



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

МАРИНА М. ГАЗДИЋ

ЕФЕКАТ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА НА
ОШТЕЋЕЊЕ ЈЕТРЕ УЗРОКОВАНО
АКТИВАЦИЈОМ НКТ ЋЕЛИЈА

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: др сци. мед. Владислав Б. Воларевић, ванредни професор

Крагујевац, 2017. године

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>	
Име и презиме: Марина М. Газдић	
Датум и место рођења: 17.12.1987, Крагујевац	
Садашње запослење: асистент	
<i>II Докторска дисертација</i>	
Наслов: Ефекат мезенхималних матичних ћелија на оштећење јетре узроковано активацијом НКТ ћелија	
Број страница: 169	
Број слика: 22	
Број библиографских података: 342	
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Крагујевац	
Научна област (УДК): Матичне ћелије у биомедицинским наукама	
Ментор: др сци.мед. Владислав Б. Воларевић, ванредни професор	
<i>III Оцена и одбрана</i>	
Датум пријаве теме: 13. 05. 2015. Године	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-529/19; 07.10.2015.	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:	
1. Проф. др Миодраг Стојковић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник;	
2. Проф. др Миодраг Л. Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан;	
3. Проф. др Владимир Трајковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан.	
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:	
1. Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор – емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник;	
2. Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за уже научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија, члан;	
3. Проф. др Миодраг Стојковић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, члан;	
4. Академик проф. др Владимир Бумбаширевић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хистологија и ембриологија, члан;	
5. Проф. др Владимир Трајковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Имунологија, члан.	
Датум одбране дисертације:	

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) are, due to immunomodulatory characteristics, considered as novel agents in the treatment of immune-mediated acute liver failure. However, the effects of MSCs on phenotype and function of natural killer T (NKT) cells, major effector cells in fulminant hepatitis, is not understood. We used concanavalin A (ConA) - and α -galactosylceramide (α -GalCer)-induced liver injury to evaluate effects of MSCs on NKT-dependent hepatotoxicity. Mouse MSCs (mMSCs) significantly reduced Con A- and α -GalCer-mediated hepatitis in C57Bl/6 mice, as demonstrated by histopathological and biochemical analysis, attenuated influx of inflammatory (T-bet⁺ TNF- α , IFN- γ producing and GATA3⁺, IL-4-producing) liver NKT cells and down-regulated TNF- α , IFN- γ and IL-4 levels in the sera. The liver NKT cells cultured *in vitro* with mMSCs produced lower amounts of inflammatory cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-4) and higher amounts of immunosuppressive IL-10 upon α -GalCer stimulation. mMSC treatment attenuated expression of apoptosis-inducing ligands (FASL, CD107 and TRAIL) on liver NKT cells and suppressed the expression of pro-apoptotic genes in the livers of α -GalCer-treated mice. mMSCs reduced cytotoxicity of liver NKT cells against hepatocytes *in vitro*. The presence of 1-methyl-DL-tryptophan, a specific inhibitor of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) or L-NG-monomethyl Arginine citrate, specific inhibitor of inducible nitric oxide synthase (iNOS), in mMSC-conditioned medium injected to α -GalCer-treated mice, counteracted the hepatoprotective effect of mMSCs *in vivo*, and restored pro-inflammatory cytokine production and cytotoxicity of NKT cells *in vitro*. Human MSCs in iNOS and IDO-dependent manner, attenuated the production of inflammatory cytokines in α -GalCer-stimulated human peripheral blood mononuclear cells and reduced their cytotoxicity against HepG2 cells. In conclusion, MSCs protect from acute liver injury by attenuating cytotoxicity and capacity of liver NKT cells to produce inflammatory cytokines in iNOS and IDO dependent manner.

Keywords

Mesenchymal stem cells; NKT cells; Immunosuppression; Acute liver injury

САЖЕТАК

Мезенхималне матичне ћелије (енгл. *mesenchymal stem cells*, MSCs) се због својих имуномодулаторних карактеристика сматрају потенцијалним терапијским средством за лечење фулминантног хепатитиса. Међутим, ефекат MSCs на фенотип и функције урођеноубилачких Т лимфоцита (енгл. *natural killer T cells*, NKT), главних ефекторских ћелија у овој болести још увек није познат.

Како би се испитао утицај MSCs на хепатотоксичност NKT ћелија, у овом истраживању су коришћени модели акутног оштећења јетре који су C57Bl/6 мишевима индуковани апликацијом конканавалина А (енгл. *concanavalin A*, ConA) односно α -галактоцерамида (енгл. *α -galactosylceramide*, α -GalCer). Биохемијски тестови и квантитативна хистологија су указали да MSCs значајно редукују акутно оштећење хепатоцита изазвано применом Con A или α -GalCer-а, што је у корелацији са смањеном заступљеношћу инфламацијских NKT ћелија (TNF- α -, IFN- γ -, T-bet⁺ CD4⁺ и CD1d tetramer⁺ као и GATA3⁺, IL-4⁺ NKT ћелија) у јетри и смањеном концентрацијом TNF- α , IFN- γ и IL-4 у серуму мишева са хепатитисом. MSCs су супримирале продукцију TNF- α , IFN- γ и IL-4, а повећавале продукцију имуносупресивног IL-10 у α -GalCer-ом стимулираним NKT ћелијама јетре, *ex vivo*. Апликација MSCs смањила је експресију FASL, CD107 и TRAIL на NKT ћелијама јетре, и следствено, смањила цитотоксичку активност NKT ћелија према хепатоцитима *in vitro*. Примена 1-метил триптофана, фармаколошког инхибитора индоламин 2, 3-диоксигеназе (енгл. *indolamine 2,3-dioxygenase*, IDO) и L-монометил аргинин цитрата, специфичног инхибитора индуцибилне азот оксид синтазе (енгл. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) укинула је хепатопротективни ефекат кондиционираног медијума генерисаног од MSCs, као и имуномодулаторно дејство MSCs на NKT ћелије *in vitro*. IDO и iNOS су главни медијатори којим су хумане MSCs супримирале ефекторске функције α -GalCer-ом стимулираних хуманих мононуклеарних ћелија периферне крви.

Најважнији закључак ове дисертације је да MSCs каталитичком активношћу ензима IDO и iNOS, супримирају цитотоксичност и продукцију инфламацијских цитокина у NKT ћелијама у јетри и редукују оштећење хепатоцита.

Кључне речи

Мезенхималне матичне ћелије; NKT ћелије; имуносупресија; акутно оштећење јетре

Због несебичног залагања и подршке током израде ове докторске дисертације неизмерну захвалност дугујем свом ментору, проф. др Владиславу Воларевећу.

Хвала др Бојани Симовић Марковић на уложеном труду и помоћи.

Проф. др Миодрагу Лукићу, проф. др Небојши Арсенијевићу и проф. др Миодрагу Стојковићу захваљујем на указаном поверењу.

Хвала мојој породици на подршци, љубави и разумевању.

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1. АКУТНИ ХЕПАТИТИС	1
1.1.1. Дефиниција и етиологија.....	1
1.1.2. Клиничка слика	2
1.1.3. Терапија и прогноза	2
1.2. УРОБЕНОУБИЛАЧКИ Т ЛИМФОЦИТИ	3
1.2.1. Активација НКТ ћелија.....	4
1.2.2. Интеракција НКТ ћелија са ћелијама имунског система.....	5
1.2.3. Улога НКТ ћелија у болестима јетре	6
1.3. РЕГУЛАТОРНИ Т ЛИМФОЦИТИ	7
1.3.1. Улога Трег лимфоцита у болестима јетре и њихова интеракција са НКТ ћелијама.....	8
1.4. РЕГУЛАТОРНИ В ЛИМФОЦИТИ	9
1.4.1. Улога Врег лимфоцита у болестима јетре и њихова интеракција са НКТ ћелијама.....	10
1.5. АНИМАЛНИ МОДЕЛИ АКУТНОГ ХЕПАТИТИСА ИЗАЗВАНИ АКТИВАЦИЈОМ НКТ ЋЕЛИЈА	12
1.5.1. Фулминантни хепатитис индукован применом Con A.....	12
1.5.2. Фулминантни хепатитис индукован применом α - GalCer.....	14
1.6. МЕЗЕНХИМАЛНЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ	16
1.6.1. Порекло и извори MSCs.....	17
1.6.2. Карактеристике MSCs.....	18
1.7. ИМУНОМОДУЛАТОРНА СВОЈСТВА MSCs	21
1.7.1. Молекуларни механизми којима MSCs супримирају Т лимфоците.....	25
1.7.2. Значај интеракције MSCs и дендритских ћелија у инфламацији изазваној активацијом Т лимфоцита.....	27
1.7.3. MSCs смањују цитотоксички потенцијал Т лимфоцита и НК ћелија.....	27
1.7.4. Молекуларни механизми којим MSCs супримирају макрофаге.....	28
1.7.5. Молекуларни механизми којим MSCs супримирају В лимфоците.....	29
1.8. ИМУНОМОДУЛАТОРНИ ЕФЕКАТ MSCs У АКУТНОМ ХЕПАТИТИСУ	29
2. ЦИЉ РАДА	34
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	35
3.1. Ћелијска линија мишјих мезенхималних матичних ћелија	35
3.2. Ћелијска линија хуманих мезенхималних матичних ћелија	35
3.3. Ћелијска линија хуманог карцинома јетре (HepG2)	36
3.4. Изолација мишјих хепатоцита	36
3.5. Инхибиција индоламин-2, 3 диоксигеназе	36

3.6.	Инхибиција индуцибилне азот оксид синтазе.....	37
3.7.	Кондиционирани медијум генерисан од MSCs.....	37
3.8.	Експерименталне животиње.....	38
3.9.	Индукција експерименталног фулминантног хепатитиса конканавалином А.....	38
3.10.	Индукција експерименталног фулминантног хепатитиса α -галактоцерамидом.....	39
3.11.	Апликација mMSCs.....	39
3.12.	Детекција трансплантираних mMSCs у ткиву јетре.....	39
3.13.	Деплеција регулаторних лимфоцита.....	40
3.14.	Биохемијска анализа оштећења јетре.....	40
3.15.	Патохистолошка анализа.....	40
	3.15.1. Израда патохистолошких препарата.....	40
	3.15.2. Бојење хематоксилином и еозином (H&E).....	41
3.16.	Изолација моноклеарних ћелија из јетре	41
3.17.	Анализа популација моноклеарних ћелија јетре проточном цитометријом.....	42
	3.17.1. Бојење мембранских маркера.....	42
	3.17.2. Интрацелуларно бојење цитокина.....	45
3.18.	Сепарација NKT ћелија негативном и позитивном селекцијом помоћу магнетних куглица.....	47
3.19.	Изолација спленocyта.....	48
3.20.	Издајање регулаторних Т лимфоцита негативном и позитивном селекцијом помоћу магнетних куглица.....	49
3.21.	Изолација PBMNC.....	49
3.22.	Кокултивација NKT ћелија и MSCs.....	50
3.23.	Кокултивација Т регулаторних лимфоцита и mMSCs.....	50
3.24.	Адоптивни трансфер регулаторних лимфоцита.....	51
3.25.	Тест цитотоксичности.....	51
3.26.	Мерење концентрације цитокина и имуносупресивних фактора које продукују MSCs у серуму и супернатанту.....	52
3.27.	Мерење концентрације кинуренина.....	54
3.28.	Полимеризована ланчана реакција (PCR).....	54
	3.28.1. Изолација РНК.....	54
	3.28.2. Реверзна транскрипција.....	55
	3.28.3. Реакција ланчаног умножавања у реалном времену (RT-PCR, <i>real time polymerase chain reaction</i>).....	55
3.29.	Статистичка обрада података.....	56
4.	РЕЗУЛТАТИ	57
4.1.	Интравенски трансплантиране mMSCs мигрирају у јетру и значајно смањују оштећење јетре изазвано Cop A.....	57
	4.1.1. Серумске концентрације проинфламацијских citoкина TNF- α , IFN- γ и IL-4 су мање док је концентрација антиинфламацијског IL-10 већа након примене mMSCs.....	59
4.2.	Примена mMSCs смањује инфламацију у јетри мишева којима је хепатитис изазван апликацијом Cop A.....	60
	4.2.1. mMSCs значајно смањују број инфламацијских NKT ћелија у јетри.....	60
	4.2.2. mMSCs значајно смањују присуство макрофага и	

дендритских ћелија у јетру.....	62
4.3. Примена mMSCs значајно смањује оштећење јетре изазвано α-GalCer-ом.....	63
4.3.1. Примена mMSCs смањује концентрацију TNF- α , IFN- γ и IL-4 у серуму.....	66
4.3.2. mMSCs смањују број интрахепатичних NKT ћелија које продукују проинфламацијске цитокине.....	67
4.3.3. Примена mMSCs не мења заступљеност дендритских ћелија у јетри мишева којима је хепатитис изазван α -GalCer-ом.....	69
4.3.4. Интравенска апликација mMSCs смањује цитотоксичку активност NKT ћелија јетре.....	70
4.3.5. Примена mMSCs значајно смањује експресију FasL, TRAIL и CD107, али не утиче на експресију перфорина, гранзимаВ, NKG2D и KLRG1 на интрахепатичним NKT ћелијама.....	72
4.3.6. Примена mMSCs повећава број регулаторних лимфоцита у јетри мишева којима је изазван фулминанти хепатитис.....	73
4.3.7. Деpleција Treg лимфоцита циклофосфамидом значајно смањује капацитет mMSCs да редукују оштећење јетре узроковано активацијом NKT ћелија.....	75
4.3.8. Супресија хепатотоксичности NKT ћелија мезенхималним матичним ћелијама је значајно смањена након деpleције Treg лимфоцита.....	77
4.3.9. Примена mMSCs компензаторно повећава број Vreg лимфоцита у јетри оболелих мишева којима су деплетирани Treg лимфоцити.....	79
4.3.10. Недостатак Vreg лимфоцита не утиче на хепатопротективан ефекат mMSCs у фулминантном хепатитису.....	80
4.3.11. Деpleција Vreg лимфоцита anti-CD20 антителом не утиче на супресивни ефекат mMSCs на хепатотоксичност NKT ћелија.....	83
4.3.12. Примена MSCs супримира проапоптоске гене.....	84
4.4. mMSCs супримирају NKT ћелије паракриним механизмом.....	86
4.4.1. mMSCs повећавају број регулаторних ћелија у јетри посредством солубилних фактора.....	89
4.5. mMSCs супримирају NKT ћелије активношћу ензима IDO и iNOS.....	90
4.5.1. Ефекат mMSC-СМ на експанзију Treg лимфоцита се губи у присуству IDO инхибитора.....	94
4.6. mMSCs модулирају функције NKT ћелија у Соп А хепатитису активношћу ензима IDO и iNOS.....	97
4.7. Продукцијом IDO-а и активношћу iNOS-а hMSCs модулирају ефекторске функције α-GalCer-ом стимулираних хуманих PBMNC.....	100
5. ДИСКУСИЈА	103
5.1. Интравенски трансплантиране mMSCs мигрирају у јетру	103

и смањују акутно оштећење јетре мишева.....	
5.2. Примена MSCs смањује инфламацију у јетри.....	104
5.3. Примена MSCs смањује апоптозу у јетри.....	106
5.4. Фармаколошка инактивација IDO и iNOS у mMSCs укида директан имуносупресивни ефекат mMSCs на NKT ћелије.....	107
5.5. mMSCs повећавају експанзију и хепатопротективна својства Treg лимфоцита активношћу ензима IDO.....	111
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	113
СКРАЋЕНИЦЕ	115
7. РЕФЕРЕНЦЕ.....	116
8. ПРИЛОГ	147
8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА.....	147
8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION.....	151
8.3. БИОГРАФИЈА.....	154
8.4. БИБЛИОГРАФИЈА.....	155

1. УВОД

У уводном делу су објашњене етиологија, клиничка слика и прогноза акутног хепатитиса, улога урођеноубилачких Т лимфоцита и регулаторних ћелија у имунопатогенези ове болести, описана је патогенеза експерименталног аутоимунског хепатитиса, детаљно су анализирани имуномодулаторни ефекти мезенхималних матичних ћелија и описан је терапијски потенцијал који ове ћелије имају у лечењу акутног оштећења јетре.

1.1. АКУТНИ ХЕПАТИТИС

1.1.1. Дефиниција и етиологија

Почетком осамдесетих година прошлог века *Trey* и *Davidson* су међу првима дефинисали фулминантни хепатитис као синдром код кога се, у току акутног хепатитиса, код особе без претходног обољења јетре, јављају симптоми хепатичке енцефалопатије (коме) осам недеља од почетка акутне болести (1, 2).

Најчешћи узрочници фулминантног хепатитиса су вируси, лекови, токсичне ноксе и метаболичке болести, док је у 40-50% случајева етиологија ове болести непозната (2, 3). Вируси хепатитиса А, В, С и Е су чест узрок фулминантног хепатитиса у земљама у развоју и то претежно код млађих особа. Инфекција хепатотропним вирусима као што су парвовирус В19 и херпес вируси, такође може изазвати симптоме фулминантног хепатитиса (4-6). У развијеним земљама, код преко 50% оболелих, акутно оштећење јетре је последица токсичног дејства лекова. Резултати многих истраживања показују да најизраженије хепатотоксичне ефекте има парацетамол, затим лекови из групе антитуберкулотика, антипсихотика и антибиотика, као и наркотици: екстази (*3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine*, MDMA) и кокаин (*benzoylecgonine*) (7-8). Фулминантни хепатитис може настати и као последица аутоимунске реакције, као и услед исхемијских, малигних и других болести јетре (9, 10).

1.1.2. Клиничка слика

Најчешћи клинички симптоми хепатитиса су умор, малаксалост, мучнина, бол у горњем десном квадранту, свраб. При клиничком прегледу код оболелих се уочавају жутица коже и слузокоже, хепатомегалија, при чему је главни лабораторијски налаз који указује на хепатоцелуларно оштећење повећана концентрација трансaminaза у крви (3, 4).

Током фулминантног хепатитиса настаје масовна дисеминована некроза хепатоцита, метаболички поремећај, различити степен холестазае, хеморагијски синдром, кардиореспираторни поремећаји и поремећаји бубрежне функције. У најтежим случајевима настаје мождани едем, пораст интракранијалног притиска и хепатичка енцефалопатија која је чест узрок смрти. Хепатичку енцефалопатију карактеришу различити нивои поремећаја свести и обично су удружени са поремећајима у систему коагулације. Поремећаји у систему коагулације настају услед смањеног капацитета јетре за синтезом фактора коагулације који се манифестује смањењем протромбинског времена за 40%(3).

1.1.3. Терапија и прогноза

Смртност оболелих од овог клиничког облика хепатитиса се креће од 50% до 90%, према различитим наводима у литератури (1-3,11). Конзервативне, симптоматске и супортивне терапијске мере остају углавном без успеха када су у питању фулминантни хепатитиси вирусне етиологије, док се акутни хепатитиси изазвани токсинима могу лечити специфичном, антитоксин терапијом, уколико она постоји за дотичну токсичну ноксу. Примена биоартефицијелне јетре знатно је утицала на смањење смртности.

Најефикаснија терапија фулминантног хепатитиса је хитна трансплантација јетре, али су недовољан број донатора и неопходност доживотне имуносупресије, разлози због којих се спроводе бројна истраживања на анималним моделима у циљу проналажења нових терапијских агенаса ефикасних у превенцији или лечењу фулминантног хепатитиса људи.

