Coffelt SB, Waterman RS, Danka ES, Scandurro AB. Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):99-107.
144. Hwa Cho H, Bae YC, Jung JS. Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells*. 2006 Dec;24(12):2744-52.

145. Liotta F, Angeli R, Cosmi L, Filì L, Manuelli C, Frosali F, Mazzinghi B, Maggi L, Pasini A, Lisi V, Santarlasci V, Consoloni L, Angelotti ML, Romagnani P, Parronchi P, Krampera M, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):279-89.
146. Svensson M, Kaye PM. Stromal-cell regulation of dendritic-cell differentiation and function. *Trends Immunol*. 2006 Dec;27(12):580-7.
147. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*. 2005 May;35(5):1482-90.
148. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006 Feb;24(2):386-98.
149. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):367-72.
150. Traggiai E, Volpi S, Schena F, Gattorno M, Ferlito F, Moretta L, Martini A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem Cells*. 2008 Feb;26(2):562-9.
151. Traggiai E, Volpi S, Schena F, Gattorno M, Ferlito F, Moretta L, Martini A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem Cells*. 2008 Feb;26(2):562-9.
152. Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B, Ringdén O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol*. 2007 Apr;65(4):336-43.
153. Gerdoni E, Gallo B, Casazza S, Musio S, Bonanni I, Pedemonte E, Mantegazza R, Frassoni F, Mancardi G, Pedotti R, Uccelli A. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*. 2007 Mar;61(3):219-27.

154. Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, Galipeau J. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*. 2006 Mar 15;107(6):2570-7.
155. Chan JL, Tang KC, Patel AP, Bonilla LM, Pierobon N, Ponzio NM, Rameshwar P. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood*. 2006 Jun 15;107(12):4817-24.
156. Feuerer M, Beckhove P, Garbi N, Mahnke Y, Limmer A, Hommel M, Hämmerling GJ, Kyewski B, Hamann A, Umansky V, Schirmmacher V. Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. *Nat Med*. 2003 Sep;9(9):1151-7.
157. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008 Sep;8(9):726-36.
158. Kögler G, Radke TF, Lefort A, Sensken S, Fischer J, Sorg RV, Wernet P. Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Exp Hematol*. 2005 May;33(5):573-83.
159. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*. 2007 Aug;25(8):2025-32.
160. Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2007 Aug;149(2):353-63.
161. Almeida-Porada G, Porada CD, Tran N, Zanjani ED. Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood*. 2000 Jun 1;95(11):3620-7.
162. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, Bagasra O, Prockop DJ. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 May 23;92(11):4857-61.
163. Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood*. 2005 Dec 15;106(13):4057-65.

164. Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood*. 2006 Sep 15;108(6):2114-20.
165. Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. *Leukemia*. 2007 Feb;21(2):304-10.
166. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 2003 Nov 15;102(10):3837-44.
167. Amé-Thomas P, Maby-El Hajjami H, Monvoisin C, Jean R, Monnier D, Caulet-Maugendre S, Guillaudeux T, Lamy T, Fest T, Tarte K. Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):693-702.
168. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira II, Nguyen AT, Malide D, Combs CA, Hall G, Zhang J, Raffeld M, Rogers TB, Stetler-Stevenson W, Frank JA, Reitz M, Finkel T. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med*. 2006 May 15;203(5):1235-47.
169. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007 Oct 4;449(7162):557-63.
170. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):375-9.
171. Bianchi G, Borgonovo G, Pistoia V, Raffaghello L. Immunosuppressive cells and tumour microenvironment: focus on mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells. *Histol Histopathol*. 2011 Jul;26(7):941-51.
172. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*. 2008 Oct 6;27(45):5904-12.
173. Whiteside TL. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol*. 2006 Feb;16(1):3-15.

174. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 2001 Oct;1(1):46-54.
175. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One*. 2009;4(4):e4992.
176. Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res*. 2003 Nov-Dec;34(6):565-71.
177. Beckermann BM, Kallifatidis G, Groth A, Frommhold D, Apel A, Mattern J, Salnikov AV, Moldenhauer G, Wagner W, Diehlmann A, Saffrich R, Schubert M, Ho AD, Giese N, Büchler MW, Friess H, Büchler P, Herr I. VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer*. 2008 Aug 19;99(4):622-31.
178. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 1986, 315:1650-1659.
179. Feng B, Chen L. Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator? *Cancer Biother Radiopharm*. 2009 Dec;24(6):717-21.
180. Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, Chen J, Hentschel S, Vecil G, Dembinski J, Andreeff M, Lang FF. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res*. 2005 Apr 15;65(8):3307-18.
181. Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, Bizen A, Honmou O, Niitsu Y, Hamada H. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther*. 2004 Jul;11(14):1155-64.
182. Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, Champlin RE, Andreeff M. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Nov 3;96(21):1593-603.
183. Wels J, Kaplan RN, Rafii S, Lyden D. Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev*. 2008 Mar 1;22(5):559-74.
184. Dwyer RM, Potter-Beirne SM, Harrington KA, Lowery AJ, Hennessy E, Murphy JM, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ. Monocyte chemoattractant protein-1 secreted by

primary breast tumors stimulates migration of mesenchymal stem cells. *Clin Cancer Res.* 2007 Sep 1;13(17):5020-7.

185. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007 Nov;25(11):2739-49.
186. Ruster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Müller S, Seifried E, Gille J, Henschler R. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood.* 2006 Dec 1;108(12):3938-44.
187. Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester GR, Kaps C, Sittinger M. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem.* 2007 May 1;101(1):135-46.
188. Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells.* 2006 Apr;24(4):1030-41.
189. Von Lüttichau I, Notohamiprodjo M, Wechselberger A, Peters C, Henger A, Seliger C, Djafarzadeh R, Huss R, Nelson PJ. Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells Dev.* 2005 Jun;14(3):329-36.
190. Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercalli A, Melzi R, Giordano T, Belmonte N, Ferrari G, Leone BE, Bertuzzi F, Zerbini G, Allavena P, Bonifacio E, Piemonti L. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood.* 2005 Jul 15;106(2):419-27.
191. Shi M, Li J, Liao L, Chen B, Li B, Chen L, Jia H, Zhao RC. Regulation of CXCR4 expression in human mesenchymal stem cells by cytokine treatment: role in homing efficiency in NOD/SCID mice. *Haematologica.* 2007 Jul;92(7):897-904.
192. Wynn RF, Hart CA, Corradi-Perini C, O'Neill L, Evans CA, Wraith JE, Fairbairn LJ, Bellantuono I. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood.* 2004 Nov 1;104(9):2643-5.
193. Yong RL, Shinojima N, Fueyo J, Gumin J, Vecil GG, Marini FC, Bogler O, Andreeff M, Lang FF. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells for intravascular delivery of oncolytic adenovirus Delta24-RGD to human gliomas. *Cancer Res.* 2009 Dec 1;69(23):8932-40.

194. Kidd S, Caldwell L, Dietrich M, Samudio I, Spaeth EL, Watson K, Shi Y, Abbruzzese J, Konopleva M, Andreeff M, Marini FC. Mesenchymal stromal cells alone or expressing interferon-beta suppress pancreatic tumors in vivo, an effect countered by anti-inflammatory treatment. *Cytotherapy*. 2010 Sep;12(5):615-25.
195. Mader EK, Maeyama Y, Lin Y, Butler GW, Russell HM, Galanis E, Russell SJ, Dietz AB, Peng KW. Mesenchymal stem cell carriers protect oncolytic measles viruses from antibody neutralization in an orthotopic ovarian cancer therapy model. *Clin Cancer Res*. 2009 Dec 1;15(23):7246-55.
196. Studeny M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, Champlin RE, Andreeff M. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Nov 3;96(21):1593-603.
197. Nakamizo A, Marini F, Amano T, Khan A, Studeny M, Gumin J, Chen J, Hentschel S, Vecil G, Dembinski J, Andreeff M, Lang FF. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res*. 2005 Apr 15;65(8):3307-18.
198. Studeny M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res*. 2002 Jul 1;62(13):3603-8.
199. Kim SM, Lim JY, Park SI, Jeong CH, Oh JH, Jeong M, Oh W, Park SH, Sung YC, Jeun SS. Gene therapy using TRAIL-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against intracranial glioma. *Cancer Res*. 2008 Dec 1;68(23):9614-23.
200. Josiah DT, Zhu D, Dreher F, Olson J, McFadden G, Caldas H. Adipose-derived stem cells as therapeutic delivery vehicles of an oncolytic virus for glioblastoma. *Mol Ther*. 2010 Feb;18(2):377-85.
201. Dwyer RM, Khan S, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ. Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer. *Stem Cell Res Ther*. 2010 Aug 9;1(3):25.

202. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, Richardson AL, Polyak K, Tubo R, Weinberg RA. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007 Oct 4;449(7162):557-63.
203. Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, Cao W, Han C, Chen Y. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol*. 2006 Jun;80(3):267-74.
204. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 2003 Nov 15;102(10):3837-44.
205. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F 3rd. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells*. 2011 Jan;29(1):11-9.
206. Roorda BD, ter Elst A, Kamps WA, de Bont ES. Bone marrow-derived cells and tumor growth: contribution of bone marrow-derived cells to tumor micro-environments with special focus on mesenchymal stem cells. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009 Mar;69(3):187-98.
207. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004 Mar 19;94(5):678-85.
208. Annabi B, Naud E, Lee YT, Eliopoulos N, Galipeau J. Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors. *J Cell Biochem*. 2004 Apr 15;91(6):1146-58.
209. Galiè M, Konstantinidou G, Peroni D, Scambi I, Marchini C, Lisi V, Krampera M, Magnani P, Merigo F, Montani M, Boschi F, Marzola P, Orrù R, Farace P, Sbarbati A, Amici A. Mesenchymal stem cells share molecular signature with mesenchymal tumor cells and favor early tumor growth in syngeneic mice. *Oncogene*. 2008 Apr 17;27(18):2542-51.
210. Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, Hall B, Andreeff M, Marini F. Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. *PLoS One*. 2009;4(4):e4992.