1.2. УРОЂЕНОУБИЛАЧКИ Т ЛИМФОЦИТИ

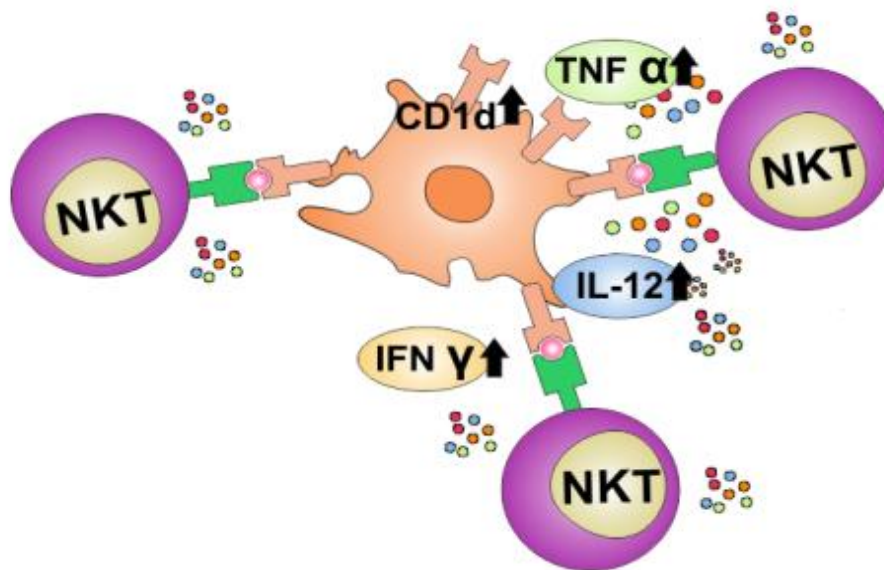
Урођеноубилачки Т лимфоцити (енгл. *Natural Killer T cells*, NKT) представљају популацију ћелија урођене имуности са јединственим имуномодулаторним карактеристикама (12). Осим Т ћелијског рецептора (енгл. *T cell receptor*, TCR), NKT ћелије експримирају и маркере урођеноубилачких (енгл. *natural killer*, NK) ћелија као што су NK1.1, CD49b, NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2E и Ly49a (експримирани на мишијим ћелијама), односно CD161, CD56 и CD16 (експримирани на ћелијама људи) (13, 14). Међутим, за разлику од Т лимфоцита који препознају пептидне антигене у контексту главног комплекса хистокомпатибилности I или II класе, NKT ћелије препознају липидне антигене презентоване у склопу молекула CD1d на мембрани ћелија које презентују антигене (енгл. *antigen-presenting cells*, APC) (13, 14). На основу карактеристика TCR-а и реактивности на липидне антигене, NKT ћелије су подељене на тип I и тип II (15). NKT ћелије тип I, које се називају још и инваријантне NKT ћелије (енгл. *invariant NKT cells*, iNKT) експримирају инваријантни α ланац TCR-а, који настаје реаранжирањем V α 14–J α 18 ланца код мишева, односно хомологог V α 24–J α 18 ланца код људи (16). Инваријантни α ланац TCR-а упарује се са β ланцем који има ограничену хетерогеност, и код мишева је то V β 8.2, V β 7 или V β 2, док је код људи V β 11 ланац (16, 17). Једна од главних карактеристика ових ћелија је да препознају гликолипид α -галактоцерамид (енгл. *α -galactosylceramide*, α -GalCer) презентован у склопу CD1d молекула (16). α -GalCer је ендогени лиганд iNKT ћелија кога продукују ћелије имунског система (18). Са друге стране, људске и мишје NKT ћелије тип II такође препознају CD1d молекулу, међутим, експримирају TCR веће разноликости и не препознају α -GalCer (19, 20). Овај тип NKT ћелија препознаје широк спектар хидрофобних антигена попут сулфатида и лизофосфатидилхолина (21, 22). Због техничких препрека, као што су изражено неспецифично бојење и нестабилност сулфатид/CD1d тетрамер комплекса, имунобиологија NKT ћелија типа II је много мање испитана (15, 23). У циљу испитивања значаја обе популације NKT ћелија у патогенези различитих болести, последњих година у истраживањима се користе CD1d дефицијенти мишеви којима недостају оба типа NKT ћелија, као и J α 18-дефицијенти мишеви којима недостају само NKT ћелије тип I (24, 25, 26). Предмет испитивања у овде приказаној студији, био је имунски одговор у коме учествују iNKT ћелије. iNKT ћелије настају у тимусу диференцијацијом хематопоезних прекурсора, где подлежу позитивној селекцији преко CD1d молекула експримираног на површини

CD4⁺CD8⁺ тимоцита (27). У негативној селекцији iNKT ћелија у тимусу учествују CD1d⁺ дендритске ћелије (енгл. *dendritic cells*, DCs) (28). Након тога iNKT ћелије мигрирају у периферне органе (29). Код мишева, iNKT ћелије су најзаступљеније у јетри где чине 15-30% укупних лимфоцита, док је њихова процентуална заступљеност у другим органима знатно мања- 0.2–0.5% у тимусу, слезини, костној сржи и цревима, 1% у крви, 0.1–0.2% у лимфним чворовима (30). Такође је познато да је заступљеност iNKT ћелија у слезини, крви, костној сржи и лимфним чворовима људи 0.01–0.5% (15). Иако је проценат различит, укупан број ових ћелија у поменутиим органима је сличан и износи око милион ћелија по органу (31).

1.2.1. Активација NKT ћелија

NKT ћелије се активирају након што TCR-ом препознају липидне антигене приказане у склопу CD1 молекула на APC (32, 33). Осим на тај начин, NKT ћелије могу да буду активирани и цитокинима IL-12 или IL-2 које секретују APC у јетри (Купферове ћелије, хепатоцити, дендритске ћелије) након стимулације TLR сигналног пута (34, 23). CD1 припада фамилији површинских гликопротеина, експримиран је на мембрани APC и сличан је молекулу I класе главног комплекса хистокомпатибилности (енгл. *major histocompatibility complex*, MHC) (35). Код људи, CD1 молекул постоји у неколико изоформи (CD1a, -b, -c, -d и -e), док је код мишева присутан само CD1d (36, 37). Хемијске групе, укључујући ендogene липиде, сфинголипиде и глицеролипиде, као и егзогене липиде као што су анитигени микроорганизама *Sphingomonas spp*, *Borrelia burgdorferi*, *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter pylori* везују се за CD1d молекул и стимулишу NKT ћелије (12). Због ограничене разноликости TCR рецептора, NKT се сматрају ћелијама урођене имуности и реагују на само неколико липидних антигена (14). Гликолипид α -GalCer, првобитно изолован из морског сунђера као и његова вештачки синтетисана форма KRN7000, представљају специфичне егзогене лиганде за хумане и мишје NKT ћелије (17). Међутим, недавним студијама је идентификован метаболички пут у имунским ћелијама којим настају ендогени лиганди NKT ћелија, α -глукозилцерамид (енгл. *α -glycosylceramide*, α -GluCer) и α -GalCer (18). Откриће ендогеног α -GalCer-а указало је на адекватност употребе овог једињења за испитивање биологије NKT ћелија. Мишје NKT ћелије препознају хумани CD1d молекул и обратно (38), што потврђује физиолошку релевантност мишјих модела за испитивање улоге NKT ћелија у имунском одговору.

Активација NKT ћелија α -GalCer-ом узрокује брзу продукцију Th1 и Th2 цитокина, укључујући IFN- γ и IL-4 (13, 33). Овакав одговор дешава се неколико сати након активације, обзиром да NKT ћелије конститутивно експримирају mRNAs за поменуте цитокине (33). Активиране NKT ћелије продукују и бројне друге цитокине као што су IL-10, IL-3, IL-5, IL-9, IL-13, фактор некрозе тумора (енгл. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α), IL-17, IL-2, IL-21, IL-22 и колоностимулирајући фактор гранулоцита и макрофага (енгл. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) (39, 23).



Слика 1. Механизам активације NKT ћелија.

1.2.2. Интеракција NKT ћелија са ћелијама имунског система

Конверзијом у Th1, Th2 или Th17 цитокински профил, NKT ћелије модулирају како урођени тако и стечени имунски одговор (40, 41, 42). Показано је да NKT ћелије продукцијом цитокина или директним контактом утичу на мобилизацију и активацију NK ћелија, CD8⁺ Т лимфоцита, макрофага, неутрофила и еозинофила (43, 44, 45, 46, 47). IFN- γ који продукују NKT ћелије појачава фагоцитозну способност макрофага као и њихов капацитет да елиминишу бактерије, и уједно мобилише и активира NK ћелије и CD8⁺ Т лимфоците (48, 49, 50). Такође, *in vitro* је забележено да NKT ћелије активирају В лимфоците, промовишу њихову пролиферацију и продукцију антитела (51). Интеракцијом CD40L-CD40, NKT ћелије стимулишу дендритске ћелије да продукују IL-12, који је важан за одржавање броја и активацију NKT ћелија (52). Директни контакт NKT ћелија и IL10⁺ неутрофила, узрокује конверзију

имуносупресивних неутрофила у ћелије које продукују IL-12 и промовишу инфламацију (53). Истовремено, такође директним контактом, неутрофили могу да супримирају продукцију цитокина у мишићим и људским NKT ћелијама, за сада још увек недовољно познатим механизмом (54). NKT ћелије експримирају FAS лиганд (енгл. *FAS ligand*, FASL) као и серин протеазе (перфорин и гранзим), којима директно убијају ћелије паренхима јетре (39, 34, 55). Дакле, интеракцијом са ћелијама имунског система, NKT ћелије значајно утичу на ток како урођеног тако и стеченог имунског одговора у јетри.

1.2.3. Улога NKT ћелија у болестима јетре

Због својих различитих имуномодулаторних и ефекторских функција, NKT ћелије могу имати и проинфламацијску и антиинфламацијску (регулаторну) улогу у јетри. Наиме, осим познатог протективног ефекта хепатичних NKT ћелија током урођеног имунског одговора на вирусну инфекцију и тумор, већина до данас објављених клиничких студија указује да NKT ћелије директно или индиректно доприносе прогресији болести јетре (56).

Током инфламације NKT ћелије мигрирају у јетру. Показано је да је код пацијената оболелих од примарног билијарног холангитиса (енгл. *primary biliary cholangitis*, PBC) у поређењу са здравим људима процентуална заступљеност NKT ћелија око интерлобуларних билијарних каналића значајно већа (57). Студије у којима је анализиран број NKT ћелија у јетри и крви пацијената оболелих од PBC и здравих особа, указале су на изражену миграцију ових ћелија из крви у јетру (58). Такође, број NKT ћелија у периферној крви особа оболелих од стеатозе јетре је значајно смањен у односу на број NKT ћелија у крви здравих, што указује на мобилизацију NKT ћелија са периферије у оболелу јетру (59). Повећан број хепатичних NKT ћелија уједно је праћен већом експресијом CD1d молекула на мембрани Купферових ћелија (60, 61). У узорцима јетри деце оболеле од аутоимунског хепатитиса детектован је пораст броја NKT ћелија, док је у периферној крви њихов број био смањен у поређењу са здравом децом (62). Број хепатичних NKT ћелија се са развојем болести повећава и у јетри пацијената оболелих од вирусног хепатитиса С и В, а хроничитет ове болести јетре карактерише упечатљиви пораст експресије CD1d на APC у јетри (63, 64). У складу са тим, код пацијената са хепатитисом који добро реагују на примењену анти-вирусну

терапију детектовано је статистички значајно смањење броја NKT ћелија у јетри, у поређењу са пацијентима који лошије реагују на терапију (65).

Значај активације NKTћелија за прогресију обољења јетре је потврђена у неколико анималних модела: HBV инфекције (66), акутног хепатитиса (67, 68, 69, 70), примарне билијарне цирозе (71, 72, 73), токсичних оштећења јетре (74, 75, 76), неалкохолне стеатозе (77, 78, 79) и исхемијске болести јетре (80, 81, 82).

1.3. РЕГУЛАТОРНИ Т ЛИМФОЦИТИ

Регулаторни Т лимфоцити (енгл. *regulatory T cells*, Treg) представљају субпопулацију Т лимфоцита која има важну улогу у супресији имунског одговора. Treg лимфоцити се могу поделити на урођене Treg лимфоците који своје регулаторне функције стичу у тимусу (83) и индуцибилне Treg лимфоците који настају диференцијацијом зрелих конвенционалних Т лимфоцита услед субоптималног излагања антигенима и/или костимулацији (84). Treg лимфоците карактерише експресија молекула CD25 (α ланац рецептора за интерлеукин 2), CTLA-4 (енгл. *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) и GITR (енгл. *glucocorticoid induced TNRF family related gene*) (84). Међутим, специфичним маркером ових ћелија сматра се транскрипциони фактор Foxp3 (енгл. *Forkhead helix transcription factor p3*) који супримира гене за IL-2, IL-4 и IFN- γ , стога је важан фактор настанка, развоја и супресорских функција Treg лимфоцита (85). Инхибирањем транскрипције гена за IL-2 као и гена за рецептор за IL-2, Treg лимфоцити спречавају пролиферацију ефекторских Т ћелија (86), док посредством CTLA-4 и мембранског TGF- β заустављају активацију лимфоцита (87, 88). Директним контактом са дендритским ћелијама Treg лимфоцити повећавају експресију гена за индоламин-2,3-диоксигеназу (енгл. *indolamine 2,3-dyoxigenase*, IDO) у дендритским ћелијама. IDO разграђује есенцијални триптофан и узрокује настанак имуносупресивних метаболита што за последицу има супресију функција ефекторских Т лимфоцита (89). Експресијом молекула CD39 и CD73 Treg лимфоцити разграђују аденозинтрифосфат (енгл. *adenosine triphosphate*, АТФ) до аденозина који такође супримира ефекторске Т лимфоците (90). Осим поменутих имуномодулаторних ефеката, показано је да Treg лимфоцити инхибирају синтезу и промену класе антитела В лимфоцита (91), смањују цитотоксичку активност НК (92) и NKT ћелија (93), као и способност дендритских ћелија да обрађују и презентују антигене Т лимфоцитима (94).

1.3.1. Улога Treg лимфоцита у болестима јетре и њихова интеракција са NKT ћелијама

Treg лимфоцити чине од 0.5% до 1% укупног броја лимфоцита присутних у јетри здравих људи (95). Фактори који контролишу миграцију и задржавање Treg лимфоцита у инфламираној јетри као и улога ове популације ћелија у супресији имунског одговора у јетри још увек је предмет интензивног истраживања. Познато је да је број Treg лимфоцита у периферној крви оболелих од аутоимунског хепатитиса и РВС значајно мањи у поређењу са њиховим присуством у крви здравих особа (96, 97, 98, 99). Повећана заступљеност ових ћелија у оболелој јетри је повезана са мањим оштећењем, док је мали број Treg лимфоцита праћен већом некрозом хепатоцита (100). Интензиван инфлукс протективних Treg лимфоцита у јетру настаје услед интеракције Е кадхерина експримираног на ендотелу и CD103 молекула исказаног на мембрани Treg лимфоцита (101, 102). Експе

риментима на животињама су потврђени налази клиничких студија. Делеција Treg лимфоцита, применом анти-CD25 антитела, узрокује дисеминовану некрозу хепатоцита, док адоптивни трансфер CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Т ћелија, редукује оштећење јетре мишева изазвано применом конканавалина А (ConA) (100). Treg лимфоцити штите хепатоците на тај начин што супримирају ефекторске Т лимфоците који су инфилтрисали инфламирану јетру: директно, интеракцијом CTLA-4 молекула на Treg лимфоцитима и са CD80 и CD86 лигандима на ефекторским Т лимфоцитима, или индиректно, секрецијом TGF- β (100). Wei и сарадници су показали да у животиња са делецијом гена за TGF- β рецептор (TGF β RII *knockout*) након примене Con A настаје тешка дисеминована некроза хепатоцита праћена високим морталитетом (100).

Иако Treg и NKT ћелије могу независно регулисати имунски одговор, недавно објављене студије указују на значајну улогу интеракције ове две популације ћелије током инфламацијског одговора у јетри. Код оболелих од аутоимунског хепатитиса и РВС број и имунорегулаторна функција Treg лимфоцита су смањени (103, 104) док је број NKT ћелија, главних ефекторских ћелија у овим болестима повећан (57, 105, 106). Дакле, поремећен однос и измењена интеракција Treg и NKT ћелија значајно доприноси патогенези аутоимунских болести јетре. У моделу акутног хепатитиса је показано да α -GalCer-ом стимулисане NKT ћелије масовно мобилишу Treg лимфоците у јетру, што наводи на закључак да су NKT ћелије главни координатори запаљења у јетри, не само због својих проинфламацијских својстава, већ и због чињенице да

регулишу накупљање имуносупресивних Treg у јетру. Стимулисане NKT ћелије секретују IFN- γ који активира цитокинско-хемокинску каскаду одговорну за долазак Treg лимфоцита из крви у инфламирану јетру. IFN- γ значајно повећава експресију CXCL10 у јетри, лиганда за CXCR3 рецептор исказан на Treg лимфоцитима (107, 108) што за последицу има повећан инфлукс FoxP3⁺ Treg лимфоцита који продукују имунорегулаторне цитокине IL-10 и TGF- β 1. Претпоставља се да мембрански молекул CD103 омогућава Treg лимфоцита да остану чврсто везани за паренхим јетре (109). Миграција CXCR3⁺ Treg лимфоцита у инфламирану јетру IFN- γ -дефицијентних мишева и животиња којима је апликовано анти-CXCL10 антитело је значајно редукована (69). Смањену заступљеност хепатичких имуносупресивних Treg лимфоцита прати повећан инфлукс НК и ефекторских CD4⁺ Т ћелија које продукују проинфламацијске цитокине што резултира прогресијом акутног оштећења јетре (69).

1.4. РЕГУЛАТОРНИ В ЛИМФОЦИТИ

В лимфоцити се превасходно сматрају позитивним регулатором имунског одговора, при чему се ефекторске функције ових ћелија заснивају на продукцији антитела и проинфламацијских цитокина, као и презентовању антигена помагачким Т лимфоцитима (110, 111). Израз „регулаторни В лимфоцити“ (енгл. *regulatory B cells*, Breg) први пут су увели *Mizoguchi* и *Brana* 2006. године (112). Ова популација протективних Breg лимфоцита супримира имунски одговор и идентификована је у бројним моделима аутоимунских болести. У експериментима на животињама је показано да уклањање Breg лимфоцита повећава агресивност аутоимунског процеса, што указује на то да аутоимунски процес сам по себи промовише експанзију ових ћелија као компензаторни механизам како би се ограничило оштећење ткива (113, 114, 115). Популација Breg лимфоцита се на основу фенотипа и биолошких функција може поделити на различите субпопулације. *Mauri* и сарадници су описали прекурсоре В лимфоцита пореклом из маргиналне зоне слезине као CD21^{hi}CD23^{hi}CD1d^{hi} ћелије (116, 117). Група предвођена *Tedder*-ом идентификовала је субпопулацију В лимфоцита у слезини чија је главна функционална карактеристика продукција имуносупресивног IL-10 (118, 119). Ове имунорегулаторне ћелије су стога назване В10 лимфоцити, а фенотипски су окарактерисане као CD1d^{hi}CD5⁺ ћелије (118, 119). Регулаторна функција Breg лимфоцита, активираних у запаљенској микросредини, заснива се на способности ових ћелија да продукују анти-инфламацијски IL-10, којим супримирају

продукцију проинфламацијских цитокина у ефекторским Т лимфоцитима и подстичу диференцијацију Treg лимфоцита (120-123). Осим IL-10, Breg лимфоцити продукују и TGF- β који такође има важну регулаторну функцију (124-126). Посредством инхибиторних молекула експримираних на мембрани, Breg лимфоцити директним међућелијским контактом индукују имунску толеранцију на тај начин што супримирају ефекторске Т и В лимфоците и индукују регулаторни фенотип имунских ћелија (127, 128, 129). Површински молекули кључни за имунорегулаторне функције Breg лимфоцита су B7 (130), GITRL (енгл. *glucocorticoid-induced TNF receptor ligand*) (131), FasL (132, 133), PD-L (енгл. *programmed death-1 ligand*) (134, 135) и ектонуклеотидазе CD39 и CD73 (136, 137). Аутоантитела која су одговорна за патогене ефекте В лимфоцита, у овом контексту имају протективну улогу јер редукују доступност аутоантигена (138). Интеракција CD40-CD40L и присуство IL-21 стимулишу настанак IL-10⁺ Breg лимфоцита који супримирају Th1 и Th17 имунски одговор (139, 140). Још један од механизма којим Breg лимфоцити смањују запаљење је индукција апоптозе CD4⁺ Т лимфоцита посредством FasL (141, 142). Деплеција В лимфоцита значајно поспешује инфламацијски одговор у коме учествују CD8⁺ Т лимфоцити, што указује на супресивни ефекат Breg лимфоцита и на цитотоксичне CD8⁺ Т лимфоците (143, 144). Breg лимфоцити индукују апоптозу CD8⁺ Т лимфоцита и смањују број цитотоксичких лимфоцита у запаљењем захваћеном ткиву на тај начин што смањено продукују IL-2 (145). Током супресије инфламацијског одговора Breg лимфоцити директно делују и на ћелије урођеног имунског одговора- смањују инфилтрацију макрофага (146), неутрофила (147) и NK ћелија (148) у инфламирано ткиво. Посредством IL-10, В лимфоцити инхибирају сазревање, експресију ко-стимулаторних молекула CD80 и CD86 на DCs као и капацитет ових ћелија да презентују антигене и продукују IL-12 (149).

1.4.1. Улога Breg лимфоцита у болестима јетре и њихова интеракција са НКТ ћелијама

В лимфоцити су присутни у здравој јетри људи, а њихов број драматично расте при обољењима овог органа (150). В лимфоцити модулирају како урођени тако и стечени имунски одговор и усмеравају имунски систем према његовој активацији или толеранцији.

У моделу аутоимунског холангитиса NOD.c3c4 (енгл. *non-obese diabetic*) мишева показано је да В лимфоцити промовишу запаљенски одговор током ране фазе болести, обзиром да деплеција ових ћелија значајно редукује инфламацију у јетри (151). Такође, у моделу хроничног оштећења јетре које је мишевима изазвано применом токсина карбон тетра хлорида (CCl₄), В лимфоцити су имали профиброгени ефекат који је независан од продукције антитела и активације Т лимфоцита (152). Због добро познате проинфламацијске улоге В лимфоцита, примена лекова који ефикасно смањују број ових ћелија као што је ритуксимаб (моноклонско антитело против протеина CD20) је постала стандардна терапија за бројне туморе и аутоимунске болести јетре (153, 154). Међутим, у моделима аутоимунског холангитиса у dnTGFβRII (енгл. *double negative*) мишева као и у холангитису изазваном ксенобиотиком показано је да В лимфоцити имају регулаторни фенотип, обзиром да *in vivo* деплеција ових ћелија значајно погоршава аутоимунски процес (155). Vreg лимфоцити такође супримирају инфламацијски одговор у јетри изазван активацијом CD4⁺ Т лимфоцита, о чему говори податак да мишеви дефицијенти за В лимфоците након инфекције паразитом *Schistosoma mansoni* развијају теже оштећење јетре и не улазе у уобичајену спонтану ремисију током касне фазе болести (156). Almishri и сарадници су у моделу акутног хепатитиса који је изазван α-GalCer-ом, недавно показали да након стимулације NKT ћелија, следи брза миграција В1 (В1а и В1b) лимфоцита из перитонеалне шупљине и В лимфоцита из маргиналне зоне слезине (енгл. *marginal zone*, MZ) у јетрине синусоиде и област порталног крвотока (157). Деплеција В лимфоцита је променила цитокински профил и значајно погоршала акутни хепатитис, што је указало да након активације хепатичних NKT ћелија следи снажан одговор Vreg које имају важну улогу у супресији инфламације и модулацији имунског одговора у јетри (157). Ове регулаторне ћелије *innate-like* фенотипа продукују антитела слабог афинитета, презентују антигене и продукују регулаторне цитокине IL-10 и TGF-β1 којима супримирају инфламацију и аутоимунски процес (158). Такође, осим антиинфламацијских цитокина, Vreg експримирају бројне адхезивне молекуле, рецепторе, као и ектоензим CD73 којима регулишу урођени и стечени имунски одговор (159). Активношћу ектонуклеотидазе CD73 настаје аденозин за који је познато да смањује акутно оштећење јетре (160). На основу ових података може се закључити да регулаторне ћелије имају широк спектар деловања на различите типове имунокомпетентних ћелија, што им обезбеђује важно место у хомеостази имунског система. Резултати многих истраживања показују да су регулаторни лимфоцити

незаобилазни учесници практично свих облика неспецифичног и специфичног имунског одговора у болестима јетре.

1.5. АНИМАЛНИ МОДЕЛИ АКУТНОГ ХЕПАТИТИСА ИЗАЗВАНИ АКТИВАЦИЈОМ NKT ЋЕЛИЈА

1.5.1. Фулминантни хепатитис индукован применом Con A

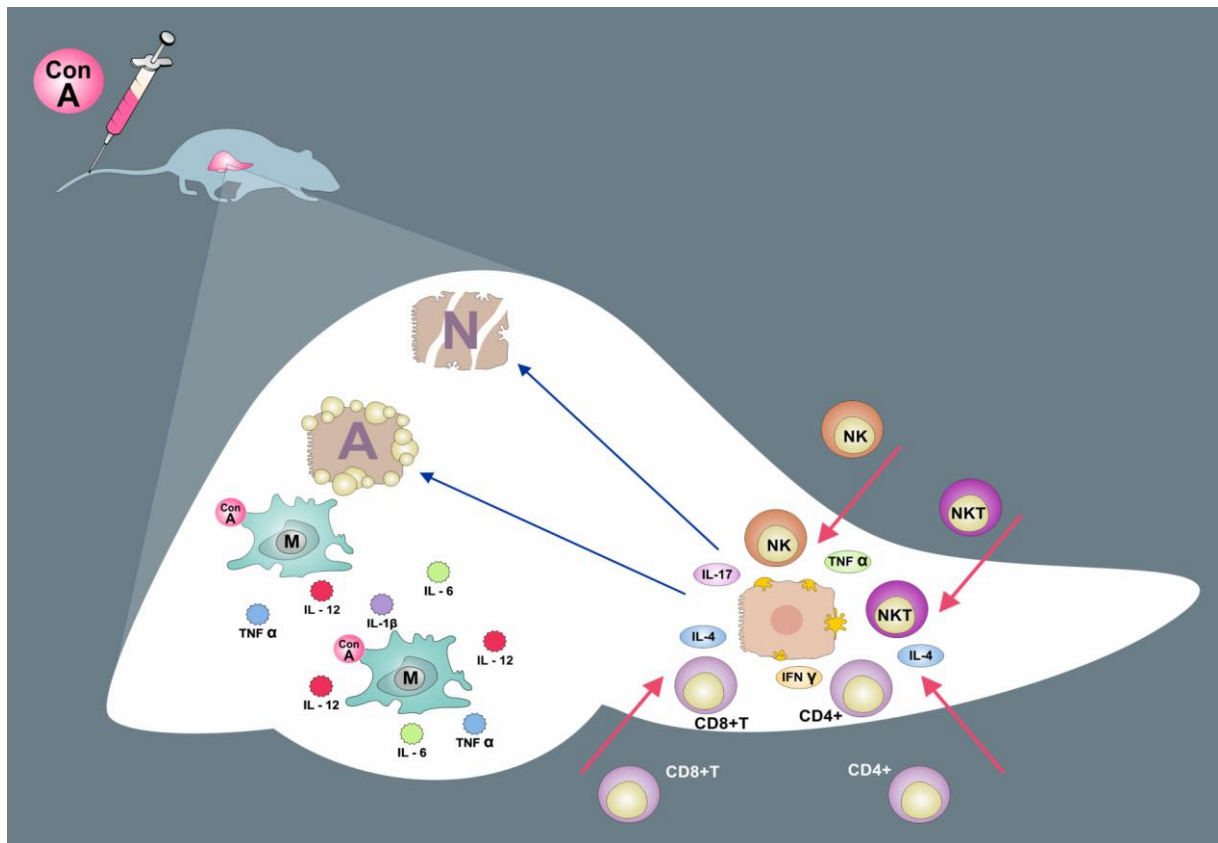
Најчешће примењиван анимални модел аутоимунског хепатитиса се индукује интравенском апликацијом Con A. Con A је лектин првобитно изолован из пасуља (лат. *Canavalia ensiformis*). Карактерише га афинитет за α -D-mannosyl и α -D-glucosyl групе које се налазе у шећерима, гликопротеинима и гликолипидима (161).

Након апликације макрофаги јетре лектин-везујућим рецепторима први препознају и ингестирају Con A из циркулације (162). Активирани макрофаги затим продукују проинфламацијске цитокине (IL-1 β , TNF- α , IL-6 и IL-12) и привлаче ефекторске ћелије у јетру: NKT и NK ћелије, као и поликлонално активирани CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоците, које директним цитотоксичким ефектом и индиректно продукцијом цитокина (TNF- α , IFN- γ , IL-17 и IL-4) узрокују масовну некрозу хепатоцита (162).

Главне ефекторске ћелије у патогенези Con A хепатитиса су NKT ћелије, што потврђује студија у којој је показано да су мишеви дефицијентни за CD1d молекул резистентни на индукцију овог модела (163, 164, 68). На основу поменутих резултата је закључено да су CD4⁺ ћелије које су сматране најзначајнијим у развоју Con A хепатитиса у највећем броју CD4⁺ NKT ћелије (162, 68). Такође је показано и да су *V α 14 knockout* (*V α 14^{-/-}*) мишеви резистентни на Con A хепатитис, па су *V α 14⁺* NKT ћелије означене као субпопулација NKT ћелија одговорна за оштећење хепатоцита у Con A хепатитису (165). NKT ћелије индукују апоптозу хепатоцита посредством Fas ligand:Fas интеракције (166) и продукцијом проинфламацијских цитокина IFN- γ и TNF- α (165). У Con A хепатитису, IFN- γ узрокује апоптозу хепатоцита повећавајући експресију Fas рецептора на њиховој мембрани (167). Активација IFN- γ /STAT-1 сигналног пута подстиче експресију адхезионих молекула: ICAM-1, VCAM-1, Mig (енг. *monokine induced by IFN- γ*), ENA-78 (енгл. *epithelial cell derived neutrophil-activating peptide*), I-TAC (енгл. *IFN-inducible T cell- α chemoattractant*), IP-10 (енгл. *IFN-inducible protein-10*) на мембрани синусоидалних ендотелних ћелија чиме помаже инфлукс леукоцита у јетру (168). IFN- γ додатно симулише продукцију TNF- α који има изражено хепатотоксичко дејство (169). TNF- α остварује директан хепатотоксички

ефекат везивањем за TNF рецепторе хепатоцита и активацијом JNK киназа. Осим директним хепатотоксичким ефектом, TNF- α доприноси оштећењу јетре и индиректно: повећавајући експресију адхезивног молекула ICAM-1 на ендотелним ћелијама јетре чиме помаже инфлукс леукоцита, пре свега CD4⁺ Т лимфоцита (170). Tagawa и сарадници су уочили да IFN- γ дефицијентни мишеви након примене Con A не развијају хепатитис, док са друге стране у присуству делеције гена за TNF- α апликација Con A изазива оштећење јетре (167). На тај начин је показана централна улога проинфламацијског IFN- γ у патогенези овог модела хепатитиса.

Интравенска апликација Con A поликлонално активира цитотоксичке CD8⁺ Т лимфоците, који оштећују хепатоците продукцијом перфорина и гранзима (171, 172) као и секрецијом IFN- γ који повећава експресију рецептора смрти Fas на хепатоцитима (167,173,174). Међутим, CD8⁺ Т лимфоцити, без присуства помоћничких CD4⁺ Т лимфоцита не могу да узрокују оштећење хепатоцита (162). Стога се сматра да поред NKT ћелија, CD4⁺ Т лимфоцити заузимају централно место у патогенези Con A хепатитиса, на тај начин што продукују IFN- γ и TNF- α који регулишу миграцију и активацију осталих ефекторских ћелија у јетру (170, 168).

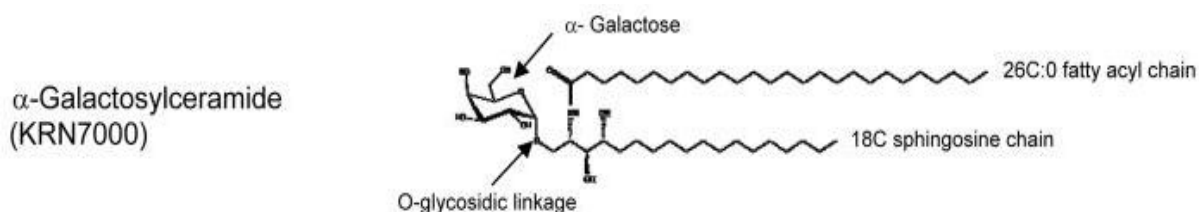


Слика 2. Имунопатогенеза Con A хепатитиса.

Са друге стране, интравенска примена Cop A „мобише“ CD4⁺IL-10⁺ Т лимфоците као и CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺ регулаторне Т лимфоците у јетру (175) који имају протективну улогу у акутном оштећењу јетре и одговорни су за настанак имунске толеранције на Cop A (176, 177). Интеракцијом CTLA-4 молекула експримираног на мембрани Treg и његових лиганата CD80 и CD86 на ефекторским Т лимфоцитима инхибира се активација ефекторских Т лимфоцита (178). Додатно, продукцијом TGF-β, регулаторни лимфоцити редукују дисеминовану некрозу хепатоцита и смањују морталитет Cop A третираних животиња (175).

1.5.2. Фулминантни хепатитис индукован применом α-GalCer

α-GalCer представља поједностављени гликолипидни аналог агеласфина, који је првобитно изолован из морског сунђера *Agelas mauritanus* 1993. године током предклиничких покушаја да се идентификује ново антитуморско терапијско средство (179). α-GalCer (комерцијално назван KRN7000) је изграђен од α-галактозе, фитосфингозина и ацилног ланца (Слика 3). Данас, α-GalCer је познати антиген за CD1d -реактивне NKT ћелије миша и човека (179).



Слика 3. Хемијска структура α-галактоцерамида.

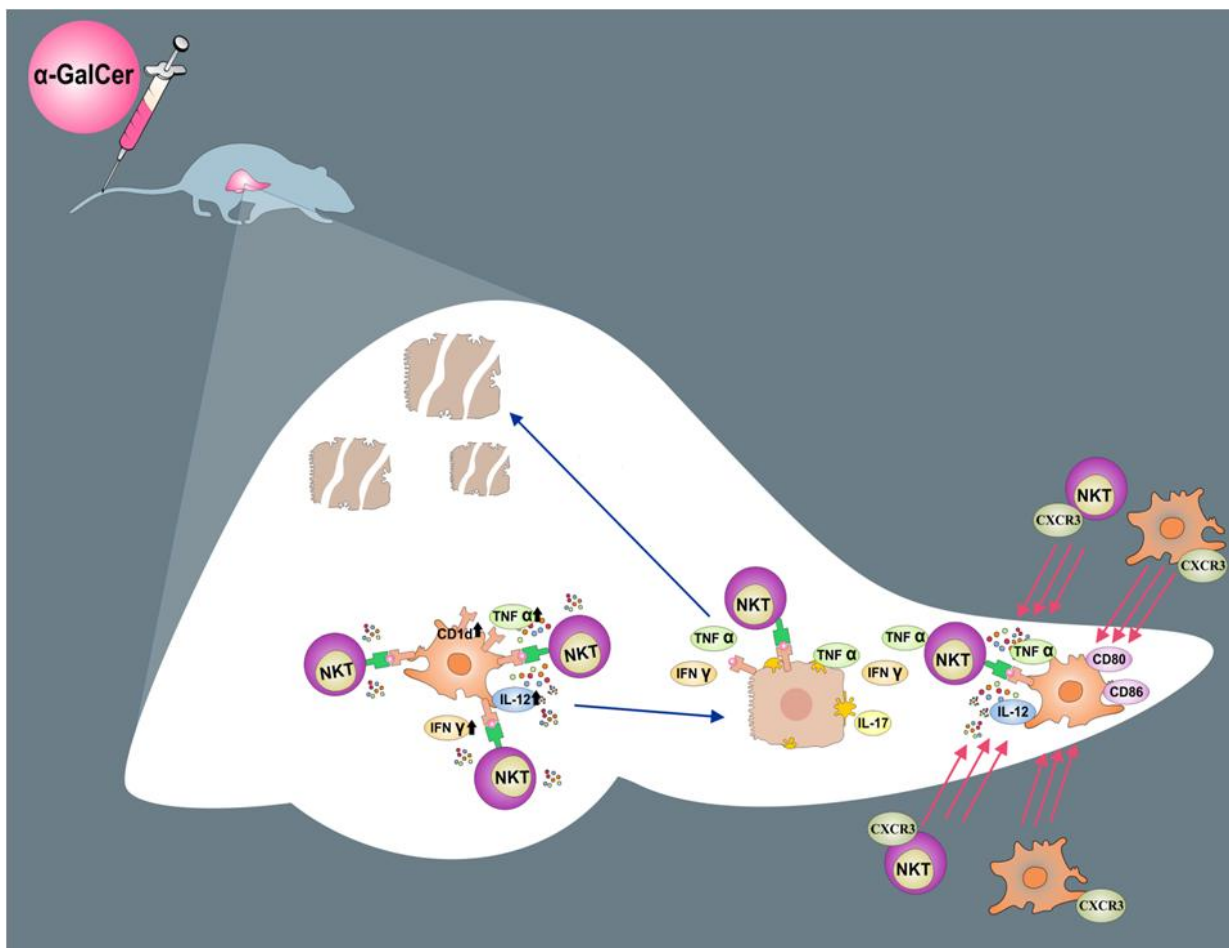
Системском применом егзогеног α-GalCer-а којим се специфично активирају NKT ћелије и покреће снажан имунски одговор у јетри изазива се мишији модел акутног хепатитиса (69). Механизам настанка, патолошке промене које се детектују у јетри експерименталних животиња, као и чињеница да је α-GalCer ендогени лиганд NKT ћелија који конститутивно продукују имунске ћелије сисара, чине овај модел физиолошки релевантним за испитивање етиопатогенезе, прогресије и нових видова терапије аутоимунског хепатитиса (18).

Једна доза α -GalCer-а узрокује акумулацију NKT ћелија у јетри, на тај начин што повећава експресију CXCR6 хемокинског рецептора на NKT ћелијама и његовог лиганда, хемокина CXCL16, на синусоидалним ендотелним ћелијама. Хемокини LFA-1 и ICAM-1 експримирани на ендотелу додатно олакшавају миграцију NKT ћелија у јетру (36).

α -GalCer из циркулације преузимају DCs и презентују га у контексту CD1d молекула NKT ћелијама које својим семи-инваријантним TCR-ом препознају CD1d- α GalCer комплекс. α -GalCer стимулише продукцију IL-12 и експресију CD40 на DCs, као и CD40L на NKT ћелијама (180). Описана интеракција два типа ћелија за последицу има активацију NKT ћелија и сазревање DCs (180). Активирани NKT ћелије производе широк спектар цитокина укључујући Th1 (IFN- γ и TNF- α), Th2 (IL-4, IL-5 и IL-13) и Th17 (IL-17) цитокине (55), којима директно оркестрирају урођени и стечени имунски одговор на повреду јетре. Активирани NKT ћелије показују аутореактивност и последично узрокују акутно оштећење јетре (181). Овај феномен је праћен активацијом В лимфоцита и продукцијом аутоантитела (181).

IFN- γ кога производе NKT ћелије делује преко рецептора 1 за IFN- γ (енгл. *IFN- γ receptor 1*, IFNGR1) и рецептора 2 за IFN- γ (енгл. *IFN- γ receptor 2*, IFNGR2), услед чега се активира STAT1 (енгл. *signal transducer and activator of transcription 1*) молекула у хепатоцитима, непаренхимским ћелијама јетре и ћелијама имунског система које се активирају што резултира развојем акутног хепатитиса (182). IFN- γ активира NK ћелије у јетри док истовремено редукује инфилтрацију неутрофила (182). Међутим, за разлику од Соп А хепатитиса, показано је да се хепатитис изазван α -GalCer-ом развија и у случају неутрализације IFN- γ односно да је кључни цитокин за настанак оштећења јетре у овом моделу TNF- α кога доминантно секретују NKT ћелије (69). TNF- α индукује оштећење хепатоцита директним цитотоксичким механизмом као и аутокриним и паракриним индукцијом експресије FasL на NKT ћелијама (69). IL-4 кога производе NKT ћелије остварује свој ефекат везивањем за IL-4R α и gp140/ γ c ланац, или IL-4R α и IL-13R α 1 ланац што последично активира сигнални молекула STAT6 (енгл. *signal transducer and activator of transcription 6*). IL-4/STAT6 сигнални пут стимулише експресију мијелопероксидазе и инхибира апоптозу неутрофила у јетри. У прилогу ове студије у којима је делеција гена за IL-4 или рецептор за IL-4 повећала апоптозу неутрофила и смањила њихову заступљеност у јетри α -GalCer-ом третираних мишева и последично редуковала хепатитис (182). Непосредно након активације α -GalCer-ом, популација NKT ћелија која експримира транскрипциони фактор ROR γ T

продукује IL-17, који повећава инфилтрацију и хепатотоксичност неутрофила, CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита у јетри (183). Улога IL-17 у овом моделу је међутим контроверзна. Недавно је показано да anti-IL-17 антители повећава експресију хемокина MCP-1 and CXCL5 у јетри што за последицу има повећан инфлукс ефекторских NKT ћелија и погоршање акутног хепатитиса који је изазван α-GalCer-ом (184). Слично осталим моделима акутног оштећења јетре, α-GalCer изазива пролазни хепатитис, што потврђује да се дуготрајно укидање имунске толеранције у јетри тешко постиже као и да овај модел болести карактеришу снажни регулаторни процеси који контролишу оштећење јетре и доприносе њеној регенерацији (182).



Слика 4. Имунопатогенеза α-GalCer хепатитиса.

1.6. МЕЗЕНХИМАЛНЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ

Мезенхималне матичне ћелије (енгл. *mesenchymal stem cells*, MSCs) су адултне матичне ћелије, облика фибробласта, које имају способност самообнављања и диференцијације у ћелије мезодерма (185, 186). Недавно објављене студије указују да MSCs

карактерише и фенотипска пластичност, односно капацитет да се *in vitro* диференцирају и у ћелије друга два клицина листа- ћелије ектодерма (неуроне, астроците и олигодендроците) и ендодерма (хепатоците) (187).

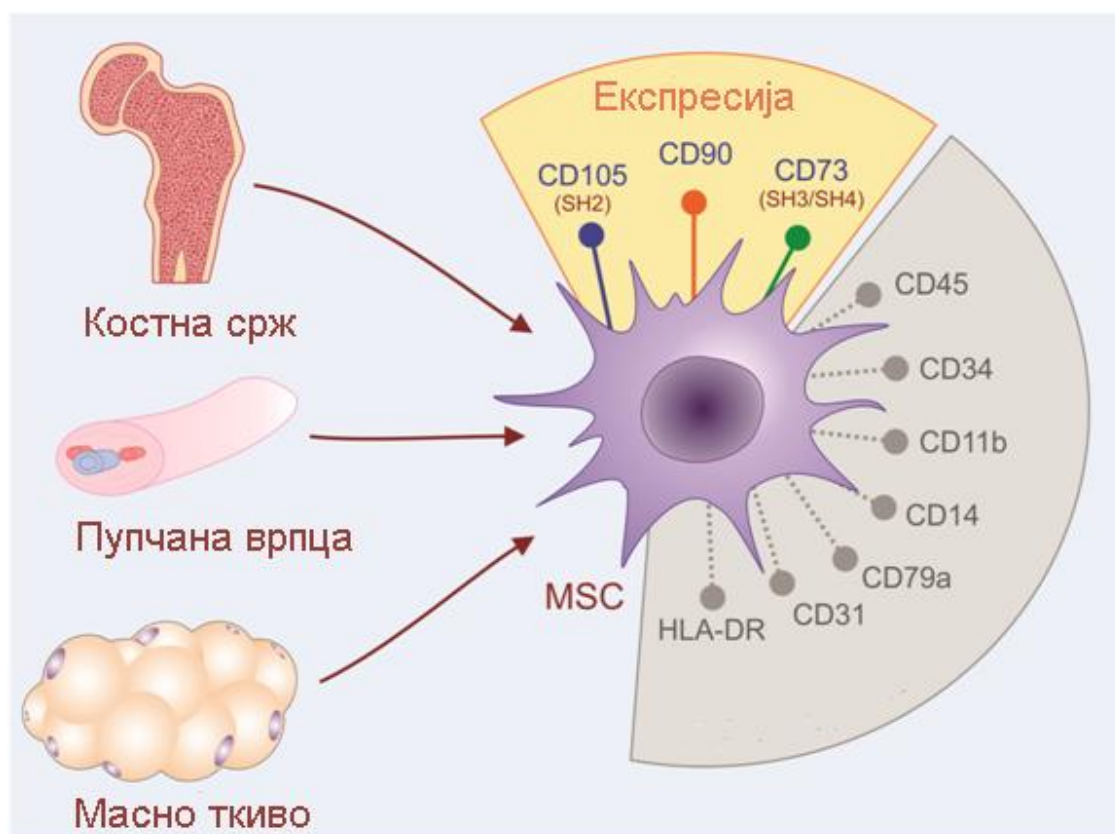
1.6.1. Порекло и извори MSCs

Порекло MSCs још увек није потпуно разјашњено. *Battula* и сарадници су указали да ћелије настале епително-мезенхималном транзицијом наликују MSCs по експресији гена, мултипотентности и способности миграције ка месту повреде у ткиву (188). *Takashima* и сарадници су доказали да током ембриогенезе први прогенитори MSCs воде порекло од Sox1⁺ неуроепителних ћелија, док током каснијег постнаталног развоја MSCs настају из других извора (189). Ово запажање не искључује могућност да под одговарајућим условима MSCs могу настати и од параксијалног мезодерма. Већина до данас објављених студија подржава хипотезу да MSCs воде порекло од периваскуларних ћелија- перицита, о чему говоре у прилог чињенице да перицити експримирају неке од MSCs маркера и испољавају остеогени, хондрогени и адипогени потенцијал диференцијације (190).