211. Bexell D, Gunnarsson S, Tormin A, Darabi A, Gisselsson D, Roybon L, Scheduling S, Bengzon J. Bone marrow multipotent mesenchymal stroma cells act as pericyte-like migratory vehicles in experimental gliomas. *Mol Ther*. 2009 Jan;17(1):183-90.
212. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*. 2006 Oct;36(10):2566-73.
213. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007 Nov 15;110(10):3499-506.
214. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*. 2006 Aug 15;177(4):2080-7.
215. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005 May 15;105(10):4120-6.
216. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F, Ottonello L, Pistoia V. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells*. 2008 Jan;26(1):151-62.
217. Prigione I, Benvenuto F, Bocca P, Battistini L, Uccelli A, Pistoia V. Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and gammadelta T cells or invariant natural killer T cells. *Stem Cells*. 2009 Mar;27(3):693-702.
218. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008 Sep;8(9):726-36.
219. Bergfeld SA, DeClerck YA. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev*. 2010 Jun;29(2):249-61.
220. Michigami T, Shimizu N, Williams PJ, Niewolna M, Dallas SL, Mundy GR, Yoneda T. Cell-cell contact between marrow stromal cells and myeloma cells via VCAM-1 and alpha(4)beta(1)-integrin enhances production of osteoclast-stimulating activity. *Blood*. 2000 Sep 1;96(5):1953-60.
221. Sohara Y, Shimada H, Minkin C, Erdreich-Epstein A, Nolte JA, DeClerck YA. Bone marrow mesenchymal stem cells provide an alternate pathway of osteoclast activation and bone destruction by cancer cells. *Cancer Res*. 2005 Feb 15;65(4):1129-35.

222. Fukaya Y, Shimada H, Wang LC, Zandi E, DeClerck YA. Identification of galectin-3-binding protein as a factor secreted by tumor cells that stimulates interleukin-6 expression in the bone marrow stroma. *J Biol Chem.* 2008 Jul 4;283(27):18573-81.
223. Efferth T, Fabry U, Osieka R. *Anticancer Res.* Interleukin-6 affects melphalan-induced DNA damage and repair in human multiple myeloma cells. 2002 Jan-Feb;22(1A):231-4.
224. Brocke-Heidrich K, Kretzschmar AK, Pfeifer G, Henze C, Löffler D, Koczan D, Thiesen HJ, Burger R, Gramatzki M, Horn F. Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood.* 2004 Jan 1;103(1):242-51.
225. Sohara Y, Shimada H, Minkin C, Erdreich-Epstein A, Nolte JA, DeClerck YA. Bone marrow mesenchymal stem cells provide an alternate pathway of osteoclast activation and bone destruction by cancer cells. *Cancer Res.* 2005 Feb 15;65(4):1129-35.
226. Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, Pui CH, Campana D. Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest.* 2007 Apr;117(4):1049-57. Epub 2007 Mar 22.
227. Secchiero P, Zorzet S, Tripodo C, Corallini F, Melloni E, Caruso L, Bosco R, Ingraio S, Zavan B, Zauli G. Human bone marrow mesenchymal stem cells display anti-cancer activity in SCID mice bearing disseminated non-Hodgkin's lymphoma xenografts. *PLoS One.* 2010 Jun 16;5(6):e11140.
228. Ohlsson LB, Varas L, Kjellman C, Edvardsen K, Lindvall M. Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix. *Exp Mol Pathol.* 2003 Dec;75(3):248-55.
229. Ehrlich P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 1909; 5, 273–290.
230. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol.* 2001 Apr;2(4):293-9.
231. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329-60.

232. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002 Nov;3(11):991-8.
233. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001 Apr 26;410(6832):1107-11.
234. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004 Aug;21(2):137-48.
235. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001 Apr 26;410(6832):1107-11.
236. Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell.* 1992 Mar 6;68(5):855-67.
237. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, Hayday AC. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science.* 2001 Oct 19;294(5542):605-9.
238. Girardi M, Glusac E, Filler RB, Roberts SJ, Propperova I, Lewis J, Tigelaar RE, Hayday AC. The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR) $\gamma\delta$ and TCR $\alpha\beta$ T cells to different stages of chemically induced skin cancer. *J Exp Med.* 2003 Sep 1;198(5):747-55.
239. Smyth MJ, Crowe NY, Godfrey DI. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol.* 2001 Apr;13(4):459-63.
240. Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med.* 2002 Jul 1;196(1):129-34.
241. Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood.* 2001 Jan 1;97(1):192-7.
242. Street SE, Hayakawa Y, Zhan Y, Lew AM, MacGregor D, Jamieson AM, Diefenbach A, Yagita H, Godfrey DI, Smyth MJ. Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells. *J Exp Med.* 2004 Mar 15;199(6):879-84.

243. Old LJ. Cancer vaccines 2003: opening address. *Cancer Immun.* 2003 Dec 12;3 Suppl 2:1. Epub 2003 Dec 12.
244. Wheelock EF, Weinhold KJ, Levich J. The tumor dormant state. *Adv Cancer Res.* 1981;34:107-40.
245. Uhr JW, Tucker T, May RD, Siu H, Vitetta ES. Cancer dormancy: studies of the murine BCL1 lymphoma. *Cancer Res.* 1991 Sep 15;51(18 Suppl):5045s-5053s.
246. Algarra I, Cabrera T, Garrido F. The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum Immunol.* 2000 Jan;61(1):65-73.
247. Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol.* 2000;74:181-273.
248. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today.* 2000 Sep;21(9):455-64.
249. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol.* 2002 Nov;3(11):999-1005.
250. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* 2002 Oct 17;419(6908):734-8.
251. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D, Yu H. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med.* 2004 Jan;10(1):48-54.
252. Terabe M, Berzofsky JA. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr Opin Immunol.* 2004 Apr;16(2):157-62.
253. Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson DD, Carbone DP, Paul WE, Berzofsky JA. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nat Immunol.* 2000 Dec;1(6):515-20.
254. Demaria S, Pikarsky E, Karin M, Coussens LM, Chen YC, El-Omar EM, Trinchieri G, Dubinett SM, Mao JT, Szabo E, Krieg A, Weiner GJ, Fox BA, Coukos G, Wang E, Abraham RT, Carbone M, Lotze MT. Cancer and inflammation: promise for biologic therapy. *J Immunother.* 2010 May;33(4):335-51.

255. Demaria S, Pilonis KA, Adams S. Cross-Talk of Breast Cancer. Chapter 22. Cells with the Immune System. Breast Cancer – Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways. Edited by Mehmet Gunduz and Esra Gunduz, ISBN 978-953-307-714.
256. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436-44.
257. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74.
258. DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res*. 2007;9(4):212.
259. Gyorki DE, Lindeman GJ. Macrophages, more than just scavengers: their role in breast development and cancer. *ANZ J Surg*. 2008 Jun;78(6):432-6.
260. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436-44.
261. Zeh HJ 3rd, Lotze MT. Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *J Immunother*. 2005 Jan-Feb;28(1):1-9.
262. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1565-70.
263. Disis ML. Immune regulation of cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Oct 10;28(29):4531-8.
264. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev*. 2008 Apr;222:155-61.
265. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, Coussens LM. CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell*. 2009 Aug 4;16(2):91-102.
266. Todaro M, Lombardo Y, Francipane MG, Alea MP, Cammareri P, Iovino F, Di Stefano AB, Di Bernardo C, Agrusa A, Condorelli G, Walczak H, Stassi G. Apoptosis resistance in epithelial tumors is mediated by tumor-cell-derived interleukin-4. *Cell Death Differ*. 2008 Apr;15(4):762-72.

267. Aspod C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M, Tindle S, Burton EC, Su D, Marches F, Banchereau J, Palucka AK. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13 secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. *J Exp Med.* 2007 May 14;204(5):1037-47.
268. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, Banham AH. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.* 2006 Dec 1;24(34):5373-80.
269. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova M, Zhao H, Chen H, Omeroglu G, Meterissian S, Omeroglu A, Hallett M, Park M. Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med.* 2008 May;14(5):518-27.
270. Calabrò A, Beissbarth T, Kuner R, Stojanov M, Benner A, Asslaber M, Ploner F, Zatloukal K, Samonigg H, Poustka A, Sülthmann H. Effects of infiltrating lymphocytes and estrogen receptor on gene expression and prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Jul;116(1):69-77.
271. Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P, Buyse M, Larsimont D, Bontempi G, Delorenzi M, Piccart M, Sotiriou C. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res.* 2008 Aug 15;14(16):5158-65.
272. Aslakson CJ, Miller FR. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. *Cancer Res.* 1992 Mar 15;52(6):1399-405.
273. Kankkunen JP, Harvima IT, Naukkarinen A. Quantitative analysis of tryptase and chymase containing mast cells in benign and malignant breast lesions. *Int J Cancer.* 1997 Jul 29;72(3):385-8.
274. Stuelten CH, Barbul A, Busch JI, Sutton E, Katz R, Sato M, Wakefield LM, Roberts AB, Niederhuber JE. Acute wounds accelerate tumorigenesis by a T cell-dependent mechanism. *Cancer Res.* 2008 Sep 15;68(18):7278-82.
275. DuPre' SA, Hunter KW Jr. Murine mammary carcinoma 4T1 induces a leukemoid reaction with splenomegaly: association with tumor-derived growth factors. *Exp Mol Pathol.* 2007 Feb;82(1):12-24.