MSCs су присутне у готово свим постнаталним ткивима (191), а најчешће се изолују из костне сржи (енгл. *bone marrow derived mesenchymal stem cells*, BM-MSCs). Брза пролиферација, дуготрајно одржавање капацитета диференцијације *in vitro*, слаба експресија МНС молекула и самим тим мали ризик од одбацивања након алогене трансплантације, чине BM-MSCs погодним за терапијску примену (192, 193). Међутим, због инвазивности процедуре за изоловање BM-MSCs, као и значајног смањења броја ових ћелија у костној сржи услед старења, последњих година велика пажња је усмерена на алтернативне изворе MSCs, као што су пупчана врпца (енгл. *umbilical cord derived mesenchymal stem cells*, UC-MSCs) и масно ткиво (енгл. *adipose tissue derived mesenchymal stem cells*, AT-MSCs) (194, 195, 196, 197, 198). Предност AT-MSCs у односу на BM-MSCs је та што се применом мање инвазивне процедуре каква је на пример липосукција изолује значајно већи број ћелија (198). Изолација UC-MSCs је неинвазивна и безбедна процедура. При стандардним условима култивације, UC-MSCs брже пролиферишу у односу на BM-MSCs и AT-MSCs и показују мању експресију маркера ћелијског старења p53, p21 и p16 (199, 200). BM-MSCs, UCB-MSCs и AT-MSCs имају сличне морфолошке и функционалне карактеристике укључујући мултипотентност и способност имуномодулације.

1.6.2. Карактеристике MSCs

MSCs експримирају широк спектар различитих површинских антигена, чија експресија варира у зависности од ткива из кога су изоловане као и протокола који је примењен за њихову изолацију и култивацију. Због тога је Међународно друштво за ћелијску терапију дефинисало минималне критеријуме за карактеризацију MSCs: адхерентност за пластику при стандарним условима култивације, мултипотентност (капацитет диференцијације у ћелије мезодерма), експресија маркера CD105 (SH2, ендоглин), CD73 (SH3/SH4, екто5-нуклеотидаза), CD90 (Thy-1) и одсуство експресије хематопоетских маркера CD45 (пан-леукоцитарни антиген), CD34 (маркер хематопоетских прогенитора и ендотелних ћелија), CD14 (CD11b, маркер моноцита и макрофага), CD79 α (CD19, маркер В лимфоцита), CD31 (адхезивни молекул ендотелних ћелија) и МНС молекула II класе (HLA-DR) (201). (Слика 5)



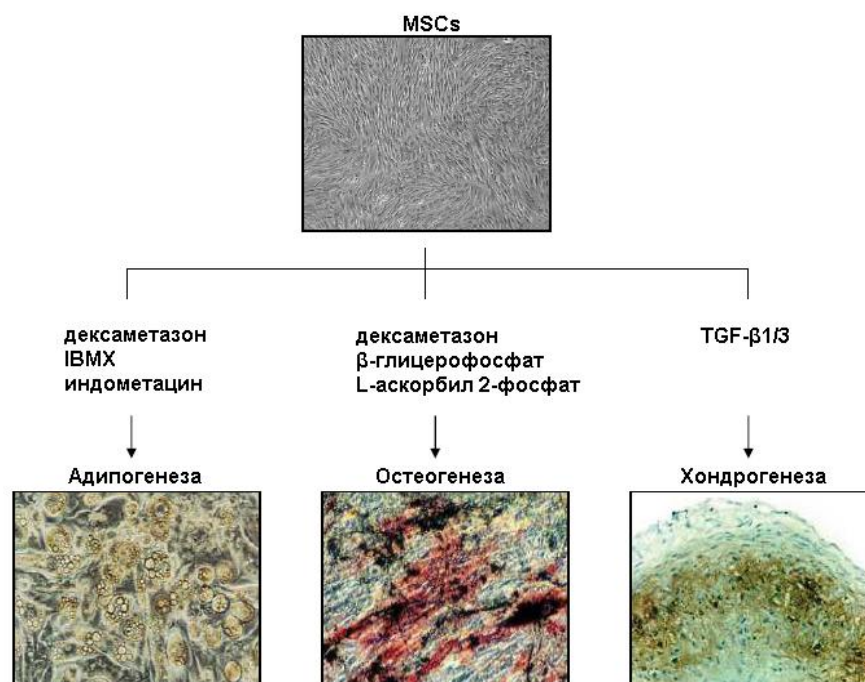
Слика 5. Порекло и фенотипске карактеристике MSCs. (кориговано према: Volarevic V et al. *Biofactors* 2017; doi: 10.1002/biof.1374).

Поред поменутих морфолошких и фенотипских карактеристика, *in vitro* диференцијација у остеобласте, адипоците и хондробласте је особина која на најсигурнији начин омогућава идентификацију MSCs (Слика 6). У више студија је показано да TGF- β 1, 2 и 3 стимулишу диференцијацију MSCs у хондроците (202). Циклично излагање MSCs комбинацији TGF- β 3 и BMP-6 (енгл. *bone morphogenetic protein-6*) изазива депоновање матрикса хрскавице (203). Као хондрогени медијум, на супрот медијуму за експанзију MSCs, користи се DMEM са високим садржајем глукозе у који се додају биоактивни молекули L-пролин (40 μ g/ml), ITS (енгл. *insulin, transferring, sodium selenite*), натријум пируват (100 μ g/ml), дексаметазон (100 nM) и L-аскорбинска киселина (50 μ g/ml) (204). Хондрогена диференцијација MSCs доказује се хистолошким бојењима, *Safranin-O/fast green* и *Alcian blue*, коришћењем реагенса који је осетљив на присуство протеогликана и глюкозаминогликана.

In vitro индукција диференцијације MSCs у остеобласте може се постићи применом неколико различитих протокола. Тако на пример, 100 nM дексаметазона, 50 μ g/ml L-аскорбил 2-фосфата (енгл. *L-ascorbic acid 2-phosphate*, AsAP) и 100 mM β -глицерофосфата након 7 до 14 дана резултује депоновањем калцијума и експресијом касних остеогених маркера као што су сијалопротеин кости, остеокалцин и остеонектин (205, 206, 207). Дексаметазон је гликокортикостероид који у зависности од дозе може да стимулише или инхибира остеогену диференцијацију MSCs (208). Показано је да високе дозе дексаметазона стимулишу адипогену, док ниске дозе стимулишу остеогену диференцијацију MSCs (208). Додавање AsAP у културу, промовише пролиферацију ћелија и биосинтезу колагена (124, 125, 126, 209, 210, 211). У комбинацији са поменутих суплементима, β -глицерофосфат игра кључну улогу у стварању калцификованог матрикса, обзиром да је у његовом одсуству депоновање калцијум фосфата веома споро (126, 211). Рани индикатори остеогене диференцијације MSCs су повећана експресија алкалне фосфатазе која се може квантификовати коришћењем комерцијалних китова или хемијским бојењем на бази нафтола (212, 213), као и стварање калцификованог матрикса која се хистолошки најчешће верификује бојењем фосфатних компоненти матрикса *Alizarin red*-ом (212, 213).

MSCs гајене у једном слоју, у присуству дексаметазона (0,5 μ M), 1-метил-3-изобутилксантина (енгл. *1-methyl-3-isobutylxanthine*, IBMX) (0,5 μ M–0,5 mM) и индометацина (50–100 μ M), подлежу адипогеној диференцијацији (214, 215, 216, 186, 217). Инсулин је важан састојак медијума за диференцијацију MSCs у адипоците (дексаметазон, IBMX, индометацин) током периода од 2 до 5 дана, као и за одржавање

добијених адипоцита у култури (216). У већини студија је забележено да доза дексаметазона за индукцију диференцијације MSCs у адипоците треба да буде 0.5 μM односно пет пута већа од оне којом се MSCs усмеравају ка остеоцитима. Кључни корак у започињању адипогенезе је заустављање ћелијског циклуса хондроцита добијених од MSCs. IBMX је инхибитор фосфодиестеразе који спречава конверзију cAMP у 5'AMP, што за последицу има повећану експресију протеин киназе А и хормон сензитивне липазе (енгл. *hormone sensitive lipase*, HSL) као и смањење пролиферације ћелија (218). HSL разграђује триацилглицероле у глицерол и слободне масне киселине, што представља важну реакцију током адипогенезе (218). Експресија транскрипционог фактора PPAR γ (енгл. *peroxisome proliferator-activated receptor γ*) у MSCs изазвана индометацином, игра важну улогу у адипогенези и остеогенези. Активација PPAR γ директно инхибира остеогену диференцијацију преко Wnt сигналног пута, док је истовремено неопходна за адипогену диференцијацију (218, 219, 220). Наиме, показано је да изостанак експресије PPAR γ значајно редукује депоновање липидних вакуола и пролиферацију адипоцита (217). У циљу потврде диференцијације MSCs у адипоците, експресија транскрипционог фактора PPAR γ 2 се детектује методом RT-PCR. Такође, липидне вакуоле синтетисане интрацелуларно у адипоцитима генерисаним из MSCs, идентификују се *Oil Red-O* хистолошким бојењем.

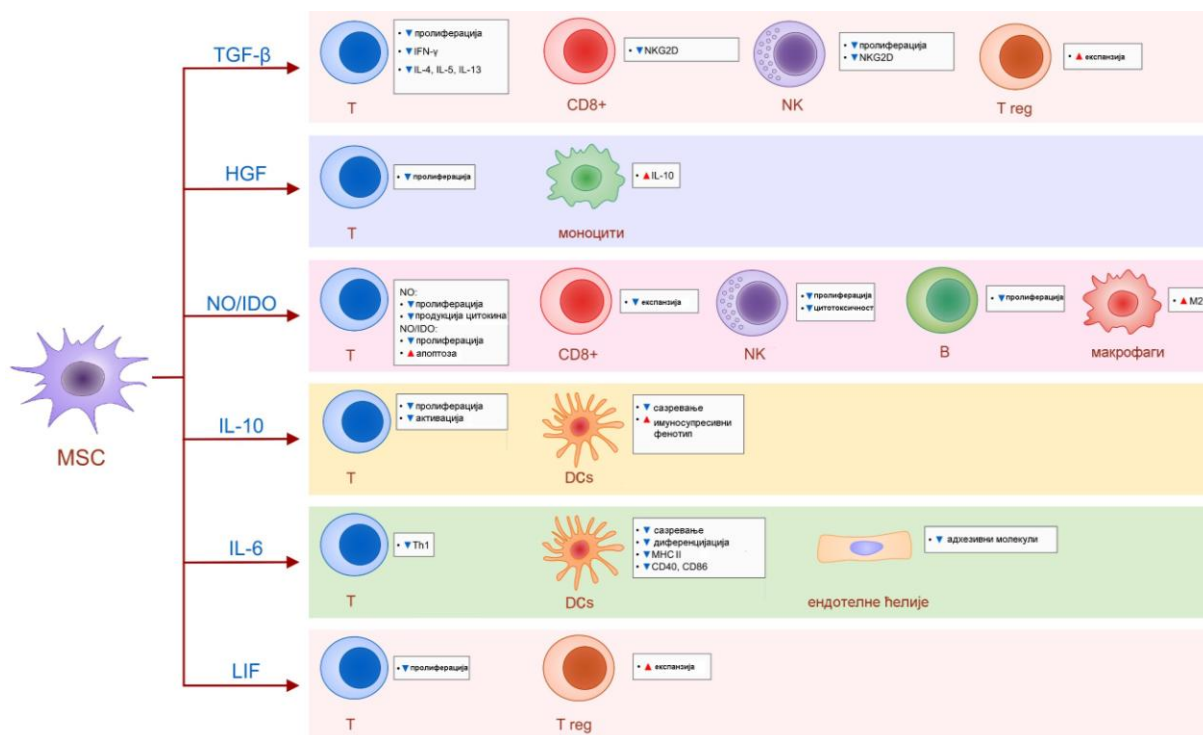


Слика 6. Диференцијација MSCs у адипоците, остеобласте и хондроците. (кориговано према: Pittenger M.F. *Science*.1999; 284:143-147 и Yeh W.C. *Genes Dev*.1995; 9:168-181).

1.7. ИМУНОМОДУЛАТОРНА СВОЈСТВА MSCs

Осим прогениторских особина, MSCs карактеришу и брза мобилизација (енгл. *homing*), односно одлазак у оштећено ткиво, као и способност да модулирају имунски одговор директним контактом са ћелијама имунског система или продукцијом солубилних фактора (191).

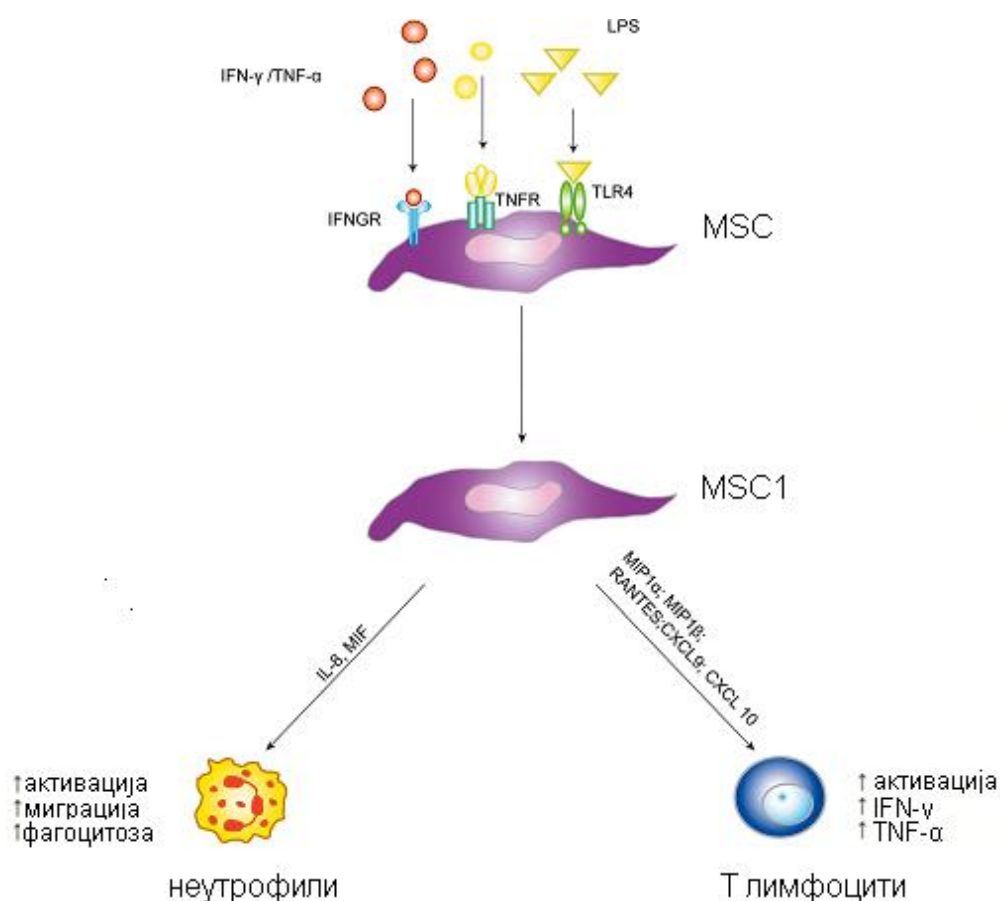
Након системске примене, MSCs мигрирају у повређено ткиво. Проинфламацијски цитокини TNF- α , IL-1 и IFN- γ секретовани након оштећења ткива, индукују експресију адхезивних молекула који учествују у котрљању и трансмиграцији MSCs у екстрацелуларни матрикс. Миграција MSCs у запаљенску микросредину заснива се на интеракцији CXCL12 хемокина који је индукован проинфламацијским стимулусима и рецептора CXCR4 експримираног на површини MSCs. Непосредно након енграфтмента, MSCs модулирају урођени и стечени имунски одговор директним међућелијским контактом и паракриним механизмом. Паракрини ефекат на ћелије имунског система MSCs остварују посредством солубилних фактора: TGF- β , фактор раста хепатоцита (енгл. *hepatocyte growth factor*, HGF), простагландин E2 (PGE₂), IDO, индуцибилна азот оксид синтаза (енгл. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS), IL-10, IL-6, леукемијски инхибиторни фактор (енгл. *leukemia inhibitory factor*, LIF), фактором некрозе тумора стимулирани ген 6 (енгл. *TNF α -stimulated gene- 6*, TSG-6), хумани леукоцитарни антиген G (енгл. *human leukocyte antigen-G*, HLA-G) и хем оксигеназа 1 (енгл. *heme oxygenase 1*, HO-1) (221). (Слика 7)



Слика 7. Паракрини ефекат MSCs на различите ћелијске популације. (кориговано према: Volarevic V et al. *Biofactors* 2017; doi: 10.1002/biof.1374).

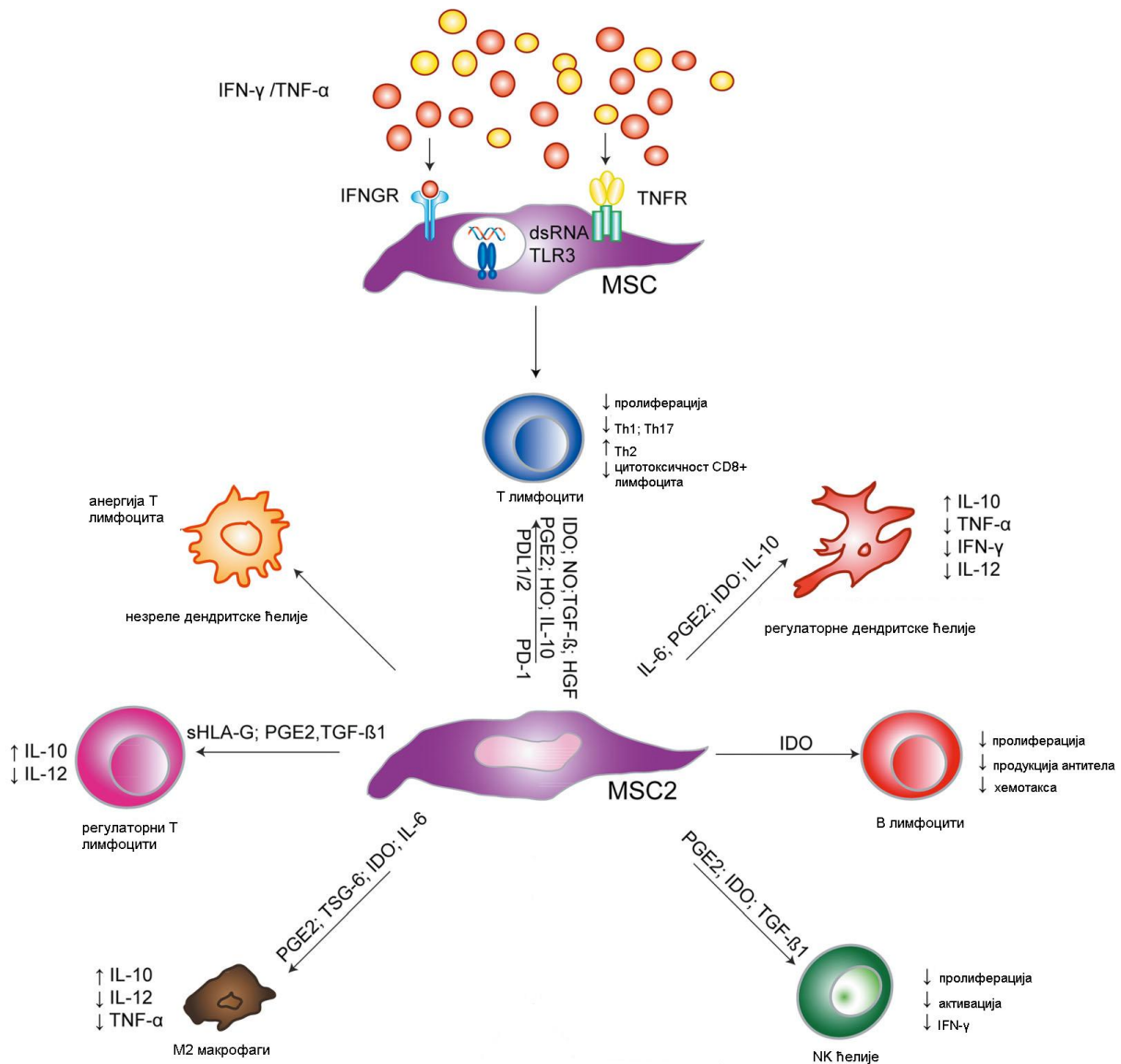
Недавним студијама је показано да у зависности од запаљенског миљеа, MSCs промовишу или супримирају инфламацију. У присуству ниских концентрација TNF- α и IFN- γ , MSCs стичу проинфламацијски фенотип (MSC1) (221) (Слика 8). MSC1 појачавају одговор Т лимфоцита, тако што секретују хемокине MIP-1 α (енгл. *macrophage inflammatory protein 1 alpha*), MIP-1 β , (енгл. *macrophage inflammatory protein-1b*), RANTES (енгл. *regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*), CXCL9 и CXCL10 којима привлаче лимфоците у место запаљења (222). У оваквој средини активност iNOS у мишјим и IDO у хуманим ћелијама није довољна да супримира пролиферацију Т лимфоцита (223,224). Конверзија MSCs у проинфламацијски или антиинфламацијски фенотип зависи и од стимулације рецептора сличних Toll-у (енгл. *toll-like receptors*, TLRs) експримираних на њиховој површини (225). Активација TLR4 липополисахаридом (енгл. *Lipopolysaccharide*, LPS) при раном одговору на повреду ткива, усмерава MSCs према MSC1 фенотипу, док активација TLR3 дволанчаном рибонуклеинском киселином (енгл. *double stranded RNA*, dsRNA) индукује имunosупресивни MSC2 фенотип (225). Равнотежа ова два

супротна пута промовише одбрану домаћина, али истовремено спречава претерано оштећење ткива и доприноси његовој репарацији (222). Током ране фазе инфламације, MSCs смањују апоптозу неутрофила, промовишу њихову миграцију у место инфекције и повећавају њихову способност да фагоцитују бактерије. Кључну улогу у инхибицији апоптозе неутрофила имају IL-6/STAT-3, IFN- β и GM-CSF (226, 227). На овај начин, у присуству MSCs активираних преко TLR3, одржава се *pool* неутрофила који доприносе одбрани домаћина од инфекције (228). Након препознавања антигена микроорганизама резидентне ткивне MSCs, појачано продукују факторе раста као што су IL-8 и MIF (енгл. *macrophagemigration inhibitory factor*), који привлаче неутрофиле и повећавају њихову проинфламацијску активност (229). Током ране фазе имунског одговора MSCs повећавају способност неутрофила да фагоцитују бактерије и на тај начин побољшају елиминацију патогена из оштећеног ткива (230). Међутим, током касне фазе имунског одговора, у присуству високих концентрација TNF- α и IFN- γ , MSCs индукују експресију IL-10 у моноцитима и макрофагима, цитокина који превенира миграцију неутрофила у ткиво и спречава оксидативни стрес (231). Ови резултати указују да у почетку запаљења MSCs играју проинфламацијску улогу, тако што промовишу миграцију и активацију неутрофила, појачавајући имунски одговор, док током касне фазе, MSCs постају имunosупресивне, инхибирају миграцију неутрофила и спречавају повреду ткива (222). Резултати *in vitro* и *in vivo* студија указују двоструки ефекат MSCs на преживљавање, пролиферацију, активацију В лимфоцита као и њихову диференцијацију у плазма ћелије (232, 233, 234). MSCs активирани преко TLR рецептора промовишу пролиферацију и диференцијацију наивних В лимфоцита у ћелије које продукују имуноглобулине (232). *Rasmussen* и сарадници су показали да од нивоа стимулације MSCs LPS-ом или вирусним антигенима зависи на који начин MSCs модулирају продукцију IgG у В лимфоцитима (233). Током бактеријске или вирусне инфекције MSCs значајно супримирају продукцију антитела у В лимфоцитима, међутим у условима када LPS, *Cytomegalovirus* или *Varicella zoster* вирус индукују слабији имунски одговор, MSCs стимулишу секрецију IgG (234).



Слика 8. Проинфламацијски ефекат мезенхималних матичних ћелија. У почетним фазама запаљења, у присуству ниских концентрација проинфламацијских цитокина (IFN- γ , TNF- α и IL-1 β) стичу проинфламацијски фенотип. (кориговано према: Gazdic M et al. *Stem Cell Rev* 2015; 11: 280-287).

У ткиву у коме је концентрација проинфламацијских цитокина висока, што се дешава у касним фазама запаљења, MSCs су антиинфламацијске, супримирају пролиферацију, активацију и ефекторске функције Т лимфоцита, ћелија које презентују антигене (дендритских ћелија, макрофага и В лимфоцита) и НК ћелија, што за последицу има репарацију ткива и успостављање хомеостазе (221). (Слика 9)



Слика 9. Имуносупресивно дејство MSCs на ћелије имунског система. У присуству високе концентрације IFN- γ и TNF- α или услед активације TLR3, MSCs стичу имуносупресивни фенотип (MSC2). (кориговано према: Gazdic M et al. *Stem Cell Rev* 2015; 11: 280-287).

1.7.1. Молекуларни механизми којима MSCs супримирају Т лимфоците

MSCs мењају фенотип и функције CD4⁺ помоћничких и CD8⁺ цитотоксичких Т лимфоцита (енгл. *cytotoxic T lymphocytes*, CTLs) директним међућелијским контактом као и паракриним механизмима (235, 236). Показано је да се у основи инхибиције пролиферације Т лимфоцита налази интеракција инхибиторног молекула PD-1 експримираног на MSCs са његовим лигандима PD-L1 и PD-L2 на лимфоцитима (191). MSCs не експримирају ко-стимулаторне молекуле CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2) на својој

мембрани, што за последицу има индукцију анергије Т лимфоцита (237). Најважнији солубилни фактори којим MSCs паракрино супримирају Т лимфоците су IDO и iNOS (238). IDO је ензим који разграђује есенцијалну аминокиселину триптофан до кинуренина и токсичних метаболита (хинолне и 3-хидрокси антранилне киселине) који смањују пролиферацију и индукују апоптозу Т лимфоцита. У реакцији коју катализује ензим iNOS из L-аргинина се синтетише NO. NO има кратак полу-живот и делује као сигнални молекул, тако што инхибира фосфорилацију Stat-5 молекула (енгл. *signal transducer and activator of transcription-5*) у Т лимфоцитима и на тај начин зауставља њихов ћелијски циклус (239, 240, 241). *Glennie* и сарадници су показали да MSCs снажном инхибицијом циклина-D2 и повећањем експресије инхибитора циклин-зависне киназе p27kip1 могу индуковати анергију Т лимфоцита (242).

Неколико судија је указало на важну улогу TGF- β (243, 244), HGF (243), PGE₂ (245, 246) и HO-1 (247, 248) у супресији пролиферације CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита (243). TGF- β инхибиторно делује на аутокрину активацију JAK-STAT сигналног пута интерлеукином-2 у Т лимфоцитима, чиме спречава експанзију Т лимфоцита и зауставља их у G1 фази ћелијског циклуса (249). Додатно, PGE₂ који продукују MSCs директно инхибира продукцију IL-2, као и експресију рецептора за IL-2 и JAK3 молекула у Т лимфоцитима (250). MSC-посредованој супресији пролиферације Т лимфоцита значајно доприноси и HO-1/CO, инхибицијом секреције IL-2 и инхибицијом ERK/MAP киназног сигналног пута (247, 248).

Осим имуносупресивних молекула које MSCs продукују конститутивно, познато је да при кокултивацији са Т лимфоцитима, MSCs продукују IL-10 (251) и LIF (252), што указује да је за испољавање неких имуномодулаторних својстава MSCs важан контакт са ћелијама имунског система. Активација *Toll-like* рецептора 2 (TLR-2) експримираних на MSCs стимулише продукцију галектина у MSCs (253). Галектин-1 и семафорин-3А инхибирају пролиферацију Т лимфоцита посредством неуропилина-1 (254).

Показано је да високе концентрације проинфламацијских цитокина TNF- α и IFN- γ поспешују продукцију свих поменутих имуносупресивних солубилних фактора у MSCs и тиме доприносе испољавају њихових имуномодулаторних својстава (255).

1.7.2. Значај интеракције MSCs и дендритских ћелија у инфламацији изазваној активацијом Т лимфоцита

Осим директним ефектом, MSCs могу да супримирају диференцијацију и ефекторске функције Th1, Th2 и Th17 лимфоцита и индиректно, утицајем на ћелије које презентују антигене (237, 256, 257). MSCs инхибирају диференцијацију моноцита и CD34⁺ прогенитора у дендритске ћелије (258). Дендритске ћелије ко-култивисане са MSCs заустављене су у G0/G1 фази ћелијског циклуса, услед нисходне регулације циклина D2 (259). Осим тога, дендритске ћелије настале у присуству MSCs су незреле и карактерише их одсуство експресије CD83, HLA-DR као и костимулаторних молекула CD40, CD80 и CD86 (260, 261). Незреле дендритске ћелије нису у стању да активирају Т лимфоците, већ их воде у анергију (258). *Djuad* и сарадници су показали да је IL-6 главни цитокин којим MSCs инхибирају сазревање дендритских ћелија (262), док је друга група аутора применом инхибитора синтезе PGE₂, NS-398, показала да PGE₂ има кључну улогу у овој интеракцији (263).

MSCs индукују настанак толерогених дендритских ћелија, које карактерише повећана продукција антиинфламацијског IL-10 и смањена продукција проинфламацијских TNF α , IFN- γ и IL-12 (245, 264). *Liu* и сарадници су показали, да у ко-култури са дендритским ћелијама, MSCs продукују IL-10, активирају JAK1-STAT3 сигнални пут и следствено инхибирају сазревање, секрецију IL-12 и способност дендритских ћелија да активирају Т лимфоците (265).

Директним међућелијским контактом и продукцијом PGE₂, MSCs инхибирају диференцијацију Th17 лимфоцита од наивних и меморијски прекурсора (257). Инхибиција Th17 фенотипа је праћена повећаном експресијом транскрипционог фактора FoxP3 и настанком IL-10⁺ Treg лимфоцита (266). Показано је да активацијом Notch1 сигналног пута лигандима (Jagged1, Jagged2 и Delta-Like (DLL) 1, 3 и 4) или продукцијом солубилних фактора HLA-G5, PGE₂ и TGF- β 1, MSCs промовишу настанак и експанзију CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg (267).

1.7.3. MSCs смањују цитотоксички потенцијал Т лимфоцита и NK ћелија

Недавним студијама је показано да се инхибиторни ефекат MSCs на цитотоксичност CTLs превасходно заснива на супресији пролиферације CTLs, а мање на директном инхибиторном ефекту на њихову цитотоксичку активност (268, 269). Директним

контактом, као и паракрино, продукцијом PGE₂, IDO и TGF-β, MSCs смањују експресију рецептора NKG2D на CD8⁺ Т лимфоцитима што спречава настанак ефекторских CTLs (269, 270).

Бројне студије су показале да при кокултивацији у односу 1:1 и 10:1, MSCs супримирају пролиферацију и продукцију IFN-γ у NK ћелијама (245, 271). Осим тога, активирани NK ћелије култивисане у присуству MSCs у трајању 4-5 дана имају мањи цитотоксички потенцијал (271, 272). Редукована цитотоксичност NK ћелија се објашњава инхибиторним ефектом PGE₂, IDO и TGF-β1 на експресију активационих NK рецептора (271, 273).

Једина до данас објављена студија у којој је испитана интеракција MSCs и NKT ћелија је показала да MSCs пореклом из костне сржи људи *in vitro* инхибирају експанзију NKT ћелија изолованих из периферне крви здравих давалаца, директним међућелијским контактом и секрецијом солубилних фактора (274). Међутим, утицај MSCs на фенотип и функцију NKT ћелија *in vivo* није разматран у претходно објављеним студијама.

1.7.4. Молекуларни механизми којим MSCs супримирају макрофаге

Активирани проинфламацијским сигнаlima, MSCs поларизују ткивне макрофаге из класичног M1 проинфламацијског фенотипа у анти-инфламацијски M2 фенотип (275). M2 макрофаге карактерише смањена фагоцитозна активност, повећана продукција имunosупресивног IL-10 и смањена продукција IL-12 и TNF-α (276, 277). MSCs узрокују поларизацију макрофага директним контактом као и секрецијом PGE₂, TSG-6, IL-6 и IDO (278, 279, 280, 281). Након стимулације MSCs медијаторима запаљења (IFN-γ, TNF-α и LPS), транскрипциони фактор NF-κB се транслоцира у једро MSCs, повећава експресију циклооксигеназе 2 (енгл. *cyclooxygenase 2*, COX2), и изазива секрецију PGE₂ (278). Секретовани PGE₂ се везује за простагландинске рецепторе EP2 и EP4 на макрофагима, индукује продукцију IL-10 у макрофагима и узрокује следствено смањење запаљења (278). У моделу перитонитиса који је изазван зимозаном је показано да на присуство TNF-α пореклом из макрофага у ткивној микросредини, MSCs одговарају секрецијом TSG-6 који се везује за CD44 на макрофагима што узрокује инхибицију TLR2/NFκ-B сигналног пута и супримира даљу секрецију проинфламацијских медијатора (279). *Melief* и сарадници су забележили да MSCs у кокултури са моноцитима секретују IL-6, који фаворизује диференцијацију

моноцита у антиинфламацијске IL-10⁺ ћелије (280). Неутрализацијом IL-6 у кокултури, инхибиторни ефекат MSCs се изгубио (280).

IFN- γ и TNF- α присутни у инфламираном ткиву, стимулишу MSCs да секретујуIDO, који разграђује триптофан из микроокружења до кинуренина. Кинуренин директно супримира пролиферацију Т лимфоцита или делује индиректно, тако што усмерава диференцијацију ка IL-10⁺ CD206⁺ M2 макрофагима (281). Настали имуносупресивни M2 макрофаги продукују CCL18 и IL-10, и синергистички са имуносупресивним PGE₂ и TGF- β пореклом из MSCs, промовишу експанзију Treg лимфоцита (282, 277).

1.7.5. Молекуларни механизми којим MSCs супримирају В лимфоците

Показано је да MSCs супримирају продукцију антитела као и пролиферацију активираних В лимфоцита (283, 284). MSCs секретују CCL2 који инактивира STAT3 и индукује експресију *paired box protein 5* (PAX5) у плазма ћелијама што за последицу има смањење продукције антитела (285).

Tabera и сарадници су показали да MSCs инхибирају фосфорилацију ERK1/2 и индукују активацију p38 MAPK у В лимфоцитима што зауставља ћелијски циклус В лимфоцита у G0/G1 фази (283). Супресија пролиферације и апоптоза В лимфоцита су често индуковани токсичним метаболитима триптофана насталим активношћу ензима IDO који продукују MSCs (272, 284).

MSCs смањују експресију хемокинских рецептора CXCR4, CXCR5 и CCR7, а тиме и капацитет миграције наивних и активираних В лимфоцита (284). Иако је показано да MSCs супримирају експресију CD80 и CD86 на дендритским ћелијама (260, 261), експресија ко-стимулаторних молекула на В лимфоцитима се не мења при кокултивацији са MSCs (284).

1.8. ИМУНОМОДУЛАТОРНИ ЕФЕКАТ MSCs У АКУТНОМ ХЕПАТИТИСУ

Механизам акутног оштећења јетре може се поделити на две фазе. У првој, микроорганизми или токсини директно оштећују ћелијске органеле и активирају сигналну каскаду која нарушава унутарћелијску хомеостазу. У другој фази, у циљу спречавања прогресије оштећења ткива, развија се имунски одговор и инфламација у јетри. Сви поменути механизми, укључујући различите путеве смрти ћелија јетре попут апоптозе, аутофагије, некрозе и некроптозе, заједно са осталим

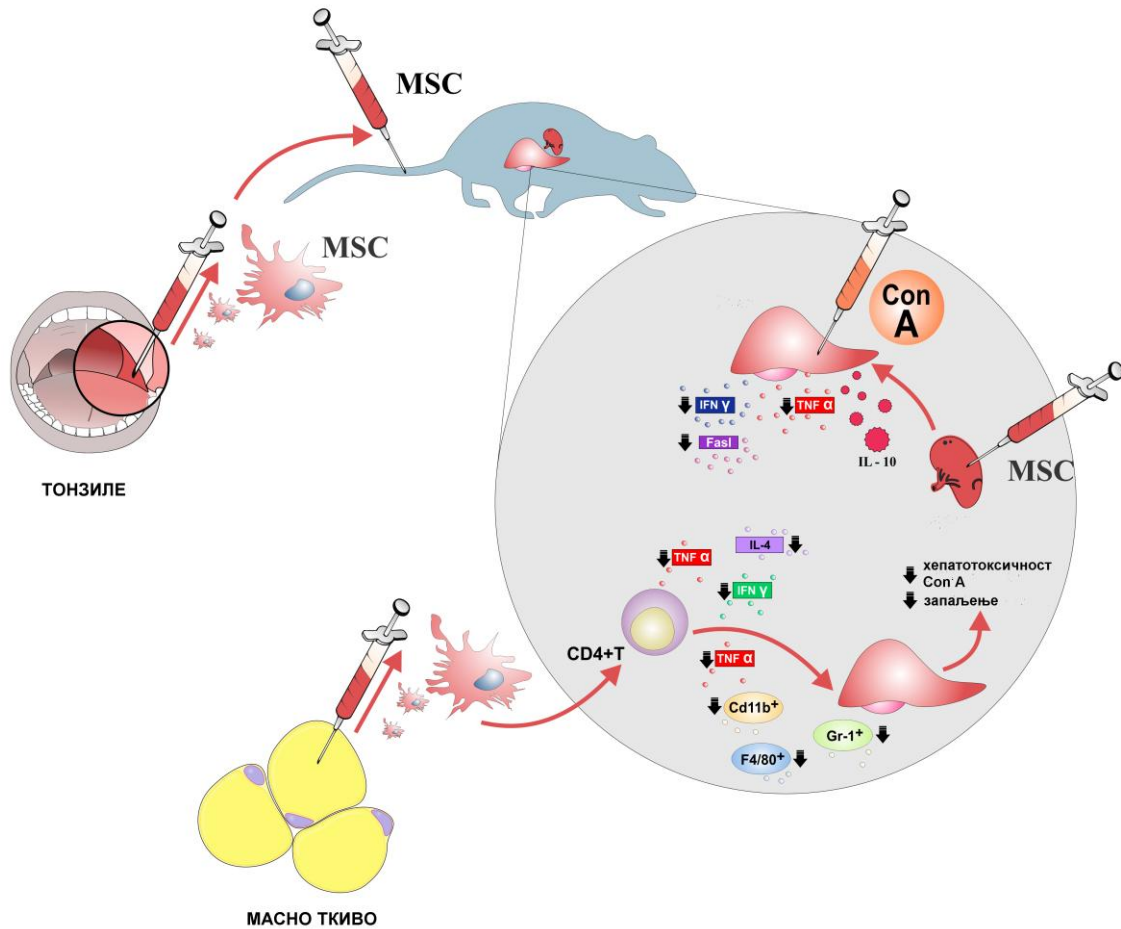
патофизиолошким процесима, узрокују оштећење јетре у коме важну улогу играју имунски механизми (286).

У циљу проучавања механизма акутног оштећења јетре успостављени су бројни анимални модели хепатитиса који се експерименталним животињама изазивају хемијским супстанцама, метаболитима, инфективним агенсима или различитим хируршким процедурама. С обзиром на то да по својим карактеристикама одговара акутном, фулминантном хепатитису људи, акутно оштећење јетре мишева изазвано применом Con A сматра се добрим моделом за анализирање иницијалних имунских механизма важних за развој оштећења јетре узрокованог активацијом Т лимфоцита (287, 288, 289, 290). CD4⁺ Т лимфоцити инфилтришу ткиво јетре и секретују високе концентрације цитокина TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-6 и GM-CSF (288). Осим CD4⁺ лимфоцита, директним међућелијским контактом, секрецијом проинфламацијских цитокина или реактивних кисеоничних радикала, смрт хепатоцита индукују и остале ћелије имунског система: CD8⁺ Т лимфоцити, NK, NKT ћелије и макрофаги (287, 288, 290).

У студијама у којима је применом Con A изазвано оштећење јетре, мишевима су успешно трансплантиране MSCs, након чега је забележено смањење биохемијских и патохистолошких параметара оштећења јетре, а уочена је и значајно мања продукција проинфламацијских цитокина IFN- γ и TNF- α (291, 292). За разлику од IFN- γ који води хепатоците у апоптозу посредством Fas рецептора, TNF- α се везује за TNF рецептор и изазива апоптозу хепатоцита активацијом каспазе 8, што за последицу има ослобађање митохондријалног цитохрома c и активацију каспазе 3 (293, 294). Стога инхибиторни ефекат MSCs на продукцију поменутих проинфламацијских цитокина, делимично објашњава смањену апоптозу хепатоцита и синусидалних ендотелних ћелија, једног од главних механизма оштећења паренхима јетре у овом моделу (290).

Интраспленичка апликација MSCs значајно смањује оштећење јетре у мишева са хепатитисом изазваним применом Con A, на тај начин што повећава експресију хепатопротективног IL-10 у јетри и смањује експресију TNF- α , IFN- γ и FasL у лимфоцитима и Купферовим ћелијама (295). Zhu и сарадници су показали да трансплантиране MSCs свој имуномодулаторни ефекат осим локално остварују и системски, значајно смањујући број активираних циркулишућих лимфоцита и концентрацију TNF- α , IFN- γ и IL-4 у серуму (292). Ryu и сарадници су показали да MSCs изоловане из тонзила (T-MSCs) секретују галектин-1 који инхибира продукцију

проинфламацијских цитокина у Т лимфоцитима и ствара имunosупресивно окружење у јетри Con A-третираних мишева (296). (Слика 10)



Слика 10. Трансплантација MSCs у моделу акутног оштећења јетре. MSCs изоловане из различитих ткива делују протективно у експерименталном акутном хепатитису на тај начин што смањују број главних ефекторских ћелија у инфламацији у јетри ($CD4^+$ Т лимфоцита, $Gr-1^+$ неутрофила и $CD11b^+$ $F4/80^+$ макрофага). MSCs стимулишу продукцију хепатопротективног IL-10 и супримирају експресију TNF- α , IFN- γ , IL-4 и FasL у $CD4^+$ лимфоцитима и Купферовим ћелијама. (кориговано према: Gazdic M et al. *Int J Biol Sci.* doi:10.7150/ijbs.20240).