276. Kershaw MH, Jackson JT, Haynes NM, Teng MW, Moeller M, Hayakawa Y, Street SE, Cameron R, Tanner JE, Trapani JA, Smyth MJ, Darcy PK. Gene-engineered T cells as a superior adjuvant therapy for metastatic cancer. *J Immunol*. 2004 Aug 1;173(3):2143-50.
277. Shi X, Cao S, Mitsuhashi M, Xiang Z, Ma X. Genome-wide analysis of molecular changes in IL-12-induced control of mammary carcinoma via IFN-gamma-independent mechanisms. *J Immunol*. 2004 Apr 1;172(7):4111-22.
278. Gu Y, Zhang J, Mi W, Yang J, Han F, Lu X, Yu W. Silencing of GM3 synthase suppresses lung metastasis of murine breast cancer cells. *Breast Cancer Res*. 2008;10(1):R1.
279. Wong CW, Song C, Grimes MM, Fu W, Dewhirst MW, Muschel RJ, Al-Mehdi AB. Intravascular location of breast cancer cells after spontaneous metastasis to the lung. *Am J Pathol*. 2002 Sep;161(3):749-53.
280. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, Battula VL, Weil M, Andreeff M, Marini FC. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells*. 2009 Oct;27(10):2614-23.
281. Wang H, Cao F, De A, Cao Y, Contag C, Gambhir SS, Wu JC, Chen X. Trafficking mesenchymal stem cell engraftment and differentiation in tumor-bearing mice by bioluminescence imaging. *Stem Cells*. 2009 Jul;27(7):1548-58.
282. Carlsson G, Ekelund L, Stigsson L, Hafström L. Vascularization and tumour volume estimations of solitary liver tumours in rats. *Ann Chir Gynaecol*. 1983;72(4):187-91.
283. Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1993 Feb 26;159(1-2):197-207.
284. Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. *J Immunol Methods*. 1995 Dec 15;188(1):117-28.
285. Sander B, Höidén I, Andersson U, Möller E, Abrams JS. Similar frequencies and kinetics of cytokine producing cells in murine peripheral blood and spleen. Cytokine detection by immunoassay and intracellular immunostaining. *J Immunol Methods*. 1993 Dec 3;166(2):201-14.

286. Carter LL, Swain SL. Single cell analyses of cytokine production. *Curr Opin Immunol.* 1997 Apr;9(2):177-82.
287. Vikingsson A, Pederson K, Muller D. Enumeration of IFN-gamma producing lymphocytes by flow cytometry and correlation with quantitative measurement of IFN-gamma. *J Immunol Methods.* 1994 Aug 1;173(2):219-28.
288. Elson LH, Nutman TB, Metcalfe DD, Prussin C. Flow cytometric analysis for cytokine production identifies T helper 1, T helper 2, and T helper 0 cells within the human CD4+CD27- lymphocyte subpopulation. *J Immunol.* 1995 May 1;154(9):4294-301.
289. Assenmacher M, Schmitz J, Radbruch A. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells. *Eur J Immunol.* 1994 May;24(5):1097-101.
290. Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z, Treer JR, Waldrop SL, Bergstresser PR, Maino VC. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood.* 1995 Aug 15;86(4):1408-19.
291. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science.* 1997 Sep 26;277(5334):2005-7.
292. Austrup F, Vestweber D, Borges E, Löhning M, Bräuer R, Herz U, Renz H, Hallmann R, Scheffold A, Radbruch A, Hamann A. P- and E-selectin mediate recruitment of T-helper-1 but not T-helper-2 cells into inflamed tissues. *Nature.* 1997 Jan 2;385(6611):81-3.
293. Pala P, Hussell T, Openshaw PJ. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods.* 2000 Sep 21;243(1-2):107-24.
294. Lüthi AU, Cullen SP, McNeela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, Brumatti G, Taylor RC, Kersse K, Vandenabeele P, Lavelle EC, Martin SJ. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity.* 2009 Jul 17;31(1):84-98.
295. Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini F 3rd. Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells.* 2011 Jan;29(1):11-9.
296. Segura JA, Barbero LG, Márquez J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. *FEBS Lett.* 1997 Sep 1;414(1):1-6.

297. Richards J, McNally B, Fang X, Caligiuri MA, Zheng P, Liu Y. Tumor growth decreases NK and B cells as well as common lymphoid progenitor. *PLoS One*. 2008 Sep 11;3(9):e3180.
298. Yamagishi H, Oka T, Hashimoto I, Pellis NR, Kahan BD. The role of the spleen in tumor bearing host: I. Characterization of spleen cells in tumor-bearing mice. *Jpn J Surg*. 1984 Jan;14(1):61-71.
299. Biassoni R, Pessino A, Bottino C, Pende D, Moretta L, Moretta A. The murine homologue of the human Nkp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity. *Eur J Immunol*. 1999 Mar;29(3):1014-20.
300. Gazit R, Gruda R, Elboim M, Arnon TI, Katz G, Achdout H, Hanna J, Qimron U, Landau G, Greenbaum E, Zakay-Rones Z, Porgador A, Mandelboim O. Lethal influenza infection in the absence of the natural killer cell receptor gene *Ncr1*. *Nat Immunol*. 2006 May;7(5):517-23.
301. Joncker NT, Fernandez NC, Treiner E, Vivier E, Raulet DH. NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. *J Immunol*. 2009 Apr 15;182(8):4572-80.
302. Walzer T, Bléry M, Chaix J, Fuseri N, Chasson L, Robbins SH, Jaeger S, André P, Gauthier L, Daniel L, Chemin K, Morel Y, Dalod M, Imbert J, Pierres M, Moretta A, Romagné F, Vivier E. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via Nkp46. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 27;104(9):3384-9.
303. Yu J, Mitsui T, Wei M, Mao H, Butchar JP, Shah MV, Zhang J, Mishra A, Alvarez-Breckenridge C, Liu X, Liu S, Yokohama A, Trotta R, Marcucci G Jr, Benson DM, Loughran TP Jr, Tridandapani S, Caligiuri MA. Nkp46 identifies an NKT cell subset susceptible to leukemic transformation in mouse and human. *J Clin Invest*. 2011 Apr;121(4):1456-70.
304. Swann J, Crowe NY, Hayakawa Y, Godfrey DI, Smyth MJ. Regulation of antitumour immunity by CD1d-restricted NKT cells. *Immunol Cell Biol*. 2004 Jun;82(3):323-31.
305. Gumperz JE. CD1d-restricted "NKT" cells and myeloid IL-12 production: an immunological crossroads leading to promotion or suppression of effective anti-tumor immune responses? *J Leukoc Biol*. 2004 Aug;76(2):307-13.

306. Javia LR, Rosenberg SA. CD4+CD25+ suppressor lymphocytes in the circulation of patients immunized against melanoma antigens. *J Immunother.* 2003 Jan-Feb;26(1):85-93.
307. Marshall NA, Christie LE, Munro LR, Culligan DJ, Johnston PW, Barker RN, Vickers MA. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2004 Mar 1;103(5):1755-62.
308. Frimpong-Boateng K, van Rooijen N, Geiben-Lynn R. Regulatory T cells suppress natural killer cells during plasmid DNA vaccination in mice, blunting the CD8+ T cell immune response by the cytokine TGFbeta. *PLoS One.* 2010 Aug 19;5(8):e12281.
309. Patel SA, Meyer JR, Greco SJ, Corcoran KE, Bryan M, Rameshwar P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *J Immunol.* 2010 May 15;184(10):5885-94.
310. Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, Nam HY, Kim YH, Kim B, Park CG. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med.* 2009 May 31;41(5):315-24.
311. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev.* 2003 Aug;8(3):223-46.
312. Tartour E, Fossiez F, Joyeux I, Galinha A, Gey A, Claret E, Sastre- Garau X, Couturier J, Mosseri V, Vives V, Banchereau J, Fridman WH, Wijdenes J, Lebecque S, Sautès-Fridman C. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. *Cancer Res.* 1999; 59: 3698-3704.
313. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975 Sep;72(9):3666-70.
314. Ling X, Marini F, Konopleva M, Schober W, Shi Y, Burks J, Clise-Dwyer K, Wang RY, Zhang W, Yuan X, Lu H, Caldwell L, Andreeff M. Mesenchymal Stem Cells Overexpressing IFN- β Inhibit Breast Cancer Growth and Metastases through Stat3 Signaling in a Syngeneic Tumor Model. *Cancer Microenviron.* 2010 Mar 19;3(1):83-95.

315. Molloy AP, Martin FT, Dwyer RM, Griffin TP, Murphy M, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ. Mesenchymal stem cell secretion of chemokines during differentiation into osteoblasts, and their potential role in mediating interactions with breast cancer cells. *Int J Cancer*. 2009 Jan 15;124(2):326-32.
316. Cousin B, Ravet E, Poglio S, De Toni F, Bertuzzi M, Lulka H, Touil I, André M, Grolleau JL, Péron JM, Chavoïn JP, Bourin P, Pénicaud L, Casteilla L, Buscail L, Cordelier P. Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2009 Jul 17;4(7):e6278.
317. Otsu K, Das S, Houser SD, Quadri SK, Bhattacharya S, Bhattacharya J. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2009 Apr 30;113(18):4197-205.
318. Lu YR, Yuan Y, Wang XJ, Wei LL, Chen YN, Cong C, Li SF, Long D, Tan WD, Mao YQ, Zhang J, Li YP, Cheng JQ. The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther*. 2008 Feb;7(2):245-51.
319. Kucerova L, Matuskova M, Hlubinova K, Altanerova V, Altaner C. Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells. *Mol Cancer*. 2010 May 28;9:129.
320. Prantl L, Muehlberg F, Navone NM, Song YH, Vykoukal J, Logothetis CJ, Alt EU. Adipose tissue-derived stem cells promote prostate tumor growth. *Prostate*. 2010 Nov 1;70(15):1709-15.
321. Shinagawa K, Kitadai Y, Tanaka M, Sumida T, Kodama M, Higashi Y, Tanaka S, Yasui W, Chayama K. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *Int J Cancer*. 2010 Nov 15;127(10):2323-33.
322. Yu JM, Jun ES, Bae YC, Jung JS. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev*. 2008 Jun;17(3):463-73.
323. Ringdén O, Le Blanc K. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: state of the art and new perspectives. *APMIS*. 2005 Nov-Dec;113(11-12):813-30.
324. Oreffo RO, Cooper C, Mason C, Clements M. Mesenchymal stem cells: lineage, plasticity, and skeletal therapeutic potential. *Stem Cell Rev*. 2005;1(2):169-78.

325. Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, Kobayashi N, Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Nov 16;363(2):247-52.
326. Sasaki M, Abe R, Fujita Y, Ando S, Inokuma D, Shimizu H. Mesenchymal stem cells are recruited into wounded skin and contribute to wound repair by transdifferentiation into multiple skin cell type. *J Immunol.* 2008 Feb 15;180(4):2581-7.
327. Satake K, Lou J, Lenke LG. Migration of mesenchymal stem cells through cerebrospinal fluid into injured spinal cord tissue. *Spine (Phila Pa 1976).* 2004 Sep 15;29(18):1971-9.
328. Neuhuber B, Timothy Himes B, Shumsky JS, Gallo G, Fischer I. Axon growth and recovery of function supported by human bone marrow stromal cells in the injured spinal cord exhibit donor variations. *Brain Res.* 2005 Feb 21;1035(1):73-85.
329. Dwyer RM, Khan S, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ. Advances in mesenchymal stem cell-mediated gene therapy for cancer. *Stem Cell Res Ther.* 2010 Aug 9;1(3):25.
330. Zielske SP, Livant DL, Lawrence TS. Radiation increases invasion of gene-modified mesenchymal stem cells into tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009 Nov 1;75(3):843-53.
331. Devine SM, Cobbs C, Jennings M, Bartholomew A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood.* 2003 Apr 15;101(8):2999-3001.
332. Kraitchman DL, Tatsumi M, Gilson WD, Ishimori T, Kedziorek D, Walczak P, Segars WP, Chen HH, Fritzges D, Izbudak I, Young RG, Marcelino M, Pittenger MF, Solaiyappan M, Boston RC, Tsui BM, Wahl RL, Bulte JW. Dynamic imaging of allogeneic mesenchymal stem cells trafficking to myocardial infarction. *Circulation.* 2005 Sep 6;112(10):1451-61.
333. Liu XB, Chen H, Chen HQ, Zhu MF, Hu XY, Wang YP, Jiang Z, Xu YC, Xiang MX, Wang JA. Angiopoietin-1 preconditioning enhances survival and functional recovery of mesenchymal stem cell transplantation. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2012 Aug;13(8):616-23.

334. Lin YT, Chern Y, Shen CK, Wen HL, Chang YC, Li H, Cheng TH, Hsieh-Li HM. Human mesenchymal stem cells prolong survival and ameliorate motor deficit through trophic support in Huntington's disease mouse models. *PLoS One*. 2011;6(8):e22924.
335. Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, Battula VL, Weil M, Andreeff M, Marini FC. Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells*. 2009 Oct;27(10):2614-23.
336. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, Baan CC, Dahlke MH, Hoogduijn MJ. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol*. 2012;3:297.
337. Gonzalez-Rey E, Anderson P, González MA, Rico L, Büscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*. 2009 Jul;58(7):929-39.
338. Semedo P, Correa-Costa M, Antonio Cenedeze M, Maria Avancini Costa Malheiros D, Antonia dos Reis M, Shimizu MH, Seguro AC, Pacheco-Silva A, Saraiva Camara NO. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem Cells*. 2009 Dec;27(12):3063-73.
339. Kanazawa H, Fujimoto Y, Teratani T, Iwasaki J, Kasahara N, Negishi K, Tsuruyama T, Uemoto S, Kobayashi E. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model. *PLoS One*. 2011 Apr 29;6(4):e19195.
340. Yang X, Balakrishnan I, Torok-Storb B, Pillai MM. Marrow Stromal Cell Infusion Rescues Hematopoiesis in Lethally Irradiated Mice despite Rapid Clearance after Infusion. *Adv Hematol*. 2012;2012:142530.
341. Thum T, Bauersachs J, Poole-Wilson PA, Volk HD, Anker SD. The dying stem cell hypothesis: immune modulation as a novel mechanism for progenitor cell therapy in cardiac muscle. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Nov 15;46(10):1799-802.
342. Lu W, Fu C, Song L, Yao Y, Zhang X, Chen Z, Li Y, Ma G, Shen C. Exposure to supernatants of macrophages that phagocytized dead mesenchymal stem cells improves hypoxic cardiomyocytes survival. *Int J Cardiol*. 2012 Apr 2.

343. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Ishi H, Beppu T, Nakamori S, Baba H, Mori M. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci.* 2010 Feb;101(2):293-9.
344. Corcoran KE, Trzaska KA, Fernandes H, Bryan M, Taborga M, Srinivas V, Packman K, Patel PS, Rameshwar P. Mesenchymal stem cells in early entry of breast cancer into bone marrow. *PLoS One.* 2008 Jun 25;3(6):e2563
345. Djouad F, Bony C, Apparailly F, Louis-Plence P, Jorgensen C, Noël D. Earlier onset of syngeneic tumors in the presence of mesenchymal stem cells. *Transplantation.* 2006 Oct 27;82(8):1060-6.
346. Muehlberg FL, Song YH, Krohn A, Pinilla SP, Droll LH, Leng X, Seidensticker M, Ricke J, Altman AM, Devarajan E, Liu W, Arlinghaus RB, Alt EU. Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis.* 2009 Apr;30(4):589-97.
347. Galiè M, Konstantinidou G, Peroni D, Scambi I, Marchini C, Lisi V, Krampera M, Magnani P, Merigo F, Montani M, Boschi F, Marzola P, Orrù R, Farace P, Sbarbati A, Amici A. Mesenchymal stem cells share molecular signature with mesenchymal tumor cells and favor early tumor growth in syngeneic mice. *Oncogene.* 2008 Apr 17;27(18):2542-51.
348. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene.* 2000 May 15;19(21):2474-88.
349. Clevenger CV. Roles and regulation of stat family transcription factors in human breast cancer. *Am J Pathol.* 2004 Nov;165(5):1449-60.
350. Darnell JE Jr. STATs and gene regulation. *Science.* 1997 Sep 12;277(5332):1630-5.
351. Ling X, Arlinghaus RB. Knockdown of STAT3 expression by RNA interference inhibits the induction of breast tumors in immunocompetent mice. *Cancer Res.* 2005 Apr 1;65(7):2532-6.
352. Ling X, Konopleva M, Zeng Z, Ruvolo V, Stephens LC, Schober W, McQueen T, Dietrich M, Madden TL, Andreeff M. The novel triterpenoid C-28 methyl ester of 2-cyano-3, 12-dioxoolen-1, 9-dien-28-oic acid inhibits metastatic murine breast tumor growth through inactivation of STAT3 signaling. *Cancer Res.* 2007 May 1;67(9):4210-8.

353. Carraway KL 3rd, Sweeney C. Co-opted integrin signaling in ErbB2-induced mammary tumor progression. *Cancer Cell*. 2006 Aug;10(2):93-5.
354. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol*. 2004 Dec;4(12):941-52.
355. Gervais A, Levêque J, Bouet-Toussaint F, Burtin F, Lesimple T, Sulpice L, Patard JJ, Genetet N, Catros-Quemener V. Dendritic cells are defective in breast cancer patients: a potential role for polyamine in this immunodeficiency. *Breast Cancer Res*. 2005;7(3):R326-35.
356. Nefedova Y, Gabrilovich DI. Targeting of Jak/STAT pathway in antigen presenting cells in cancer. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007 Feb;7(1):71-7.
357. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:267-96.
358. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jan;7(1):41-51.
359. Schabowsky RH, Madireddi S, Sharma R, Yolcu ES, Shirwan H. Targeting CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T-cells for the augmentation of cancer immunotherapy. *Curr Opin Investig Drugs*. 2007 Dec;8(12):1002-8.
360. Elpek KG, Lacelle C, Singh NP, Yolcu ES, Shirwan H. CD4+CD25+ T regulatory cells dominate multiple immune evasion mechanisms in early but not late phases of tumor development in a B cell lymphoma model. *J Immunol*. 2007 Jun 1;178(11):6840-8.
361. Filaci G, Fenoglio D, Fravega M, Ansaldo G, Borgonovo G, Traverso P, Villaggio B, Ferrera A, Kunkl A, Rizzi M, Ferrera F, Balestra P, Ghio M, Contini P, Setti M, Olive D, Azzarone B, Carmignani G, Ravetti JL, Torre G, Indiveri F. CD8+ CD28- T regulatory lymphocytes inhibiting T cell proliferative and cytotoxic functions infiltrate human cancers. *J Immunol*. 2007 Oct 1;179(7):4323-34.
362. Wang HY, Wang RF. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol*. 2007 Apr;19(2):217-23.
363. Pallandre JR, Brillard E, Créhange G, Radlovic A, Remy-Martin JP, Saas P, Rohrlich PS, Pivot X, Ling X, Tiberghien P, Borg C. Role of STAT3 in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory lymphocyte generation: implications in graft-versus-host disease and antitumor immunity. *J Immunol*. 2007 Dec 1;179(11):7593-604.

364. Hall B, Andreeff M, Marini F. The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb Exp Pharmacol*. 2007;(180):263-83.
365. Lieblein JC, Ball S, Hutzen B, Sasser AK, Lin HJ, Huang TH, Hall BM, Lin J. STAT3 can be activated through paracrine signaling in breast epithelial cells. *BMC Cancer*. 2008 Oct 21;8:302.
366. Haura EB, Turkson J, Jove R. Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2005 Jun;2(6):315-24.
367. Yamagishi H, Kahan BD, Pellis NR. Generation of tumor facilitating and neutralizing lymphoid cells by extracted tumor antigens. *Fed Proc Amer Soc Exp Biol* 1979; 38: 1104.
368. Yamagishi H, Oka T, Hashimoto I, Pellis NR, Kahan BD. The role of the spleen in tumor bearing host: I. Characterization of spleen cells in tumor-bearing mice. *Jpn J Surg*. 1984 Jan;14(1):61-71.
369. Stagg J. Immune regulation by mesenchymal stem cells: two sides to the coin. *Tissue Antigens*. 2007 Jan;69(1):1-9.
370. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*. 2003 Jan;57(1):11-20.
371. Terabe M, Berzofsky JA. The role of NKT cells in tumor immunity. *Adv Cancer Res*. 2008;101:277-348..
372. Schmiege J, Yang G, Franck RW, Tsuji M. Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-Galactosylceramide. *J Exp Med*. 2003 Dec 1;198(11):1631-41.
373. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Taura I, Kaneko Y, Sato H, Kondo E, Harada M, Koseki H, Nakayama T, Tanaka Y, Taniguchi M. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 12;95(10):5690-3.
374. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:197-223.