Поред NKT ћелија које се представљају главне ефекторске ћелије у патогенези акутног хепатитиса, Купферове и дендритске ћелије такође играју важну улогу у развоју инфламацијског одговора у јетри (297). Стога се сматра да имуномодулаторни ефекат MSCs на фенотип и функције ћелија које презентују антигене у јетри може имати терапијски учинак у обољењима овог органа. *Higashimoto* и сарадници су показали да се имunosупресивни ефекат MSCs пореклом из масног ткива у моделу акутног хепатитиса примарно заснива на супресији ћелија мијелоидне лозе и $CD4^+$ Т

лимфоцита (298). Трансплантација MSCs изолованих из масног ткива је редуковала број CD11b⁺, Gr-1⁺ и F4/80⁺ ћелија у јетри мишева којима је хепатитис изазван применом Con A (213). Експресија TNF- α , IL-10 и CXCL10 у CD4⁺ Т лимфоцитима и CD11b⁺ ћелијама је била значајно смањена, као и IFN- γ , IL-4 и CXCL9 у CD4⁺ Т лимфоцитима, али не и у CD11b⁺ ћелијама (298).

У складу са ефектима примене MSCs у Con A-индукованом оштећењу јетре, Zhang и сарадници су показали да MSCs значајно редукују оштећење хепатоцита и морталитет мишева којима је хепатитис изазван апликацијом LPS-а, тако што инхибирају Th1 и фаворизују настанак Treg фенотипа (299). Смањење клиничких знакова и прогресије болести је последица диференцијације CD11c⁺B220⁻ прекурсора дендритских ћелија у дендритске ћелије регулаторног фенотипа CD11c⁺MHCII^{hi}CD80^{lo}CD86^{lo} услед везивања PGE₂ који секретују MSCs за EP4 рецептор и следствене активације PI3K/ERK 1/2 сигналног пута (299). Регулаторне дендритске ћелије продукују TGF- β и IL-10 којима индукују настанак регулаторног фенотипа Т лимфоцита у јетри (299).

Резултати претходно споменутих као и неколико недавно објављених студија указују да солубилни фактори које секретују MSCs, односно кондиционирани медијум генерисан од MSCs (MSC-CM), могу бити допунско терапијско средство али и алтернатива трансплантацији MSCs у акутном оштећењу јетре у ком значајну улогу играју имунски механизми (300, 301, 302). Апликација имуномодулаторних молекула које продукују MSCs, како у болусу MSC-CM тако и екстракорпорално путем биореактора, значајно повећава преживљавање мишева којима је индукован експериментални хепатитис хепатотоксином D-галактозамином (енгл. *D-galactosamine*, Gal-N) (300). MSC-CM значајно смањује панлобуларни леукоцитни инфилтрат и некрозу ћелија јетре (300). Такође, након адоптивног трансфера леукоцита, компјутеризованом томографијом је показано да MSC-CM преусмерава ћелије имунског система из повређеног органа, односно да је смањено присуство имунских ћелија у јетри вероватно последица модулације њихове миграције убризганим MSC-CM (300). Van Poll и сарадници су потврдили да системска апликација MSC-CM повећава преживљавање пацова и превенира ослобађање биохемијских маркера оштећења ткива јетре у моделу фулминантног хепатитиса (301). MSC-CM за око 90% смањује апоптозу хепатоцита, подстиче регенерацију у јетри тако што повећава број хепатоцита који пролиферишу (301).

У моделу акутног оштећења јетре које је изазвано угљен тетрахлоридом (CCl₄), Xagorari и сарадници су показали да MSC-CM смањује апоптозу ћелија јетре

посредством IL-6 и FGL-1 (302). Међутим, у моделу фулминантног хепатитиса који је изазван тиаоацетамидом (ТАА), за разлику од трансплантираних MSCs које су промовисале пролиферацију и инхибирале апоптозу хепатоцита супресијом инфилтрације јетре F4/80⁺ макрофагима и конверзијом CD4⁺ Т лимфоцита у антиинфламаторни фенотип, апликација MSC-СМ није имала значајан хепатопротективни ефекат (303). Инфузија MSC-СМ је само делимично редуковала оштећење јетре, али није значајно смањила морталитет експерименталних животиња (303). Ови резултати су подржали теорију да за разлику од MSC-СМ, трансплантиране MSCs мигрирају у оштећени орган у ком интерагују са ћелијама имунског система и током првих сати након оштећења јетре испољавају свој имуносупресивни потенцијал директним утицајем на циљне ћелије или паракрино- континуираном секрецијом солубилних медијатора (303).

2. ЦИЉ РАДА

Основни циљ овог истраживања је да се испита утицај MSCs на патогенезу акутног оштећења јетре узрокованог активацијом NKT ћелија.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. Биохемијским тестовима и квантитативном хистологијом утврдити утицај MSCs на акутно оштећење јетре изазвано конканавалином А или α -галактоцерамидом.
2. Испитати утицај MSCs на фенотип и функције ћелија имунског система у ткиву јетре.
3. Испитати утицај MSCs на цитокински профил у моделима фулминантног хепатитиса.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. ЋЕЛИЈСКА ЛИНИЈА МИШЈИХ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА

У експериментима је коришћена комерцијална линија мишјих мезенхималних матичних (енгл. *mouse mesenchymal stem cells*, mMSCs) ћелија изолованих из костне срже C57Bl/6 мишева (кат. број S1502-100, *Gibco/Invitrogen*). Ћелије су култивисане у DMEM медијуму (енгл. *Dulbecco's Modified Eagles Medium*) са додатком 10% феталног телећег серума (FBS, енгл. *Fetal Bovine Serum*), 2 mmol/l L-глутамин, 1 mmol/l пеницилин/стрептомицин, 1 mmol/l не-есенцијалних аминокиселина (Sigma-Aldrich, Munich, Germany). Ћелије су узгајане у асептичним условима у инкубатору на температури од 37°C и у присуству 5% CO₂. У експериментима су коришћене ћелије у четвртој пасажи.

Непосредно пре *in vivo* и *in vitro* експеримената, ћелије су одвајане са дна флашка (са ~80% конфлуентним ћелијама) краткотрајним третирањем раствором 0.25% трипсина и 0.02% EDTA (енгл. *ethylenediaminetetraacetic acid*) (PAA Laboratories GmbH) раствореног у PBS-у (енгл. *Phosphate Buffered Saline*, PAA Laboratories GmbH) у трајању 2 минута. Како би се неутралисало даље дејство трипсина, ћелије су најпре ресуспендоване у 6 ml DMEM-а са додатком 10% FBS-а и центрифугиране на 300 g 5 минута. Након одливања супернатанта, ћелије су испиране два пута у чистом DMEM-у. Вијабилност ћелија је одређена помоћу *trypan-blue*-а и само она ћелијска суспензија која садржи више од 95% вијабилних ћелија је коришћена у експериментима.

3.2.ЋЕЛИЈСКА ЛИНИЈА ХУМАНИХ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА

Хумане мезенхималне матичне ћелије (енгл. *human mesenchymal stem cells*, hMSCs), изоловане из масног ткива људи, добијене су у лабораторији за матичне ћелије Департмана за биомедицинске науке Државног универзитета у Новом Пазару (304). Изоловане ћелије су показале адхерентност, способност пролонгираног пасажирања (преко 50 пасажа), клонотипску пролиферацију, формирање CFU-F (енгл. *Colony-forming unit-fibroblast*) и мултипотентну диференцијацију *in vitro* у ћелије мезодерма (остеогена, хондрогена и адипогена диференцијација). Имунофенотипском анализом показано је одсуство маркера CD34 и CD106 и присуство CD29, CD73 и CD90 на

мембрани изолованих ћелија. hMSCs су култивисане у комплетном DMEM медијуму који садржи L-глутамин (200 mM), неесенцијалне аминокиселине (10 x), 1% пеницилин/стрептомицина (100 x) и 10% FBS. Медијум у коме су расле ћелије је мењан сваки трећи дан.

3.3. ЋЕЛИЈСКА ЛИНИЈА ХУМАНОГ КАРЦИНОМА ЈЕТРЕ (HepG2)

У тестовима цитотоксичности коришћена је HepG2, ћелијска линија хуманог карцинома јетре (American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA; HB-8065). Ова линија је добијена из хепатоцелуларног карцинома јетре адолесцента узраста 15 година. Туморске ћелије HepG2 су култивисане у DMEM медијуму који садржи 10% FBS-а и инкубиране у атмосфери 5% CO₂, засићеној воденом паром на температури 37°C.

3.4. ИЗОЛАЦИЈА МИШЈИХ ХЕПАТОЦИТА

Хепатоцити су изоловани из јетри мишева према претходно описаном протоколу (289). Перфузија јетре кроз *v. porta*-е у трајању од 15–20 минута је прво спроведена применом Т1 раствора (0.9 % NaCl, 0.05 % KCl, HEPES 0.2 %, 0.08 mg/ml EGTA, pH 7.4) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), а затим применом Т2 раствора (0.6 % NaCl, 0.05 % KCl, 1.2 % HEPES, 0.07 % CaCl₂, 3 g/ml collagenase Type I, pH 7.4) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Извађена јетра је механички уситњена скалпелом, након чега је уситњено ткиво ресуспендовано у 2 ml DMEM-а (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), пропуштено кроз 70-µm ћелијско сито (енгл. *cell strainer*, BD Pharmingen, USA) и центрифугирано 600 rpm 4 минута. Добијени талог је ресуспендован у 3 ml DMEM-а, пребачен на 30 ml 37.5 % Percoll-а, и центрифугиран 1,050 rpm 3 минута. Коначно, ћелије су ресуспендоване у 2 ml DMEM-а и вијабилни хепатоцити су пребројани.

3.5. ИНХИБИЦИЈА ИНДОЛАМИН-2, 3 ДИОКСИГЕНАЗЕ

У експериментима у којима је испитивано да ли је IDO један од медијатора којим MSCs супримирају хепатитис узрокован активацијом NKT ћелија, коришћен је фармаколошки инхибитор IDO-а, 1-метил DL триптофан (1-MT, 860646, *Sigma-Aldrich, St-Louis, MO*). 1-MT је рацемска смеша два стереоизомера, *levo*-1-метил триптофана, који конкуритивно инхибира IDO1 и *dextro*-1-метил триптофана који конкуритивно

инхибира IDO2. 1-MT је најпре растворен у 0.1 N NaOH чиме је направљен 1 mM шток. pH је коригована применом хлороводоничне киселине до 7.5. mMSCs односно hMSCs су култивисане у медијуму са додатком 1-MT (1 mM) у трајању од 48 h (305).

3.6. ИНХИБИЦИЈА ИНДУЦИБИЛНЕ АЗОТ ОКСИД СИНТАЗЕ

L-N^G-монометил аргинин цитрат (енгл. *L-N^G-monomethyl Arginine citrate*, L-NMMA) је неселективни инхибитор ензима iNOS, који је коришћен у циљу испитивања механизма имуномодулаторног утицаја MSCs на NKT ћелије. L-NMMA (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) је најпре растворен у 1ml дестиловане воде до финалне концентрације 5mg/ml, након чега је iNOS блокирана култивацијом mMSCs односно hMSCs у трајању од 48 h у медијуму у присуству 1 mM L-NMMA (224).

3.7. КОНДИЦИОНИРАНИ МЕДИЈУМ ГЕНЕРИСАН ОД MSCs

У циљу добијања кондиционираног медијума, mMSCs односно hMSCs су засејане у густини 10 000 ћелија/cm² и култивисане у посудама за културу ћелија- T₇₅ фласковима (BD Falcon) у комплетном DMEM медијуму који садржи серум у стриктно асептичним условима у атмосфери 5% CO₂, на температури 37°C. При постизању конfluентног стања ~80%, ћелије су опране PBS-ом (Invitrogen), а медијум у коме су расле је замењан медијумом који не садржи серум. Након 48h, медијум означен као "MCS-кондиционирани медијум" (MCS-CM) је сакупљен, центрифугиран 13 000×g на 4°C у трајању од 10 минута и замрзнут на -80°C до извођења анализе (306).

Како би се одредио тачан механизам којим mMSCs супримирају акутно оштећење јетре узрокованом активацијом NKT ћелија, C57BL/6 мишеви су груписани случајним узорковањем у четири експерименталне групе и једну контролну групу. Мишеви прве експерименталне групе су интравенски примили само α-GalCer, мишеви друге експерименталне групе су непосредно након α-GalCer, интравенски примили 200 μl mMSC-CM, мишеви треће експерименталне групе су непосредно након апликације α-GalCer, интравенски примили 200 μl mMSC-CM у који је додат 1mM 1-MT, док су мишеви четврте групе након апликације α-GalCer, интравенски примили 200 μl mMSC-CM у који је додат 1mM L-NMMA. Мишеви контролне групе су интравенски примили само 200 μl NaCl-а. За процену степена оштећења јетре животиње су жртвоване након

16 сати. Јетре су изоловане за патохистолошку анализу, а пункцијом абдоминалне аорте крв је сакупљена за биохемијску анализу.

NKT ћелије, стимулисане α -GalCer-ом (100ng/ml), су култивисане 48h у пластичним флашковима на 37°C, у атмосфери засићеној воденом паром са 5% CO₂ у MSC-СМ у одсуству или присуству 1-МТ (1mM) односно L-NMMA (1mM). По истеку култивације, NKT ћелије су сакупљене и анализирана им је цитотоксичка активност у реалном времену помоћу xCELLigence система. Супернатанти у којима су ћелије култивисане су сакупљени и смрзнути на -20°C у циљу одређивања концентрације цитокина.

α -GalCer-ом стимулисане мононуклеарне ћелије изоловане из венске крви здравих давалаца (енгл. *Peripheral Blood Mononuclear Cell*, PBMNC) (100ng/ml) су култивисане у hMSC-СМ у одсуству или присуству 1-МТ (1mM) односно L-NMMA (1mM), у трајању од 48 h. По истеку инкубације, у супернатантима је мерена концентрација цитокина, док су ћелије коришћене у тесту цитотоксичности.

3.8. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ

Истраживање је спроведено на 8 до 10 недеља старим мужјацима, чистог соја C57BL/6 (енгл. *wild type*) мишева. У студију су укључене животиње усклађене старости и телесне масе између експерименталних група. Мишеви су одгајани у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Током трајања експеримента животиње су имале слободан приступ храни и води.

Спроведено истраживање одобрила је Етичка комисија за експерименталне животиње Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу број 01-5865 од 02.06.2015. године.

3.9. ИНДУКЦИЈА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ ФУЛМИНАНТНОГ ХЕПАТИТИСА КОНКАНАВАЛИНОМ А

Интравенска апликација Con A, у року од 24 сата, узрокује тешко, акутно оштећење јетре мишева посредовано имунским механизмима, које по својим карактеристикама одговара акутном, фулминантном хепатитису људи (162). Con A (кат. број C5275, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) је најпре растворен у 1 mL 0.9% NaCl, до финалне концентрације 5mg/mL. У циљу изазивања експерименталног модела фулминантног

хепатитиса (тзв. Con A индукованог хепатитиса), сви мишеви који су претходно насумично сврстани у експерименталне групе, интравенски су примили Con A у дози 12 mg/kg ТТ, растворен у физиолошком раствору (0.9% NaCl). Мишевима је интравенски апликовано по 250µL раствореног Con A (Con A група) (287).

3.10. ИНДУКЦИЈА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ ФУЛМИНАНТНОГ ХЕПАТИТИСА α -ГАЛАКТОЦЕРАМИДОМ

За разлику од Con A који је поликлонални активатор лимфоцита, α -GalCer индукује специфичну и снажну активацију NKT ћелија (307). Због тога α -GalCer-ом индуковано оштећење јетре мишева представља добар експериментални модел за проучавање интеракције MSCs и NKT ћелија *in vivo*. α -GalCer (кат. број 67576, *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) је растворен у 5.6% сукрози, 0.75% L-хистидину и 0.5% Tween-20, до финалне концентрације 500 µM и загрејан на 60-80°C у трајању од неколико минута. У циљу изазивања α -GalCer хепатитиса, сви мишеви који су претходно насумично сврстани у експерименталне групе, интравенски су примили α -GalCer у дози 50µg/kg ТТ, растворен у 200µL 0.9% NaCl (α -GalCer група).

3.11. АПЛИКАЦИЈА mMSCs

Непосредно након примене Con A односно α -GalCer мишевима су трансплантиране mMSCs у латералну репну вену, у дози од 5×10^5 ћелија ресуспендованих у 200 µl NaCl-а. Животиње из контролних група примиле су само 5×10^5 mMSCs ресуспендованих у 200 µl NaCl односно само 200 µl NaCl-а.

За процену степена оштећења јетре рађене су биохемијске и патохистолошке анализе.

3.12. ДЕТЕКЦИЈА ТРАНСПЛАНИРАНИХ mMSCs У ЈЕТРИ МИШЕВА

mMSCs су обележене флуоресцентном бојом карбоксифлуоресцин диацетат сукцинил естром (CFSE; Molecular Probes) према упутству произвођача (308). 5×10^5 флуоресцентно обележених mMSCs је трансплантирано интравенски путем латералне репне вене мишевима непосредно након апликације ConA односно α -GalCer-а. Мононуклеарне ћелије изоловане из јетри експерименталних животиња 8 h после Con A, односно 2 h после примене α -GalCer-а су анализирани проточном цитометријом.

3.13. ДЕПЛЕЦИЈА РЕГУЛАТОРНИХ ЛИМФОЦИТА

Да би се испитао значај регулаторних лимфоцита за имуносупресивни ефекат mMSCs у акутном оштећењу јетре које је изазвано активацијом NKT ћелија, мишевима су деплетирани регулаторни Т односно регулаторни В лимфоцити. За деплецију Treg лимфоцита коришћен је циклофосфамид (енгл. *cyclophosphamide*, CY), (Galenika A.D., Београд, Србија) који је мишевима апликован интраперитонеално у дози 10 mg/kg ТТ, 3 дана пре апликације α -GalCer-a (297). Vreg лимфоцити су деплетирани интраперитонеалном применом анти- CD20 антитела (Clone 5D2, Genentech, Inc., San Francisco, CA), у дози 10 mg/kg ТТ (157).

3.14. БИОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ОШТЕЋЕЊА ЈЕТРЕ

Мишеви су жртвовани 24 сата након интравенске примене Con A, односно 16 сати након интравенске апликације α -GalCer-a у атмосфери засићеној диетилетром (BETA НЕМ, Београд). Крв је сакупљена пункцијом абдоминалне аорте. Након коагулације 30 минута на собној температури, серум је изолован центрифугирањем (20 минута на 3000 rpm) ради одређивања трансминаза. Трансминазе су мерене на апарату Olympus AU 400 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Germany), а коришћењем Olympus AU reagents китова за мерење АСТ и АЛТ (Thermo Infinity AST(GOT) Liquid Stable Reagent & Thermo Infinity ALT(GPT) Liquid Stable Reagent for Olympus AU400/AU600/AU640/AU2700/AU5400 analysers) у складу са препоруком произвођача и раније публикованим протоколима (309, 310).

3.15. ПАТОХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА

Мишеви су жртвовани 24 сата након интравенске примене Con A, односно 16 сати након интравенског давања α -GalCer-a, након чега су им јетре изоловане за патохистолошку анализу.

3.15.1. Израда патохистолошких препарата

Непосредно након изолације, ткиво јетре је фиксирано у 10% раствору формалдехида на собној температури. Волумен фиксатива је био 10 пута већи од волумена ткива. Обрађено ткиво је укалупљено у парафинске блокове и помоћу микротоме су исечени

резови дебљине 5 μm . Пресеци су нанешени на предметна стакла, а затим бојени одговарајућом техником.

3.15.2. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)

Парафински исечци су претходно загрејани у термостату на $+56^{\circ}\text{C}$ у трајању од 45 минута. Затим су депарафинисани у ксилолу и урађен је поступак рехидратације ткива испирањем у опадајућим концентрацијама етил алкохола: 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, потом 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води. Препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10 минута а затим су испрани дестилованом, а потом и текућом водом 5 минута. Препарати су затим бојени алкохолним еозином (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 2 минута. Након бојења ткиво је дехидратисано и просветљено у ксилолу. За процес дехидратације коришћене су растуће концентрације алкохола и то: 5 минута у 70% алкохолу, затим 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и на крају 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након бојења и поступка дехидратације, добијени препарати су просветљени потапањем 1 минут у мешавини ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1, а потом 2 пута по 1 минут само у ксилолу. Ткивни исечци су прекривени канада балзамом (Canada balsam, Centrohem, Србија) и покровним стаклима. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани под светлосним микроскопом (Olympus, Japan).

3.16. ИЗОЛАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА ИЗ ЈЕТРЕ

Сви мишеви којима су изоловане мононуклеарне ћелије из јетре су жртвовани 8 сата након интравенске примене Con A, односно 2 сата након интравенске примене α -GalCer-a.

Након што је извађена јетра и уклоњена жучна кеса, урађена је перфузија јетре апликовањем 7 mL PBS-а кроз *v. porta-e*. Јетру је уситњена маказицама и нежно, „полугом” шприца, здробљена кроз 200 μm челичну мрежу, а затим је ћелијска суспензија пропуштена кроз ћелијско сито. Добијени садржај је ресуспендован у 50 ml RPMI-1640 медијума (који садржи GlutaMax 1,25mM, HEPES и 10% FBS) и центрифугиран на 507 rpm. (60g) 1 минут на собној температури, без наглог заустављања центрифуге (енгл. *off break setting*). Супернатант (45 ml), који је садржао интрахепатичне ћелије, је пребачен у нову епрувету и центрифугиран на 1433 rpm. (480

g) 8 минута на собној температури, са активираном опцијом наглог кочења (енгл. *high break setting*). Добијени талог ресуспендован је у 10 ml 37.5% Percoll-а у HBSS медијуму који је садржи 100 U јединица хепарина по ml и онда центрифугиран на 1907 rpm. (850 g) 30 минута на собној температури, без наглог заустављања центрифуге. Овако добијени талог ресуспендован је у 5 ml пуфера за лизирање еритроцита (енгл. *Er Lysing buffer*). Уследила је инкубација ћелија у 5 ml lysing раствора у трајању од 5 минута, на леду (на +4°C). Након истека инкубације, додато је 5 ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом чиме је заустављено даље лизирање. Након тога ћелије су центрифугиране на 1433 rpm. (480 g) 8 минута на 8 C, са активираном опцијом наглог кочења. Коначно, добијени талог ресуспендован је или у 1ml PBS-а који садржи 1% FBS односно 0,1% NaN₃ (тзв. пуфер за анализу проточном цитометријом, енгл. *FACS buffer*) или у 1ml комплетног RPMI-1640 медијума (који садржи GlutaMax 1,25mM, HEPES i 10% FBS).

3.17. АНАЛИЗА ПОПУЛАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА ЈЕТРЕ ПРОТОЧНОМ ЦИТОМЕТРИЈОМ

Применом проточне цитометрије одређиван је релативни и апсолутни број инфламацијских ћелија: NKT ћелија, CD4⁺, CD8⁺ Т лимфоцита, В лимфоцита, макрофага и дендритских ћелија.

Анализа је рађена на инфламацијским ћелијама свеже изолованим из ткива јетре. Након изолације, приликом бројања ћелија, одређивана је вијабилност ћелија помоћу *trypan-blue*-а под светлосним микроскопом. У свим експериментима вијабилност ћелија је износила 90% до 95%.

3.17.1. Бојење мембранских маркера

У техници бојења мембранских маркера за фенотипизацију и одређивање функционалног фенотипа популације инфламацијских ћелија јетре примењена су анти-мишија моноклонска антитета различите специфичности (Табела 1).

Табела 1. Моноклонска антитела коришћена у проточној цитометрији

Специфичност антитела	Обележивач	Клон	Изотип	Произвођач	CAT
CD4	Alexa Fluor® 488	RM4-5	IgG2a, κ	BD Pharmingen	557667
CD4	PerCp	RM4-5	Rat IgG2a, κ	BD Pharmingen	553052
CD25	FITC	7D4	Lewis IgM, κ	BD Pharmingen	553072
IL-4	PE	BVD4- 1D11	Rat IgG2b	BD Pharmingen	554389
CD11c	PerCp	N418	Armenian Hamster IgG	Molecular probes	A14788
F4/80	FITC	BM8	Rat IgG2a	Invitrogen	MF48020
CD11b	PerCp	M1/70	Rat IgG2b	Molecular probes	A14787
I-A	PE	AF6- 120.1	IgG2a, κ	BD Pharmingen	553552
IL-12 (p40/p70)	PE	C15.6	Rat IgG1	BD Pharmingen	554479
IL-10	PE	JES5- 16E3	Rat IgG2b	BD Pharmingen	554467
IL-10	APC	JES5- 16E3	IgG2b	BD Pharmingen	554468
IFN-γ	APC	XMG1.2	IgG2a, κ	eBioscience	17-7311-82
TNF-α	APC	MP6- XT22	IgG1	BD Pharmingen	554420
TGF-β	APC	860206	Rat IgG2A	R&D Systems	FAB8118A
CD11c	PE	N418	Hamster IgG	Molecular probes	MCD11c04
CD8a	APC	53-6.7	Rat (LOU) IgG2a, κ	BD Pharmingen	553035
CD80	PE	16-10A1	Armenian Hamster IgG2, κ	BD Pharmingen	553769
CD86	APC	GL1	IgG2a, κ	BD Pharmingen	558703
CD19	PE	1D3	IgG2a, κ	BD Pharmingen	553786
CD107a	PE	1D4B	IgG2a, κ	BD Pharmingen	560647

Специфичност антитела	Обележивач	Клон	Изотип	Произвођач	CAT
KLRG1	PE	2F1	IgG	eBioscience	12-5893-82
NKG2D	PE	C7	IgG	eBioscience	16-5873-82
Granzyme B	PE	NGZB	Rat IgG2a, κ	eBioscience	12-8898-80
Perforin	APC	eBioOM AK-D	Rat IgG2a, κ	eBioscience	17-9392-80
Fas Ligand (CD178)	FITC	MFL3	Armenian hamster / IgG	eBioscience	11-5911-80
TRAIL (CD253)	PE	N2B2	Rat IgG2a, κ	eBioscience	12-5951-81
T-bet	PE	4B10	IgG1, κ	eBioscience	12-5825-80
Gata-3	PE	TWAJ	Rat IgG2b, κ	eBioscience	12-9966-41
CD23	FITC	B3B4	Rat (LOU) IgG2a, κ	BD Pharmingen	553138
CD21	PerCp	7G6	Rat IgG2b, κ	BD Pharmingen	562797
IgM	FITC	II/41	Rat IgG2a, κ	BD Pharmingen	553437
CD5	PE	53-7.3	Rat (LOU) IgG2a, κ	BD Pharmingen	553023
CD1d	FITC	1B1	Lewis IgG2b, κ	BD Pharmingen	561756
CD49b	PerCp	HMα2	Armenian Hamster IgG	Biolegend	103519

На 1×10^6 ћелија изолованих из јетре ресуспендованих у 50μl пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*; BD) додата је одговарајућа количина примарно коњугованих моноклонских антитела специфичних за површинске антигене различитих субпопулација моноклеарних ћелија јетре (Табела 1). Ћелије изоловане из ткива јетре су инкубиране и са одговарајућим изотипским контролама (Табела 2). Сва антитела за површинско бојење, као и изотипске контроле коришћене су у таквим концентрацијама да њихова финална разблажења у суспензији ћелија буду 1:100. Ћелије су инкубиране 30 минута у мраку на температури +4°C. По истеку инкубације, ћелије су опране додавањем 2ml хладног пуфера за бојење. Након тога, ћелије су

центрифугиране 5 минута на 250g. После центрифугирања одливан је супренатант и талог ћелија ресуспендован у 250µl пуфера за бојење. Непосредно након процедуре бојења, експресија маркера на ћелијама је анализирана на проточном цитометру FACSCalibur (BD) помоћу CELLQUEST софтвера (BD). Граничник (енгл. *gate*), је направљен у FSC/SSC плоту као регион вијабилних моноклеарних ћелија. Регистровано је најмање 10 000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу CELLQUEST (BD) и *FlowingSoftware* 2.5.1.

Табела 2. Изотипске контроле моноклонских антитела коришћених у проточној цитометрији

Назив антитела	Обележивач	Клон	Изотип	Произвођач	CAT
PE Rat IgG2a, κ Isotype Control	PE	R35-95	Rat (LOU) IgG2a, κ	BD Pharmingen	554689
PerCP/Cy5.5 Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody	PerCP	MOPC-21	Mouse IgG1, κ	BioLegend	400150
APC Mouse IgG2a, κ Isotype Ctrl	APC	MOPC- 173	Mouse IgG2a, κ	BioLegend	400220
FITC Mouse IgG2a, κ Isotype Control	FITC	G15-178	Mouse IgG2a, κ	BD Pharmingen	53456

3.17.2. Интрацелуларно бојење цитокина

Интрацелуларно бојење цитокина је изведено по BD *Cytofix/Cytoperm*™ методи. У овом истраживању ћелије су стимулисане форбол 12-миристанат 13-ацетатом (*PMA*, енгл. *Phorbol 12-myristate 13-acetate*; Sigma Aldrich) и јономицином (енгл. *Ionomycin*; Sigma Aldrich), који покрећу активност протеин киназе C (PKC, енгл. *Protein kinase C*) и инфлукс јона калцијума у ћелију, што индукује експресију цитокина у ћелији која је претходно активирана физиолошким стимулусима (311). Инкубациони период у

трајању 4-6 часова је довољан за индукцију већине цитокина. Дужа инкубација изазива интензиван цитопатогени ефекат поменутих активатора.

У току *in vitro* стимулације ћелија коришћени су инхибитори интрацелуларног транспорта протеина, *BD GolgyStop*™ (садржи моненсин) и *BD GolgyPlug*™ (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.

Суспензије моноклеарних јетре (1×10^6 /ml), припремљене у медијуму (медијум са 10% FBS-ом), су инкубирани на 37°C у присуству 5% CO₂. У суспензију ћелија су додати РМА (*Sigma*; 50ng/ml) и јономицин (*Ionomycin, Sigma*; 500ng/ml). Након 2 сата инкубације додат је *BD GolgyStop*™ (0,7µl/ml), чиме је блокирана секреција цитокина и повећана интрацелуларна акумулација цитокина. После 6 сати инкубације (2 сата деловања активатора, а затим 4 сата истовременог деловања активатора и инхибитора транспорта цитокина), моноклеарне ћелије су опране и ресуспендоване у медијуму. Затим су ћелије пребачене у пластичне епрувете за имунофлуоресцентно бојење (енгл. *Falcon round-bottom test tubes, BD*). Током бојења и чувања, ћелије су држане на +4°C у мраку.

Најпре је урађено бојење мембранских маркера према унапред описаној процедури. Површинско бојење је увек боље обавити пре фиксације ћелија, јер епитопи површинских маркера могу да се оштете током фиксације и пермеабилитације.

Након инкубације са примарно коњугованим антителима за површинске антигене, ћелије су опране са 2ml пуфера за бојење и центрифугиране (250g, 5 минута). Ћелијски талог је ресуспендован у 250µl *Cytofix/CytoPerm*™ раствора (*BD Pharmingen*) и инкубиран 20 минута на температури +4°C. Затим су ћелије опране са 1 ml *Perm/Wash*™ пуфера (*BD Pharmingen*) и центрифугиране (250g, 5 минута). После одливања супернатанта додата су антитела за интрацелуларно бојење цитокина и инкубирана 30 минута на +4°C. Ћелијски талог је ресуспендован у 50µl *Perm/Wash*™ пуфера. Додата су примарно коњугована моноклонска антитела специфична за цитокине: анти-TNF, анти-IFN-γ, анти-IL-10, анти-IL-12, анти-IL-4 и анти-TGF-β (Табела 1). Након истека инкубације ћелије су опране са 2 ml пуфера за бојење и центрифугиране (250g, 5 минута).

Ћелијски талог је ресуспендован у 250µl пуфера за бојење и анализиран на проточном цитометру. Граничник је направљен у FSC/SSC дијаграму као регион вијабилних ћелија. Регистровано је најмање 10.000 догађаја у свакој цитометријској анализи. Подаци су анализирани помоћу FACSCalibur (BD Biosciences) и *Flowing Software 2.5.1.* програма

3.18. СЕПАРАЦИЈА НКТ ЋЕЛИЈА НЕГАТИВНОМ И ПОЗИТИВНОМ СЕЛЕКЦИЈОМ ПОМОЋУ МАГНЕТНИХ КУГЛИЦА

НКТ ћелије су издвојене из суспензије моноклеарних ћелија јетре магнетном сепарацијом помоћу кита *NK1.1⁺ iNKT Cell Isolation Kit, mouse*, према утврђеном протоколу произвођача (Miltenyi Biotec).

Први корак у сепарацији НКТ ћелије је изолација моноклеарних ћелија јетре које су најпре избројане а онда је узето 10⁷ ћелија. Ћелије су центрифугиране 10 минута на 300 G а потом је одливен супернатант и талог ћелија је ресуспендован у 80 µl пуфера (PBS (без Ca²⁺ и Mg²⁺) w/0.1% BSA и 2mM EDTA (pH 7.4)). Затим је додато 20µl NK1.1+ iNKT Cell Biotin-Antibody Cocktail-а који садржи различита антитела (анти-NKp46, CD45R, CD8a, CD115 и TCRγδ антитело) којима се уклањају одређене популације ћелија. Талог ћелија је добро промешан и инкубиран 10 минута на температури од 2-8°C. По истеку инкубације уследило је прање ћелија у 2 ml пуфера, онда су центрифугиране 10 минута на 300 G на температури од 2-8°C а затим је одливен супернатант. Талог ћелија је ресуспендован у 90µl Buffer а онда је додато 10µl Anti-Biotin MicroBeads. Талог ћелија којима је додат Anti-Biotin MicroBeads је инкубиран 15 минута на температури од 2-8°C. По истеку инкубације ћелије су ресуспендоване у 2 ml пуфера и центрифугиране 10 минута на 300 G. Потом је пипетом уклоњен комплетан супернатант и талог ћелија је ресуспендован у 500µl пуфера. LD колона је затим постављена у магнетно поље MidiMACS сепаратора (Miltenyi Biotec) и припремљена испирањем са 2 ml Buffer-а. Следећи корак је био пропуштање ћелијске суспензије кроз LD колону у магнетном пољу и на тај начин су прикупљене необележене NK1.1⁺ НКТ ћелије. Негативно селектоване НКТ ћелије су центрифугиране 10 минута на 300 G а затим је одливен супернатант. Талог ћелија је ресуспендован у 90µl пуфера (PBS (pH=7.2), 0.5% BSA и 2mM EDTA) а онда је додато 10µl Anti-NK1.1-APC. Затим је уследила инкубација ћелија са антителом специфичним за НКТ ћелије у трајању 10 минута на температури од 2-8°C. По истеку инкубације

ћелије су опране у 2 ml Buffer-а и центрифугиране 10 минута на 300 G. Потом је пипетом уклоњен комплетан супернатант и талог ћелија је ресуспендован у 80 μ l пуфера, а онда је додато 20 μ L Anti-APC MicroBeads. Талог ћелија којима је додат Anti-APC MicroBeads је инкубиран 15 минута на температури од 2-8°C. По истеку инкубације ћелије су ресуспендоване у 2 ml пуфера и центрифугиране 10 минута на 300 g. Потом је уклоњен комплетан супернатант и талог ћелија је ресуспендован у 500 μ l пуфера.

LS колона је затим постављена у магнетно поље MidiMACS сепаратора (Miltenyi Biotec) и припремљена испирањем са 500 μ L пуфера. Ћелијска суспензија је пропуштена кроз LS колону у магнетном пољу и на тај начин су NKT ћелије позитивно селектоване односно овакве ћелије су се помоћу анти-NK1.1 антитела конјуговано магнетним куглицама везале за зидове колоне. LS магнетна колона у којој су задржане "обележене" ћелије је затим уклоњена са MACS сепаратора и постављена у епрувету. Како би се овакве ћелије уклониле из колоне додато је 1 ml пуфера а онда је садржај потиснут пластичним клипом. Одређен је број и вијабилност ових ћелија. Овако добијене NKT ћелије су коришћене као ефекторске ћелије у тесту цитотоксичности.

3.19. ИЗОЛАЦИЈА СПЛЕНОЦИТА

Сви мишеви којима су изоловани спленоцити су жртвовани 2 сата након интравенске примене α -GalCer-а. Изолована слезина је најпре хомогенизована клипом шприца а затим пропуштена кроз ћелијско сито (cell strainer BD Pharmingen, USA) у епрувету од 50 ml уз додавање 5 ml медијума (RPMI-1640 (PAA Laboratories GmbH) са додатком 10% FBS-а). Овако раздвојене појединачне ћелије су центрифугиране на 1500 rpm 5 минута а онда је одливен супернатант. У циљу лизирања еритроцита уследила је инкубација ћелија у 5 ml lysing раствора у трајању 5 минута на леду. Након истека инкубације додавањем 5 ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом је заустављено даље лизирање. Затим су ћелије центрифугирање, одливен је супернатант и после додавања 8 ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом добро ресуспендоване пипетом. На тај начин је добијена суспензија појединачних спленоцита која је коришћена за магнетну сепарацију регулаторних Т лимфоцита.

3.20. ИЗДВАЈАЊЕ РЕГУЛАТОРНИХ Т ЛИМФОЦИТА НЕГАТИВНОМ И ПОЗИТИВНОМ СЕЛЕКЦИЈОМ ПОМОЋУ МАГНЕТНИХ КУГЛИЦА

За издвајање Treg лимфоцита из слезине је коришћен *CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit mouse*, према утврђеном протоколу произвођача (Miltenyi Biotec). Први корак у сепарацији Treg лимфоцита је изолација спленоцита који су најпре избројани а онда је узето 10^7 ћелија. Ћелије су центрифугиране 10 минута на 300 G а потом је одливен супернатант и талог ћелија ресуспендован у 40 μ l пуфера (PBS (без Ca^{2+} и Mg^{2+}) w/0.1% BSA и 2mM EDTA (pH 7.4)). У ћелијску суспензију је додато 10 μ l *CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Biotin-Antibody Cocktail*-а који садржи различита антитела (анти-CD8a, CD11b, CD45R, CD49b и Ter-119 антитело) којима се уклањају одређене популације ћелија. Талог ћелија је добро промешан и инкубиран 10 минута на температури од 2-8°C. Затим је у талог додато 30 μ L пуфера, 20 μ L Anti-Biotin MicroBeads и 10 μ L CD25-PE антитела. LD колона, постављена у магнетно поље MidiMACS сепаратора (Miltenyi Biotec) је припремљена испирањем са 2 ml Buffer-а. Након инкубације (15 минута на температури од 2-8°C) ћелијска суспензија је пропуштена кроз LD колону у магнетном пољу и на тај начин су прикупљени необележени CD4⁺ Т лимфоцити. CD4⁺ ћелије издвојене негативном селектованом су центрифугиране 5 минута на 300 G а затим је одливен супернатант. Талог ћелија је ресуспендован у 90 μ l пуфера (PBS (pH=7.2), 0.5% BSA и 2mM EDTA) а онда је додато 10 μ l Anti-PE MicroBeads. По истеку инкубације (15 минута на температури од 2-8°C) ћелијска суспензија је пропуштена кроз MS колону у магнетном пољу и на тај начин су CD4⁺CD25⁺ Т лимфоцити позитивно селектовани односно ове ћелије су се везале за зидове колоне. MS магнетна колона у којој су задржане "обележене" ћелије је затим уклоњена са MACS сепаратора и постављена у епрувету. У колону је додато 1 ml пуфера а онда је садржај потиснут пластичним клипом. Одређен је број и вијабилност ових ћелија. Овако добијени Treg лимфоцити су коришћени за *in vitro* експерименте.

3.21. ИЗОЛАЦИЈА PBMNC

PBMNC су изоловане из венске крви здравих добровољних давалаца. Узимано је 10 ml крви у хепаринизоване пластичне бризгалице (50 μ l хепарина по 1 ml крви). Крв је пренета у епрувету (12 ml) и центрифугирана 10 минута на 2000 rpm на собној температури. Плазма и слој леукоцита, изнад сталожених еритроцита, Пастеровом

пипетом пренети су на лимфопреп (Lymphoprep, Nicomed Pharma AS, Oslo, Norway) и центрифугирани 22 минута на 2700 rpm на собној температури. Пастеровом пипетом покупљени моноклеарни леукоцити (издвојени у слоју на граници плазме и лимфопрепа), прани су три пута по 5 минута центрифугирањем у PBS-у брзином 400 g на собној температури. Ћелијски талог је ресуспендован у медијуму и у суспензији је одређивана њихова вијабилност и контаминација полиморфонуклеарним леукоцитима.

3.22. КОКУЛТИВАЦИЈА NKT ЋЕЛИЈА И mMSCs

NKT ћелије, изоловане на претходно описан начин (3.15.), су култивисане у комплетном медијуму DMEM са 10% FBS-а, 2 mM L-глутамина, 100 IU/ml пеницилина G и 100 µg/ml стрептомицина) уз додатак α-GalCer-а (100 ng/ml) у присуству или одсуству mMSCs, на 37°C у атмосфери са 5% CO₂ у инкубатору. NKT ћелије су кокултивисане са mMSCs у *transwell* систему са 24 отвора (0,4 µm; Corning Incorporated, Life Sciences, France), у односу 10:1 (312). NKT ћелије су постављене у културу у доњу комору *transwell* система (1 x 10⁶ ћелија по отвору), док су mMSCs засејане у *transwell* инсерте. Након 48 h инкубације, супернатанти из свих комора су сакупљени и замрзнути на температури од -20°C до мерења концентрације цитокина помоћу ELISA китова у складу са препоруком произвођача. NKT ћелије су сакупљене и анализиране методом проточне цитометрије и коришћене у тесту цитотоксичности.

Интеракција hMSCs и PBMNC је испитана на сличан начин. PBMNC, ресуспендоване у комплетном медијуму уз додатак α-GalCer-а (100 ng/ml), су култивисане у доњој, док су hMSCs засејане у горњој комори *transwell* система, у односу 10:1, у трајању од 48 h (274). По истеку инкубације, супернатанти су сакупљени у циљу каснијег одређивања концентрације цитокина, док су PBMNC коришћене у тесту цитотоксичности.

3.23. КОКУЛТИВАЦИЈА T РЕГУЛАТОРНИХ ЛИМФОЦИТА И mMSCs

Treg лимфоцити, изоловани магнетном сепарацијом су кокултивисани сами или са mMSCs (Treg^{mMSCs}) у *transwell* систему са 24 отвора (0,4 µm; Corning Incorporated, Life Sciences, France). Лимфоцити су постављени у културу у доњу комору *transwell* система, док су mMSCs засејане у *transwell* инсерте, у односу 10:1 (312). Након 48 h инкубације, Treg^{mMSCs} лимфоцити су сакупљени и коришћени у експериментима адоптивног трансфера.