375. Makino Y, Kanno R, Ito T, Higashino K, Taniguchi M. Predominant expression of invariant V alpha 14+ TCR alpha chain in NK1.1+ T cell populations. *Int Immunol*. 1995 Jul;7(7):1157-61.
376. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol*. 2004 Mar;4(3):231-7.
377. Peralbo E, Alonso C, Solana R. Invariant NKT and NKT-like lymphocytes: two different T cell subsets that are differentially affected by ageing. *Exp Gerontol*. 2007 Aug;42(8):703-8. Epub 2007 May 21.
378. Eberl G, Lees R, Smiley ST, Taniguchi M, Grusby MJ, MacDonald HR. Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. *J Immunol*. 1999 Jun 1;162(11):6410-9.
379. Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:197-223.
380. Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med*. 1997 Oct 6;186(7):1129-36.
381. Hollyoake M, Campbell RD, Aguado B. NKp30 (NCR3) is a pseudogene in 12 inbred and wild mouse strains, but an expressed gene in *Mus caroli*. *Mol Biol Evol*. 2005 Aug;22(8):1661-72.
382. Walzer T, Bléry M, Chaix J, Fuseri N, Chasson L, Robbins SH, Jaeger S, André P, Gauthier L, Daniel L, Chemin K, Morel Y, Dalod M, Imbert J, Pierres M, Moretta A, Romagné F, Vivier E. Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 27;104(9):3384-9.
383. Bendelac AM, Rivera N, Park SH, Roark JH. Mouse CD1- specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 1997; 15:535.
384. Ohteki T, MacDonald HR. Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4+8- and CD4-8- subsets of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells in the liver of mice. *J Exp Med*. 1994 Aug 1;180(2):699-704.
385. Yankelevich B, Knobloch C, Nowicki M, Dennert G. A novel cell type responsible for marrow graft rejection in mice. T cells with NK phenotype cause acute rejection of marrow grafts. *J Immunol*. 1989 May 15;142(10):3423-30.

386. Ballas ZK, Rasmussen W. NK1.1+ thymocytes. Adult murine CD4-, CD8- thymocytes contain an NK1.1+, CD3+, CD5hi, CD44hi, TCR-V beta 8+ subset. *J Immunol.* 1990 Aug 15;145(4):1039-45.
387. Sykes M. Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and alpha beta TCR+NK1.1+ cells. *J Immunol.* 1990 Nov 15;145(10):3209-15.
388. Bach JF, Bendelac A, Brenner MB, Cantor H, De Libero G, Kronenberg M, Lanier LL, Raulet DH, Shlomchik MJ, von Herrath MG. The role of innate immunity in autoimmunity. *J Exp Med.* 2004 Dec 20;200(12):1527-31.
389. Yamamura T, Sakuishi K, Illés Z, Miyake S. Understanding the behavior of invariant NKT cells in autoimmune diseases. *J Neuroimmunol.* 2007 Nov;191(1-2):8-15.
390. Shiozawa Y, Havens AM, Pienta KJ, Taichman RS. The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. *Leukemia.* 2008 May;22(5):941-50.
391. Nauta AJ, Fibbe WE. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* 2007 Nov 15;110(10):3499-506.
392. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 2006 Oct;36(10):2566-73.
393. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008 Sep;8(9):726-36.
394. Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2006 Jul 15;312(12):2169-79.
395. Prigione I, Benvenuto F, Bocca P, Battistini L, Uccelli A, Pistoia V. Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and gammadelta T cells or invariant natural killer T cells. *Stem Cells.* 2009 Mar;27(3):693-702.
396. Smyth MJ, Taniguchi M, Street SE. The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *J Immunol.* 2000 Sep 1;165(5):2665-70.
397. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY, Godfrey DI. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med.* 2000 Feb 21;191(4):661-8.

398. Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Van Kaer L, Saiki I, Okumura K. Critical contribution of IFN-gamma and NK cells, but not perforin-mediated cytotoxicity, to anti-metastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol.* 2001 Jun;31(6):1720-7.
399. Kawamura T, Takeda K, Mendiratta SK, Kawamura H, Van Kaer L, Yagita H, Abo T, Okumura K. Critical role of NK1+ T cells in IL-12-induced immune responses in vivo. *J Immunol.* 1998 Jan 1;160(1):16-9.
400. Tahir SM, Cheng O, Shaulov A, Koezuka Y, Bublej GJ, Wilson SB, Balk SP, Exley MA. Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J Immunol.* 2001 Oct 1;167(7):4046-50.
401. Yanagisawa K, Seino K, Ishikawa Y, Nozue M, Todoroki T, Fukao K. Impaired proliferative response of V alpha 24 NKT cells from cancer patients against alpha-galactosylceramide. *J Immunol.* 2002 Jun 15;168(12):6494-9.
402. Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res.* 2003 Aug 1;63(15):4516-20.
403. Shevach EM. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol.* 2002 Jun;2(6):389-400.
404. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory lymphocytes: Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 2003 Mar;3(3):199-210.
405. Maloy KJ, Powrie F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol.* 2001 Sep;2(9):816-22.
406. Wang RF. CD8+ regulatory T cells, their suppressive mechanisms, and regulation in cancer. *Hum Immunol.* 2008 Nov;69(11):811-4.
407. Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol.* 2009 Jul;10(7):689-95.
408. Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell.* 2008 Aug 8;134(3):392-404.
409. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998 Jul 20;188(2):287-96.

410. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 2008 Oct 15;181(8):5791-802.
411. Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, Zhang Q, Lonning S, Teicher BA, Lee C. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):2883-92.
412. Olkhanud PB, Baatar D, Bodogai M, Hakim F, Gress R, Anderson RL, Deng J, Xu M, Briest S, Biragyn A. Breast cancer lung metastasis requires expression of chemokine receptor CCR4 and regulatory T cells. *Cancer Res*. 2009 Jul 15;69(14):5996-6004.
413. Lelekakis M, Moseley JM, Martin TJ, Hards D, Williams E, Ho P, Lowen D, Javni J, Miller FR, Slaviv J, Anderson RL. A novel orthotopic model of breast cancer metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis*. 1999 Mar;17(2):163-70.
414. DuPré SA, Redelman D, Hunter KW Jr. The mouse mammary carcinoma 4T1: characterization of the cellular landscape of primary tumours and metastatic tumour foci. *Int J Exp Pathol*. 2007 Oct;88(5):351-60.
415. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330-6.
416. Serafini P, De Santo C, Marigo I, Cingarlini S, Dolcetti L, Gallina G, Zanovello P, Bronte V. Derangement of immune responses by myeloid suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2004 Feb;53(2):64-72.
417. Okudaira K, Hokari R, Tsuzuki Y, Okada Y, Komoto S, Watanabe C, Kurihara C, Kawaguchi A, Nagao S, Azuma M, Yagita H, Miura S. Blockade of B7-H1 or B7-DC induces an anti-tumor effect in a mouse pancreatic cancer model. *Int J Oncol*. 2009 Oct;35(4):741-9.
418. Phares TW, Ramakrishna C, Parra GI, Epstein A, Chen L, Atkinson R, Stohlman SA, Bergmann CC. Target-dependent B7-H1 regulation contributes to clearance of central nervous system infection and dampens morbidity. *J Immunol*. 2009 May 1;182(9):5430-8.
419. Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J Immunol*. 2001 Mar 1;166(5):3008-18.
420. Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, Kuchroo VK, Oukka M, Weiner HL. A dominant function for interleukin 27 in generating

- interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol.* 2007 Dec;8(12):1380-9.
421. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, Cross R, Sehy D, Blumberg RS, Vignali DA. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 2007 Nov 22;450(7169):566-9.
422. Ammirante M, Luo JL, Grivennikov S, Nedospasov S, Karin M. B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature.* 2010 Mar 11;464(7286):302-5.
423. Rafei M, Hsieh J, Zehntner S, Li M, Forner K, Birman E, Boivin MN, Young YK, Perreault C, Galipeau J. A granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-15 fusokine induces a regulatory B cell population with immune suppressive properties. *Nat Med.* 2009 Sep;15(9):1038-45.
424. Curti A, Pandolfi S, Valzasina B, Aluigi M, Isidori A, Ferri E, Salvestrini V, Bonanno G, Rutella S, Durelli I, Horenstein AL, Fiore F, Massaia M, Colombo MP, Baccarani M, Lemoli RM. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25⁻ into CD25⁺ T regulatory cells. *Blood.* 2007 Apr 1;109(7):2871-7.
425. Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells.* 2008 Jan;26(1):212-22.
426. Casiraghi F, Azzollini N, Cassis P, Imberti B, Morigi M, Cugini D, Cavinato RA, Todeschini M, Solini S, Sonzogni A, Perico N, Remuzzi G, Noris M. Pretransplant infusion of mesenchymal stem cells prolongs the survival of a semiallogeneic heart transplant through the generation of regulatory T cells. *J Immunol.* 2008 Sep 15;181(6):3933-46.
427. Janeway C. T-cell mediated immunity. In *Janeway's Immunobiology*. 7th edition. Edited by Murphy K, Travers P, Walport M. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group; 2008:364-368.
428. Rasmusson I, Uhlin M, Le Blanc K, Levitsky V. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2007 Oct;82(4):887-93.

429. Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daut L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4⁺ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005 Apr;90(4):516-25.
430. Karlsson H, Samarasinghe S, Ball LM, Sundberg B, Lankester AC, Dazzi F, Uzunel M, Rao K, Veys P, Le Blanc K, Ringdén O, Amrolia PJ. Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):532-41.
431. Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A. Generation of CD4⁺ or CD8⁺ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*. 2007 Jul;92(7):881-8.
432. Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther*. 2011 Aug 11;2(4):34.
433. Papamichail M, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN. Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. *Cancer Immunol Immunother*. 2004 Mar;53(3):176-86.
434. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*. 1989;47:187-376.
435. Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:359-93.
436. Zitvogel L. Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *J Exp Med*. 2002 Feb 4;195(3):F9-14.
437. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 2003;5(6):485-9.
438. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*. 2003 Oct;31(10):890-6.
439. Carson WE, Fehniger TA, Haldar S, Eckhert K, Lindemann MJ, Lai CF, Croce CM, Baumann H, Caligiuri MA. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest*. 1997 Mar 1;99(5):937-43.
440. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaeheri BA, Ghayur T, Carson WE, Caligiuri MA. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood*. 2001 May 15;97(10):3146-51.

441. Tangye SG, Cherwinski H, Lanier LL, Phillips JH. 2B4-mediated activation of human natural killer cells. *Mol Immunol*. 2000 Jun;37(9):493-501.
442. Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H. New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002 Nov;2(11):850-61.
443. Chiesa S, Tomasello E, Vivier E, Vély F. Coordination of activating and inhibitory signals in natural killer cells. *Mol Immunol*. 2005 Feb;42(4):477-84.
444. Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, Suzuki K, Wechser M, Goodsaid F, Caligiuri MA. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol*. 1999 Apr 15;162(8):4511-20.
445. Koc FJ. Regulation of adaptive immunity by natural killer cells. *Immunol Res*. 1998;17(3):303-12.
446. Radosavljevic G, Ljubic B, Jovanovic I, Srzentic Z, Pavlovic S, Zdravkovic N, Milovanovic M, Bankovic D, Knezevic M, Acimovic LJ, Arsenijevic N. Interleukin-17 may be a valuable serum tumor marker in patients with colorectal carcinoma. *Neoplasma*. 2010;57(2):135-44.
447. Plunkett TA, Correa I, Miles DW, Taylor-Papadimitriou J. Breast cancer and the immune system: opportunities and pitfalls. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2001 Oct;6(4):467-75.
448. Ito N, Nakamura H, Tanaka Y, Ohgi S. Lung carcinoma: analysis of T helper type 1 and 2 cells and T cytotoxic type 1 and 2 cells by intracellular cytokine detection with flow cytometry. *Cancer*. 1999 Jun 1;85(11):2359-67.
449. Dobrzanski MJ, Reome JB, Hyland JC, Rewers-Felkins KA. CD8-mediated type 1 antitumor responses selectively modulate endogenous differentiated and nondifferentiated T cell localization, activation, and function in progressive breast cancer. *J Immunol*. 2006 Dec 1;177(11):8191-201.
450. Nishimura T, Nakui M, Sato M, Iwakabe K, Kitamura H, Sekimoto M, Ohta A, Koda T, Nishimura S. The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2000;46 Suppl:S52-61.
451. Ellyard JI, Simson L, Parish CR. Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens*. 2007 Jul;70(1):1-11.

452. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Miller JF, Heath WR. Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help. *J Exp Med*. 1997 Jul 7;186(1):65-70.
453. Smith CM, Wilson NS, Waithman J, Villadangos JA, Carbone FR, Heath WR, Belz GT. Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat Immunol*. 2004 Nov;5(11):1143-8.
454. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986 Apr 1;136(7):2348-57.
455. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. 1996 Mar;17(3):138-46.
456. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1123-32. .
457. Stout RD, Bottomly K. Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages. *J Immunol*. 1989 Feb 1;142(3):760-5.
458. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med*. 1998 Dec 21;188(12):2357-68.
459. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol*. 2006 Jan;27(1):17-23.
460. Hermann-Kleiter N, Baier G. NFAT pulls the strings during CD4+ T helper cell effector functions. *Blood*. 2010 Apr 15;115(15):2989-97.
461. Bach EA, Aguet M, Schreiber RD The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:563-91.
462. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:749-95.

463. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*. 1994 Sep;1(6):447-56.
464. MacEwan DJ. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal*. 2002 Jun;14(6):477-92.
465. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003 Jan;10(1):45-65.
466. Lim JH, Kim JS, Yoon IH, Shin JS, Nam HY, Yang SH, Kim SJ, Park CG. Immunomodulation of delayed-type hypersensitivity responses by mesenchymal stem cells is associated with bystander T cell apoptosis in the draining lymph node. *J Immunol*. 2010 Oct 1;185(7):4022-9.
467. Aksu AE, Horibe E, Sacks J, Ikeguchi R, Breiting J, Scozio M, Unadkat J, Feili-Hariri M. Co-infusion of donor bone marrow with host mesenchymal stem cells treats GVHD and promotes vascularized skin allograft survival in rats. *Clin Immunol*. 2008 Jun;127(3):348-58.
468. González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stem cells alleviate experimental colitis by inhibiting inflammatory and autoimmune responses. *Gastroenterology*. 2009 Mar;136(3):978-89.
469. Wan YY, Flavell RA. How diverse--CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol*. 2009 Oct;1(1):20-36.
470. Carter RW, Sweet MJ, Xu D, Klemenz R, Liew FY, Chan WL. Regulation of ST2L expression on T helper (Th) type 2 cells. *Eur J Immunol*. 2001 Oct;31(10):2979-85.
471. Kienzle N, Buttigieg K, Groves P, Kawula T, Kelso A. A clonal culture system demonstrates that IL-4 induces a subpopulation of noncytolytic T cells with low CD8, perforin, and granzyme expression. *J Immunol*. 2002 Feb 15;168(4):1672-81.
472. Kienzle N, Olver S, Buttigieg K, Groves P, Janas ML, Baz A, Kelso A. Progressive differentiation and commitment of CD8⁺ T cells to a poorly cytolytic CD8^{low} phenotype in the presence of IL-4. *J Immunol*. 2005 Feb 15;174(4):2021-9.
473. Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, Miller RH. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia*. 2009 Aug 15;57(11):1192-203.

474. Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, Selig M, Godwin J, Law K, Placidi C, Smith RN, Capella C, Rodig S, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH, Abdi R. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol.* 2009 Jul 15;183(2):993-1004.
475. Awasthi A, Kuchroo VK. Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int Immunol.* 2009 May;21(5):489-98.
476. Wakefield LM, Roberts AB. TGF-beta signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2002 Feb;12(1):22-9.
477. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, Robbins PD, Tahara H, Lotze MT. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood.* 2003 Apr 1;101(7):2620-7.
478. Hirahara N, Nio Y, Sasaki S, Minari Y, Takamura M, Iguchi C, Dong M, Yamasawa K, Tamura K. Inoculation of human interleukin-17 gene-transfected Meth-A fibrosarcoma cells induces T cell-dependent tumor-specific immunity in mice. *Oncology.* 2001;61(1):79-89.
479. Hirahara N, Nio Y, Sasaki S, Takamura M, Iguchi C, Dong M, Yamasawa K, Itakura M, Tamura K. Reduced invasiveness and metastasis of Chinese hamster ovary cells transfected with human interleukin-17 gene. *Anticancer Res.* 2000 Sep-Oct;20(5A):3137-42.
480. Wang J, Wang G, Sun B, Li H, Mu L, Wang Q, Li G, Shi L, Jin L, Kostulas N. Interleukin-27 suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis during bone marrow stromal cell treatment. *J Autoimmun.* 2008 Jun;30(4):222-9.
481. Carrión F, Nova E, Luz P, Apablaza F, Figueroa F. Opposing effect of mesenchymal stem cells on Th1 and Th17 cell polarization according to the state of CD4+ T cell activation. *Immunol Lett.* 2011 Mar 30;135(1-2):10-6.
482. Sioud M, Mobergslien A, Boudabous A, Fløisand Y. Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation. *Scand J Immunol.* 2010 Apr;71(4):267-74.
483. Boumaza I, Srinivasan S, Witt WT, Feghali-Bostwick C, Dai Y, Garcia-Ocana A, Feili-Hariri M. Autologous bone marrow-derived rat mesenchymal stem cells promote PDX-1 and insulin expression in the islets, alter T cell cytokine pattern and preserve regulatory T cells in the periphery and induce sustained normoglycemia. *J Autoimmun.* 2009 Feb;32(1):33-42.

8. ПРИЛОГ

8.1 КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ

ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације:

Монографска публикација

ТД

Тип записа:

Текстуални штампани материјал

ТЗ

Врста рада:

Докторска дисертација

ВР

Аутор:

Биљана Т. Љујић

АУ

Ментор/коментор

Проф. др Миодраг Стојковић

Наслов рада: Испитивање улоге и значаја STAT3
НР молекула и хуманих мезенхималних матичних ћелија у
експерименталном моделу карцинома дојке

Језик публикације: Српски (ћирилица)
ЈП

Језик извода: Српски/енглески
ЈИ

Земља публикавања: Србија
ЗП

Уже географско подручје: Србија
УГП

Година: 2013.
ГО

Издавач: Ауторски репринт
ИЗ

Место и адреса: 34000 Крагујевац, Србија
МС Светозара Марковића 69

Физички опис рада: Дисертација има 147 страна, садржи
ФО 7 поглавља, 5 слика, 13 графикона,
4 табеле и 483 референце

Научна област: Медицина

Научна дисциплина: Имунологија

ДИ

Предметна одредница/кључне речи: hMSC, карцином дојке,

ПО 4T1, STAT3, имуносупресија

УДК

Чува се: У Библиотеци Факултета медицинских

ЧУ наука у Крагујевцу, 34000 Крагујевац Србија,

Светозара Марковића 69

Важна напомена:

МН

Извод:

ИД

Хумане мезенхималне матичне ћелије (hMSC) могу да мигрирају у тумор, интегришу се у строму и промовишу његов раст. Утицај hMSC на раст тумора као и њихова улога у имунологији тумора још увек је контроверзна и недовољно расветљена. Стога је у овом раду испитиван утицај hMSC на појаву, раст и метастазирање тумора и антитуморски имуниски одговор у експерименталном моделу тумора дојке. Резултати ове студије показују да системска апликација hMSC у BALB/c мишеве којима су трансплантиране 4T1 туморске ћелије, промовише раст и метастазирање тумора дојке. Ови тумор промовишући ефекти hMSC нису последица активације STAT3 пута у туморском ткиву. Детектована промоција раста и метастазирања тумора удружена је са смањеном цитотоксичном активношћу спленоцита, NK и CD8⁺ Т ћелија *in vitro*. Оболели мишеви којима су апликоване hMSC имали су значајно нижи проценат CD3⁺NKp46⁺ NKT-like ћелија и значајно виши проценат CD4⁺Foxp3⁺ Т ћелија, уз истовремено повећан ниво Th2 и смањен ниво Th1 цитокина у серуму. Такође, значајно више CD4⁺IL-10⁺ Т лимфоцита детектовано је у истој групи мишева. Наши резултати показују да прогресија и метастазирање тумора дојке у групи мишева третираних hMSC кореспондира у највећој мери са повишеним нивоом Th2 цитокина и повећаним процентом CD4⁺Foxp3⁺ Т ћелија.

У закључку, обезбедили смо прве доказ да интравенска апликација hMSC у експерименталном моделу тумора дојке повећава заступљеност Th2 и T_{reg} лимфоцита у слезинама оболелих мишева што има за последице повећање концентрације имуносупресивних цитокина у циркулацији, снижене активности цитотоксичких ћелија неспецифичне и специфичне имуности и следствено убрзану прогресију карцинома дојке што се мора имати у виду приликом потенцијалне системске примене MSC у различитим патолошким стањима.

Датум прихватања теме од стране ННВ:

24.01.2011.

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

Председник: Проф. др Миодраг Лукић, професор емеритус за ужу научну област Микробиологија и имунологија, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Ментор: Проф. др Миодраг Стојковић, редовни професор за ужу научну област Генетика, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Члан: Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Члан: Проф. др Срђан Пешић, редовни професор за ужу научну област Фармакологија, Медицински факултет Универзитета у Нишу

8.2 KEY WORDS DOCUMENTATION

UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC

FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Documentation type:

Monographic publication

DT

Type of record:

Textual printed material

TR

Contents code:

PhD thesis

CC

Author:

Biljana T. Ljujić

AU

Menthor/co-mentor:

Prof. dr Miodrag Stojković

MN

Title:

The role and significance of STAT3 molecule and
human mesenchymal stem cells in experimental
model of mammary carcinoma.

TI

Language of text:

Serbian (Cyrillic)

LT

Language of abstract:

Serbian/English

Country of publication: Serbia

CP

Locality of publication: Serbia

LP

Publication year: 2013.

PY

Publisher: Author reprint

PU

Publication place: 34000 Kragujevac, Serbia

PP Svetozara Markovica 69

Physical description: Thesis contains 147 pages, 7 chapters,

PD 5 pictures, 13 graphs, 4 tables

and 483 citations

Scientific field: Medicine

SF

Scientific discipline: Immunology

SD

Subject/key words: hMSC, mammary carcinoma,

SKW 4T1, STAT3, immunosuppression

UDC

Holding data: Library of Medical faculty Kragujevac

34000 Kragujevac, Serbia

Svetozara Markovica 69

Note:

N

Abstract:

AB

Human mesenchymal stem cells (hMSC) can home to tumor sites, integrate into tumor-associated stroma and promote tumor growth. The effects of hMSC on tumor growth are controversial and involvement of hMSC in tumor immunology has not been adequately addressed. Therefore, we investigated whether injection of hMSC affects tumor appearance, growth and metastasis, and anti-tumor immunity in an experimental animal model of metastatic breast cancer. Injection of hMSC in BALB/c mice bearing mammary carcinoma promoted tumor growth and metastasis. This promotion of tumor growth is not consequence of activation of STAT3 molecules in the tumor tissue. The promotion of tumor growth and metastasis was accompanied by lower cytotoxic activity of splenocytes, NK cells and CD8⁺ T cells *in vitro*. Tumor-bearing mice that received hMSC had significantly lower percentages of CD3⁺NKp46⁺ NKT-like but significantly higher percentages of CD4⁺Foxp3⁺ T cells. Increased serum levels of Th2 and decreased serum levels of Th1 cytokines were associated with injection of hMSC in tumor-bearing animals. Also, a significantly higher number of CD4⁺ cells expressing IL-10 were found in tumor-bearing animals that received hMSC compared with other recipients. These results demonstrate that promoted breast cancer progression and metastasis in mice treated with hMSC corresponds mainly to increased systemic Th2 cytokines, and enhanced percentage of CD4⁺Foxp3⁺ T cells.

In summary, we have provided the first evidence that intravenous application of hMSC in an experimental animal model of breast cancer increases percentages of Th2 and T_{reg} cells in spleen of tumor-bearing animals resulting in increased serum levels of immunosuppressive cytokines, decreased cytotoxic activity of the cells of non-specific and specific immunity and promotion of tumor progression. All of these facts must be considered in potential systemic application of MSC in various pathological conditions.

Accepted by the Scientific Board on:

24.01.2011.

ASB

Defended on:

DE

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

President: Prof. dr Miodrag Lukić, Professor Emeritus of
Microbiology and Immunology, Faculty of Medical Sciences,
University of Kragujevac

Menthor: Prof. dr Miodrag Stojković, Professor of Genetics,
Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

Member: Prof. dr Nebojša Arsenijević, Professor of
Microbiology and Immunology, Basic of Oncology,
Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

Member: Prof. dr Srdjan Pešić, Proffesor of Pharmacology,
Faculty of Medicine, University of Niš

8.3 БИОГРАФСКИ ПОДАЦИ АУТОРА

Биљана Љујић рођена је 23.11.1974. године у Новој Вароши. Основну школу је завршила у Новој Вароши, а средњу Медицинску у Крагујевцу. Медицинску факултет у Крагујевцу, уписала је школске 1993/94. године, а дипломирала 18. јула 2005. године са просечном оценом 8,20 и тиме стекла звање доктора медицине. Обавила је општи лекарски стаж и положила стручни испит. Академске докторске студије-изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација на Факултету медицинских наука у Крагујевцу уписала је школске 2005/06. године. Усмени докторски испит положила је 26.06.2007. године са оценом 10 (десет).

Од 07. јуна 2007. године запослена је на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. 2007. и 2009. године биран је у звање Асистента за ужу научну област Генетика на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. У школској 2011/2012. години уз сагласност Министарства здравља Републике Србије и Факултету медицинских наука у Крагујевцу уписала је специјалистичке студије из области Имунологије. Члан је Друштва имунолога Србије.

Кандидат Биљана Љујић је кроз разне видове укључена у наставни и научно-истраживачки рад. Активно се бави научно истраживачким радом у лабораторијама Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија, Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Континуирани научно истраживачки се огледа у учешћу на бројним пројектима које финансира Министарство за науку и технолошки развој Републике Србије, као и Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

Биљана Љујић је остварио **57,5** бода по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета:

1. десет радова у целини публикована у научним часописима међународног значаја;
2. два рада у целини публикована у националним часописима;
3. већи број сажетака на међународним и домаћим научним скуповима.

8.4 СПИСАК ОБЈАВЉЕНИХ РАДОВА

Научни радови објављени у целини у часописима међународног значаја:

1. **Ljujic B**, Milovanovic M, Volarevic V, Murray B, Bugarski D, Przyborski S, Arsenijevic N, Lukic L M, Stojkovic M. Human mesenchymal stem cells creating an immunosuppressive environment and promote breast cancer in mice. *SCIENTIFIC REPORTS* 2013; 3:2298.

M21-8 бодова

2. Volarevic V, **Ljujic B**, Stojkovic P, Lukic A, Arsenijevic N, Stojkovic M. Human stem cell research and regenerative medicine—present and future. *British Medical Bulletin* 2011;99(1):155-168.

M21-8 бодова

3. Volarevic V, Milovanovic M, **Ljujic B**, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, Leffler H, Lukic ML. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 2012 Jun;55(6):1954-64.

M21-8 бодова

4. Milovanovic M, Volarevic V, **Ljujic B**, Radosavljevic G, Jovanovic I, Arsenijevic N, Lukic ML. Deletion of IL-33R (ST2) Abrogates Resistance to EAE in BALB/C Mice by Enhancing Polarization of APC to Inflammatory Phenotype. *Plos ONE* 2012;7(9):e45225.

M21-8 бодова

5. **Ljujic B**, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pavlovic S, Zdravkovic N, Milovanovic M, Acimovic Lj, Knezevic M, Bankovic D, Zdravkovic D and Arsenijevic N. Elevated Serum Level of IL-23 Correlates with Expression of VEGF in Human Colorectal Carcinoma. *Archives of Medical Research* 2010; 41(3):182-9.

M22-5 бодова

6. Radosavljevic G, **Ljujic B**, Jovanovic I, Srzentic Z, Pavlovic S, Zdravkovic N, Milovanovic M, Bankovic D, Knezevic M, Acimovic LJ, Arsenijevic N. Interleukin-17 may be a valuable serum tumour marker in patients with colorectal carcinoma. *Neoplasma* 2010;57(2):135-44.

M23-3 бода

7. Kastratovic T, Tanaskovic I, Lackovic V, Sorak M, Stankovic V, **Ljujic B**, Sedlar S, Zivanovic A. Mitotic activity of smooth muscle of the mioma: Does hormonal stimulation have an effect on the number of mitosis? *Arch Biol Sci, Belgrade* 2010;62(1):39-45. **M23-3 бода**
8. Volarevic A, **Ljujic B**, Volarevic V, Milovanovic M, Kanjevac T, Lukic A, Arsenijevic N. A new semiquantitative method for evaluation of metastasis progression. *J BUON* 2012; 17:585-590. **M23-3 бода**
9. Arsenijević S, **Ljujić B**, Stošić I, Grujičić D, Marinković D, Milošević-Djordjević O. Polymorphisms of the GSTT1 and GSTM1 genes in women of central Serbia-lack of association with uterine myoma. *Arch Biol Sci, Belgrade* 2013;vol. 65,2. **M23-3 бода**
10. Ilic M, Prodovic T, Milosavljevic Z, **Ljujic B**. Mortality from Stomach Cancer in Serbia, Excluding the Province of Kosovo, in the 1991-2009 Period. *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION* 2013; 4(3):2067-2070 **M23-3 бода**

Научни радови објављени у целини у часописима националног значаја:

1. **Ljujic B** и Stojkovic M. Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Ser J Exp Clin Res* 11 (2010) 25-31 **M52-2 бода**
2. Milosavljević Z и **Ljujić B**. In vitro production of human dermal equivalent. *Med Pregl.* 2010; 63(7-8):459-64 **M51-2 бода**

Зборници међународних научних скупова

1. Radosavljevic G, Jovanovic I, **Ljujic B**, Pajovic S, Zdravkovic N, Zivic D, Knezevic M, Arsenijevic N, Lukic M. Deletion of Galectin-3 in vivo downregulates lung specific metastasis of melanoma cells. *Eur J Immunology Supplement* 1/09 2009; S728 **M34-0.5 бодова**

2. Jovanovic I, Radosavljevic G, **Ljujic B**, Pajovic S, Zdravkovic N, Knezevic M, Majstorovic I, Arsenijevic N, Colic M, Lukic M. Attenuation of primary breast tumor growth and lung metastasis in ST2 deficient mice. Eur J Immunology Supplement 1/09 2009; S727

M34-0.5 бодова

3. Pajovic S, Zdravkovic N, Radosavljevic G, Jovanovic I, **Ljujic B**, Djukic A, Majstorovic I, Arsenijevic N, Colic M, Vassiliev C, Lukic M. Intravenous immunoglobulins attenuate diabetes induction in mice. Eur J Immunology Supplement 1/09 2009; S671

M34-0.5 бодова

4. Arsenijevic N, Volarevic V, Milovanovic M, **Ljujic B**, Pejnovic Nada, Nilsson ULH, Lukic ML. The role of Galectin 3 in Con A induced liver injury (Meeting Abstract) IMMUNOLOGY. 2012; 137: 311-311.

M34-0.5 бодова

8.5 THE LIST OF PUBLISHED PAPERS

The published paper in extenso in international journals:

1. **Ljujic B**, Milovanovic M, Volarevic V, Murray B, Bugarski D, Przyborski S, Arsenijevic N, Lukic L M, Stojkovic M. Human mesenchymal stem cells creating an immunosuppressive environment and promote breast cancer in mice. *SCIENTIFIC REPORTS* 2013; 3:2298.

M21-8 points

2. Volarevic V, **Ljujic B**, Stojkovic P, Lukic A, Arsenijevic N, Stojkovic M. Human stem cell research and regenerative medicine—present and future. *British Medical Bulletin* 2011;99(1):155-168.

M21-8 points

3. Volarevic V, Milovanovic M, **Ljujic B**, Pejnovic N, Arsenijevic N, Nilsson U, Leffler H, Lukic ML. Galectin-3 deficiency prevents concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* 2012 Jun;55(6):1954-64.

M21-8 points

4. Milovanovic M, Volarevic V, **Ljujic B**, Radosavljevic G, Jovanovic I, Arsenijevic N, Lukic ML. Deletion of IL-33R (ST2) Abrogates Resistance to EAE in BALB/C Mice by Enhancing Polarization of APC to Inflammatory Phenotype. *Plos ONE* 2012;7(9):e45225.

M21-8 points

5. **Ljujic B**, Radosavljevic G, Jovanovic I, Pavlovic S, Zdravkovic N, Milovanovic M, Acimovic Lj, Knezevic M, Bankovic D, Zdravkovic D and Arsenijevic N. Elevated Serum Level of IL-23 Correlates with Expression of VEGF in Human Colorectal Carcinoma. *Archives of Medical Research* 2010; 41(3):182-9.

M22-5 points

6. Radosavljevic G, **Ljujic B**, Jovanovic I, Srzentic Z, Pavlovic S, Zdravkovic N, Milovanovic M, Bankovic D, Knezevic M, Acimovic LJ, Arsenijevic N. Interleukin-17 may be a valuable serum tumour marker in patients with colorectal carcinoma. *Neoplasma* 2010;57(2):135-44.

M23-3 points

7. Kastratovic T, Tanaskovic I, Lackovic V, Sorak M, Stankovic V, **Ljujic B**, Sedlar S, Zivanovic A. Mitotic activity of smooth muscle of the mioma: Does hormonal stimulation have an effect on the number of mitosis? *Arch Biol Sci, Belgrade* 2010;62(1):39-45. **M23-3 points**
8. Volarevic A, **Ljujic B**, Volarevic V, Milovanovic M, Kanjevac T, Lukic A, Arsenijevic N. A new semiquantitative method for evaluation of metastasis progression. *J BUON* 2012; 17:585-590. **M23-3 points**
9. Arsenijević S, **Ljujić B**, Stošić I, Grujičić D, Marinković D, Milošević-Djordjević O. Polymorphisms of the GSTT1 and GSTM1 genes in women of central Serbia-lack of association with uterine myoma. *Arch Biol Sci, Belgrade* 2013;vol. 65,2. **M23-3 points**
10. Ilic M, Prodovic T, Milosavljevic Z, **Ljujic B**. Mortality from Stomach Cancer in Serbia, Excluding the Province of Kosovo, in the 1991-2009 Period. *ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION* 2013; 4(3):2067-2070. **M23-3 points**

The published paper in extenso in national journals:

1. **Ljujic B** и Stojkovic M. Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Ser J Exp Clin Res* 11 2010; 25-31. **M52-2 points**
2. Milosavljević Z и **Ljujić B**. In vitro production of human dermal equivalent. *Med Pregl.* 2010; 63(7-8):459-64. **M51-2 points**

The international congress presentations published as abstracts

1. Radosavljevic G, Jovanovic I, **Ljujic B**, Pajovic S, Zdravkovic N, Zivic D, Knezevic M, Arsenijevic N, Lukic M. Deletion of Galectin-3 in vivo downregulates lung specific metastasis of melanoma cells. *Eur J Immunology Supplement* 1/09 2009; S728 **M34-0.5 points**

2. Jovanovic I, Radosavljevic G, **Ljujic B**, Pajovic S, Zdravkovic N, Knezevic M, Majstorovic I, Arsenijevic N, Colic M, Lukic M. Attenuation of primary breast tumor growth and lung metastasis in ST2 deficient mice. Eur J Immunology Supplement 1/09 2009; S727

M34-0.5 points

3. Pajovic S, Zdravkovic N, Radosavljevic G, Jovanovic I, **Ljujic B**, Djukic A, Majstorovic I, Arsenijevic N, Colic M, Vassiliev C, Lukic M. Intravenous immunoglobulins attenuate diabetes induction in mice. Eur J Immunology Supplement 1/09 2009; S671

M34-0.5 points

4. Arsenijevic N, Volarevic V, Milovanovic M, **Ljujic B**, Pejnovic Nada, Nilsson ULH, Lukic ML. The role of Galectin 3 in Con A induced liver injury (Meeting Abstract) IMMUNOLOGY. 2012; 137: 311-311.

M34-0.5 points

8.6 ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I. Аутор</i>
Име и презиме: Биљана Т. Љујић
Датум и место рођења: 23.11.1974. г., Нова Варош
Садашње запослење: Асистент за ужу научну област Генетика, Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
<i>II. Докторска дисертација</i>
Наслов: ИСПИТИВАЊЕ УЛОГЕ И ЗНАЧАЈА СТАТ3 МОЛЕКУЛА И ХУМАНИХ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОМ МОДЕЛУ ТУМОРА ДОЈКЕ
Број страница:
Број слика:
Број библиографских података:
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
Научна област (УДК): ИМУНОЛОГИЈА
Ментор: ПРОФ. ДР МИОДРАГ СТОЈКОВИЋ
<i>III. Оцена и одбрана</i>
Датум пријаве теме: 22.10.2010.
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације:
Комисија за оцену подобности теме и кандидата: 1. Проф. др Миодраг Стојковић, редовни професор за уже научне области Генетика Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, председник 2. Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор за ужу научну област Микробиологија и имунологија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, члан 3. Проф. др Срђан Пешић, редовни професор за ужу научну област Фармакологија, Медицински факултет Универзитета у Нишу, члан
Комисија за оцену докторске дисертације: 1. Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор за ужу научну област Микробиологија и имунологија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, председник 2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, члан 3. Проф. др Срђан Пешић, редовни професор за ужу научну област Фармакологија, Медицински факултет Универзитета у Нишу, члан
Комисија за одбрану докторске дисертације: 1. Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор за ужу научну област Микробиологија и имунологија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, председник 2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор за уже научне области Микробиологија и имунологија и Основи онкологије Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, члан 3. Проф. др Срђан Пешић, редовни професор за ужу научну област Фармакологија, Медицински факултет Универзитета у Нишу, члан

Датум одбране докторске дисертације:

ОБРАЗАЦ 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Билјана Лукић
број уписа 2005 / 16

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом
Идентификација улоге и значаја STAT3 молекула и хуманих
месенхимальних матичних ћелија у експерименталном моделу
лимфома дојке

- 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 аутора

У Крагујевцу, 15. 09. 2013

Лукић

ОБРАЗАЦ 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ђуџић Билјана
Број уписа 2005/16
Студијски програм докторске студије - Имунологија, инфекција и инфламација
Наслов рада Испитивање улоге и значаја STAT3 молекула и хулотих протеина у експерименталном моделу
Ментор проф. др Мирослав Ситоровић гумера догме

Потписани Ђуџић Билјана

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

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 Крагујевцу.

Потпис аутора

У Крагујевцу, 13.09.2013

Ђуџић

ОБРАЗАЦ 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Најшиши војбе улоге и значаја STAT3 молекула и њихових нестехиомалних молекуларних дејста у експерименталном мозгу која је моје ауторско дело. примера држе

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

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Крагујевцу 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, чији је кратак опис дат је на обрасцу број 4.).

Потпис аутора

У Крагујевцу, 13.09.2013

Вукић