У експериментима у којима је испитивано да ли је IDO медијатор којим mMSCs модулирају фенотип Treg лимфоцита и на тај начин посредно супримирају хепатитис изазван активацијом NKT ћелија, Treg лимфоцити су кокултивисани са mMSCs у односу 10:1, у *transwell* систему у присуству фармаколошког инхибитора IDO-а, 1-MT. После 48 h, Treg лимфоцити су сакупљени и наредних 48 h инкубирани са NKT ћелијама у директној кокултури. По истеку инкубације, NKT ћелије су коришћене у тесту цитотоксичности, а фенотип Treg лимфоцита је анализиран на проточној цитометрији.

3.24. АДОПТИВНИ ТРАНСФЕР РЕГУЛАТОРНИХ ЛИМФОЦИТА

24 h пре индукције хепатитиса α -GalCer-ом, мишеви којима су деплетирани Treg лимфоцити на претходно описани начин (3.13), су интравенски примили Treg односно Treg^{MSCs} лимфоците у дози од 1×10^6 ћелија.

3.25. ТЕСТ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ

За одређивање цитотоксичке активности NKT ћелија изолованих из јетре експерименталних животиња коришћена је DP верзија xCELLigence система, која садржи 3 микротитар плоче са по 16 бунарчића (E16) са златним дном. 100 μ l комплетног медијума је сипано у сваки бунарчић, након чега је извршена калибрација постављањем xCELLigence система у стандардни инкубатор на 37° у присуству 5% CO₂. Као циљне ћелије коришћене су ћелије туморске линије HepG2. Суспензија таргет ћелија (T - HEPG2) је припремљена на следећи начин: туморске ћелије су одвојене са дна флашка и то краткотрајним третирањем раствором 0.25% trypsin-а и 0.02% EDTA раствореног у PBS-у. Како би се неутралисало даље дејство trypsin-а, ћелијама је додато 6 ml DMEM медијума са 10% FBS-ом, а затим су центрифугиране на 125 g 5 минута. Након одливања супернатанта, ћелије су ресуспендоване у комплетном медијуму. Вијабилност туморских ћелија је одређивана помоћу *trypan-blue*-а и за тест цитотоксичности је коришћена ћелијска суспензија са више од 95% вијабилних ћелија. Потом је припремљена суспензија ћелија (4×10^5 ћелија/ml комплетног медијума) тако да је у свако бунарче E16 плоче сипано по 100 μ l медијума у коме се налазило 4×10^4 туморских ћелија. E16 плоче су постављене у xCELLigence систем, након чега је уследила инкубација таргет ћелије на температури од 37°C и у присуству 5% CO₂ у трајању 24h.

Ефекторске ћелије које су изоловане на претходно описан начин (мишје NKT ћелије, хумане PBMNC) су кокултивисане са таргет ћелијама у односу 10:1 (313), на тај начин што су ресуспендоване у комплетном медијуму (4×10^6 ћелија/ml комплетног медијума), а затим су у одговарајуће бунарчиће сипане у волумену од 100 μ l по истеку 24-часовне инкубације таргет ћелија. E16 плоче су постављене у xCELLigence систем којим је мерен ћелијски индекс на 15 минута током 24 сата (37°C; 5% CO₂). Подаци су анализирани коришћењем програма RTCA Software 1.2 (Acea Biosciences).

3.26. МЕРЕЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ЦИТОКИНА И ИМУНОСУПРЕСИВНИХ ФАКТОРА КОЈЕ ПРОДУКУЈУ mMSCs У СЕРУМУ И СУПЕРНАТАНТУ

Мишеви су жртвовани 8 сати након интравенске примене Con A, односно односно 2 сата након примене α -GalCer-а у атмосфери засићеној диетилетром и узета им је крв из трбушне аорте која је центрифугирана 10 минута на 300 G. Затим је серум издвојен за сваког појединачног миша и замрзнут на температури од -20°C до извођења анализе.

Концентрација цитокина (TNF- α , IFN- γ , IL-4 и IL-10) и имуносупресивних фактора које продукују mMSCs (IDO, PGE₂, HGF, IL-10 и TGF- β) је мерена у серуму мишева (8 сати након интравенског давања Con A, односно 2 сата након примене α -GalCer) и у супернатантима α -GalCer-ом стимулираних NKT ћелија култивисаних у присуству или одсуству mMSCs (у трајању од 48 h), колориметријском методом односно комерцијалним ELISA (енгл. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) китовима специфичним за мишје цитокине и то *Mouse TNF- α DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse IFN- γ DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse IL-4 DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse IL-10 DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse HGF DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse TGF- β DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse PGE₂ DuoSet ELISA Development kit* и *Mouse IDO ELISA kit*, NeoBioLab.

Концентрација TNF- α , IFN- γ и IL-4 у супернатантима *in vitro* активираних PBMNC је одређивана након 48h култивације у присуству или одсуству hMSCs комерцијалним ELISA китовима специфичним за хумане цитокине (*Human TNF- α DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, MN, USA; *Human IFN- γ DuoSet ELISA Development kit*,

R&D Systems, MN, USA; *Human IL-4 DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, MN, USA).

Према упутству произвођача, стандарди су растворени у PBS-у (pH 7.2), тако да почетне концентрације за мишје цитокине буду 2000 pg/ml за TNF- α , IFN- γ и IL-10 и 1000 pg/ml за IL-4 и TGF- β , односно за хумане 2000 pg/ml за IL-10 и IL-4 и 1000 pg/ml за TNF- α и IFN- γ . У циљу конструисања стандардне криве и одређивања једначине праве према којој ће бити прерачунате концентрације мерених цитокина, од припремљених штокова стандарда су направљена серијска двоструко растућа разблажења у 8 тачака у комерцијалном растварачу (енгл. *Reagent Diluent* (PBS са 1%-тним BSA)).

По 100 μ l радне концентрације везујућег антитела сипано је у бунарчиће микротитар плоча са 96 бунарчића са равним дном (SARSTED). Плоче су прелепљене адхезивном фолијом и остављене преко ноћи на собној температури, након чега су бунарчићи мануелно испрани пуфером за испирање. Затим је у све бунарчиће додат блокирајући пуфер у финалном волумену од 300 μ l и плоче су остављене један сат на собној температури, а потом испране пуфером за испирање. Разблажени узорци и припремљени стандарди су сипани у микротитар плоче, прекривени адхезивном фолијом и остављени два сата на собној температури. Након инкубације и испирања микротитар плоча, у све бунарчиће је додато 100 μ l радне концентрације антитела за детекцију. Плоче су обложене адхезивном фолијом и поново остављене два сата на собној температури. Плоче су потом испране и у бунарчиће је сипано 100 μ l радне концентрације *Streptavidin*-HRP (енгл. *Streptavidin horseradish peroxidase*). Инкубација на собној температури и без директног излагања светлости прекинута је након 20 минута, испирањем микротитар плоча. У бунарчиће је сипано 100 μ l раствора супстрата (енгл. *Substrate solution: Color reagent A + Color reagent B*, у односу 1:1). Плоче су остављене на собној температури заклоњене од директне светлости, а након 20 минута додато је 50 μ l раствора за прекидање реакције. После мешања у трајању од неколико минута измерена је оптичка густина узорака на *MicroplateReader*-у (*Zenyth*, *Anthos*, UK) на таласној дужини од 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.

3.27. МЕРЕЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ КИНУРЕНИНА

IDO катализује метаболизам есенцијалне аминокиселине триптофана до кинуренина. Ензимска активност IDO је одређена спектрофотометријским мерењем концентрације кинуренина у серуму експерименталних животиња којима је хепатитис изазван применом Con A односно α -GalCer, као и у супернатантима културе. 200 μ l серума односно ћелијског супернатанта је помешано са 100 μ l 30% трихлорацетатне киселине и инкубирано на температури од 50°C у трајању од 30 минута. Након центрифугирања (15400 g у трајању од 1 минута), 125 μ l добијеног супернатанта је помешано са истом запремином Ерлиховог реагенса (100 mg *p*-диметилбензалдехида је растворено у 5 ml глацијалне киселине). Сви узорци су очитани у односу на слепу пробу (дејонизована вода) на таласној дужини од 490 nm помоћу спектрофотометра (*Specord S-600 Analytik Jena*) (314).

3.28. ПОЛИМЕРИЗОВАНА ЛАНЧАНА РЕАКЦИЈА (PCR)

3.28.1. Изолација РНК

Да би се из ткива јетре изоловала РНК, ткиво је претходно уситњено и лизирано РНК изолатором (*Invitrogen, Paisley, UK*). Уситњено ткиво је преливено са 250 μ l изолатора. Добијене смеше су скупљене у пластичне епрувете (1,5ml), а након 5 минута инкубације на собној температури додато им је по 50 μ l хлороформа. Након интензивног мешања узорци су инкубирани 10 минута на +4°C, а затим центрифугирани током 15 минута на 12000g на +4°C. Центрифугирањем су се јасно издвојиле три фракције: горња (водена) фракција у којој је РНК, доња (хлороформска) фракција са протеинима и липидима и интермедијарна фракција у којој је ДНК. Водена фракција је скупљена у пластичне епрувете, помешана са изопропранололом *anapartes* и инкубирана 30 минута на собној температури. Уследило је центрифугирање током 15 минута на 12000g на +4°C, а после одливања супернатанта талог у којем се налази РНК је опран два пута у трајању од 5 минута на 7500g у 1ml 70% етанола и сушен до испаравања целокупног етанола. Узорци су потом растварани у 20 μ l дестиловане воде.

3.28.2. Реверзна транскрипција

Након мерења концентрација на *Gene Quant* колориметру волумену раствора који садржи 1 μ g РНК додавано је 15 μ l воде и 0,2 μ g насумичних прајмера (*Fermentas, Vilnius*, Литванија). Након тога у раствору је додаван и dNTP (3'-деокси нуклеотид трифосфат) (*Fermentas, Vilnius*, Литванија) тако да финална концентрација буде 1mM. Као контрола за евентуалну контаминацију служила је вода. Раствори су инкубирани 10 минута на 70°C, да би се прајмери (хексамери) насумично везивали за РНК, по истеку тог времена узорци су пренети на суви лед. Након пет минута у узорке је додавано по 4 μ l пуфера за реверзну транскрипцију (5 x *First Strand Buffer, Fermentas, Vilnius*, Литванија) и 1 μ l M-MuLV реверзне транскриптазе (200 U/ μ l, *Fermentas, Vilnius*, Литванија). Уследила је инкубација у трајању од 10 минута на 25°C, а потом 60 минута на 42°C, да би се одиграла реакција реверзне транскрипције. Реакција је прекинута инкубацијом узорака на 70°C током 10 минута. На овај начин добијена је cDNA (комплетарна DNA), која је у раствореном стању чувана на +4°C до употребе у реакцији ланчаног умножавања.

3.28.3. Реакција ланчаног умножавања у реалном времену (RT-PCR, *real time polymerase chain reaction*)

Реакција ланчаног умножавања у реалном времену је проведена на апарату *ABI Prism 7500Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, CA)*. Реакције су припремане према стандардном протоколу за *QuantiTectSYBR Green RT-PCR* у једном кораку (*Applied Biosystems, Cheshire*, Велика Британија), уз употребу комерцијално доступних прајмера за *Atg4b, Atg5, Atg7, Atg12, beclin-1, Puma, Noxa, Bcl-2, Bax, Bad, p53, Pten, Apaf1, Bcl-xL* и *XIAP (Life Technologies, Carlsbad, CA)*. Прајмери за β -актин (*sens* 5'-TCCTTCTTGGGTATGG-3' и *antisens* 5'-ACGCAGCTCAGTAACAG-3') су дизајнирани користећи *Primer Express® software v2.0 (Applied Biosystems, Cheshire, Велика Британија)*. Иницијални корак RT-PCR је био 2 минута на 50°C, праћен задржавањем од 10 минута на 95°C. У реакцији је било 40 циклуса, који су се састојали од 15 подциклуса топлјења на 95°C, за којом је следио један минут везивања прајмера за ДНК и синтезе ДНК ланца на 60°C. Све реакције су рађене у трипликату. Праг анализе циклуса (*Ct, cycle of threshold*) је био подешен на 0,1 релативних флуоросцентних јединица. Просечне *Ct* вредности контролних трипликаата (актин) су одузете од просечних *Ct* вредности трипликаата гена од интереса и на тај начин је добијен ΔC_t , док

је релативна експресија гена изражена као $2^{-\Delta C_t}$. Резултати су приказани као релативни у односу на контролу, која је арбитрарно подешена на 1.

3.29. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

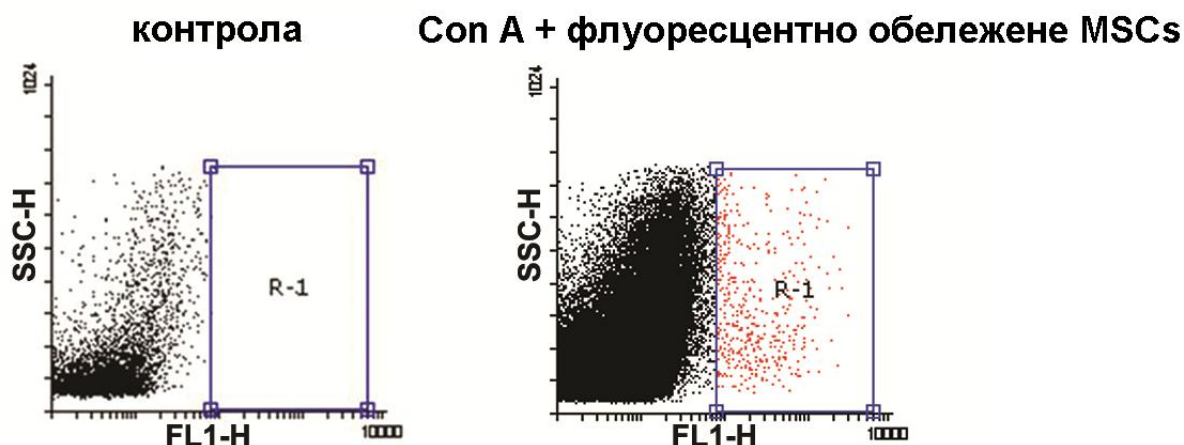
Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 19. Нормалност расподеле је одређена тестом *Kolmogorov-Smirnov*. Уколико су вредности имале нормалну расподелу коришћен је параметарски *Student's*-ов t тест. У случају неправилне расподеле коришћен је непараметарски *Mann-Whitney*-ев U тест. Резултати експеримента су изражени као вредност \pm стандардна грешка (енгл. *Standarderror/Mean*, SEM). Статистички значајном разликом сматране су добијене вредности $p < 0.05$, а статистички веома значајним означене су оне за које је $p < 0.01$. *Microsoft Excel* је коришћен за креирање графикана и табела.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Интравенски трансплантиране mMSCs мигрирају у јетру и значајно смањују оштећење јетре изазвано применом Con A

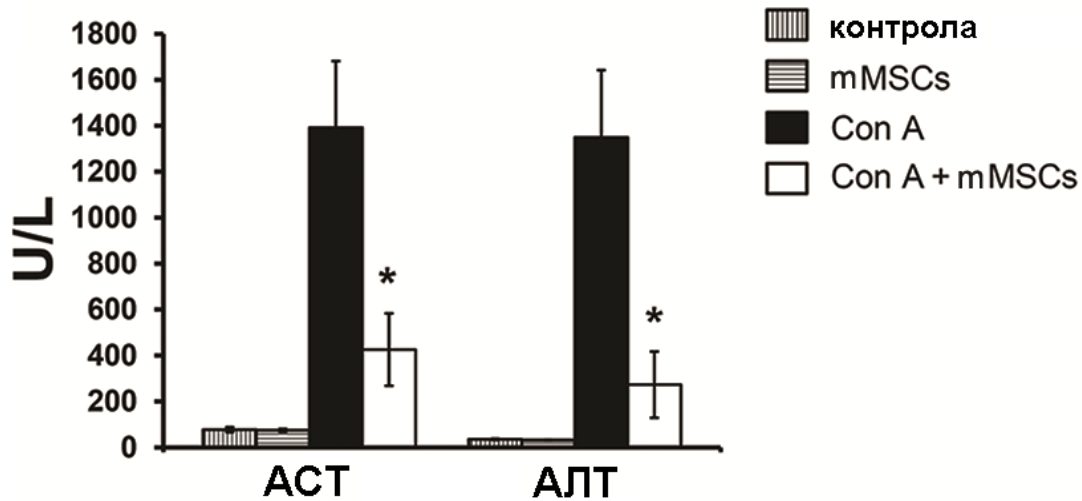
Иако су многе студије показале широк спектар хепатопротективних ефеката mMSCs, утицај mMSCs на NKT ћелије, главне ефекторске ћелије у фулминантном хепатитису, још увек није био познат.

У циљу испитивања интеракције mMSCs и NKT ћелија *in vivo*, мишеви соја C57BL/6 који су претходно насумично сврстани у експерименталне групе су интравенски примили по 250 μ l раствора Con A у дози 12 mg/kg ТТ, односно Con A и непосредно након њега mMSCs у дози од 5×10^5 ћелија ресуспендованих у 200 μ l NaCl-а. Мишеви контролних група, интравенски су примили само по 5×10^5 MSCs ресуспендованих у 200 μ l NaCl-а односно само 200 μ l NaCl-а. Мишеви свих група су жртвовани након 24 сата и најпре су, у циљу процене степена оштећења јетре, урађене биохемијске и патохистолошке анализе. Познато је да локална инфламација регрутује mMSCs у оштећено ткиво у коме ове ћелије испољавају своје регенеративне и имуномодулаторне карактеристике. mMSCs обележене флуоресцентном бојом које су интравенски апликоване непосредно након индукције хепатитиса детектоване су методом проточне цитометрије у јетри експерименталних животиња 8 сати после третмана (Слика 11).



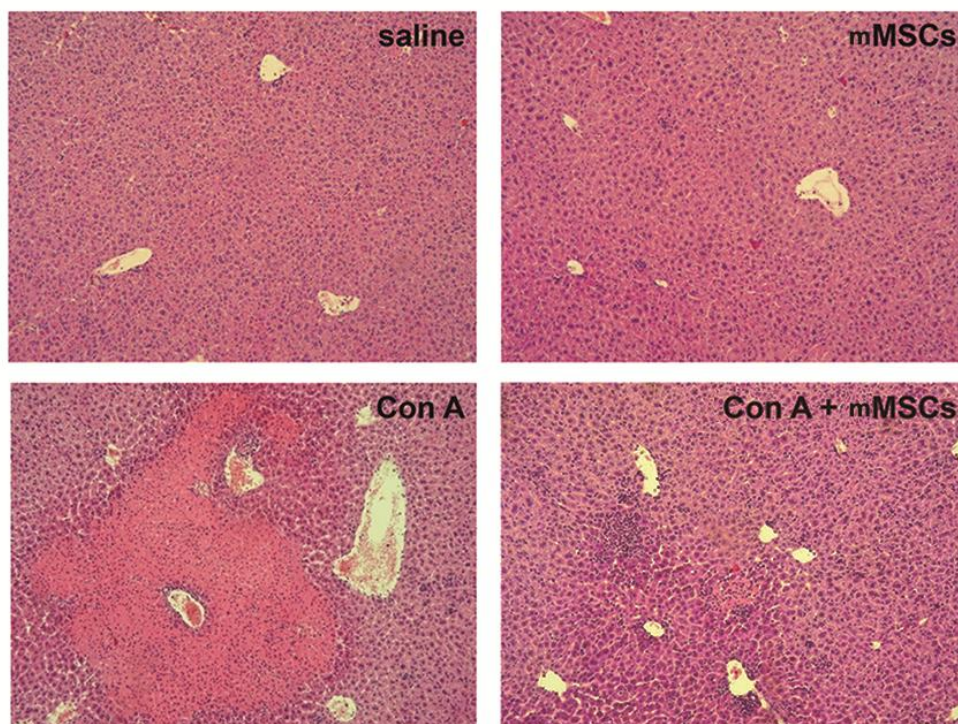
Слика 11. Присуство интравенски трансплантираних mMSCs у јетри мишева 8 сати након индукције хепатитиса. Значајан број mMSCs обележених флуоресцентном бојом (CFSE) мигрира у јетру мишева којима је индукован хепатитис применом Con A (12 mg/kg ТТ).

Као што је приказано на графикону 1, статистички значајно ($p < 0.05$) смањење концентрације трансаминаза (АСТ и АЛТ) је уочено код мишева који су након Con A примили mMSCs, у поређењу са животињама којима је апликован само Con A. Није било значајне разлике у концентрацији трансаминаза у серуму мишева контролних група (Графикон 1).



Графикон 1. Концентрација трансаминаза у серуму мишева након примене Con A и mMSCs. Концентрација трансаминаза (АСТ и АЛТ) је статистички значајно мања у серуму мишева који су непосредно након Con A (12 mg/kg TT) примили 5×10^5 mMSCs у поређењу са мишевима којима је апликован само Con A. Представљени резултати 2 експеримента са најмање 10 мишева по групи (средња вредност +/- SE; * $p < 0.05$).

Анализом патохистолошких препарата исечака јетре потврђени су резултати биохемијских испитивања. Као што је приказано на слици 12, интравенска примена једне дозе mMSCs након апликације Con A спречила је масовно оштећење хепатоцита. Само појединачна поља фокалне некрозе, мале површине, уочена су у ткиву јетре мишева којима су апликовани Con A и mMSCs. Супротно, код мишева који су примили само Con A била су присутна поља некрозе великих површина са видљивом вакуолизацијом, кариолизом и кондензацијом хроматина хепатоцита. Јетре мишева који су примили само 0.9%NaCl односно само mMSCs, биле су без оштећења, односно имале су нормалну грађу (Слика 12).

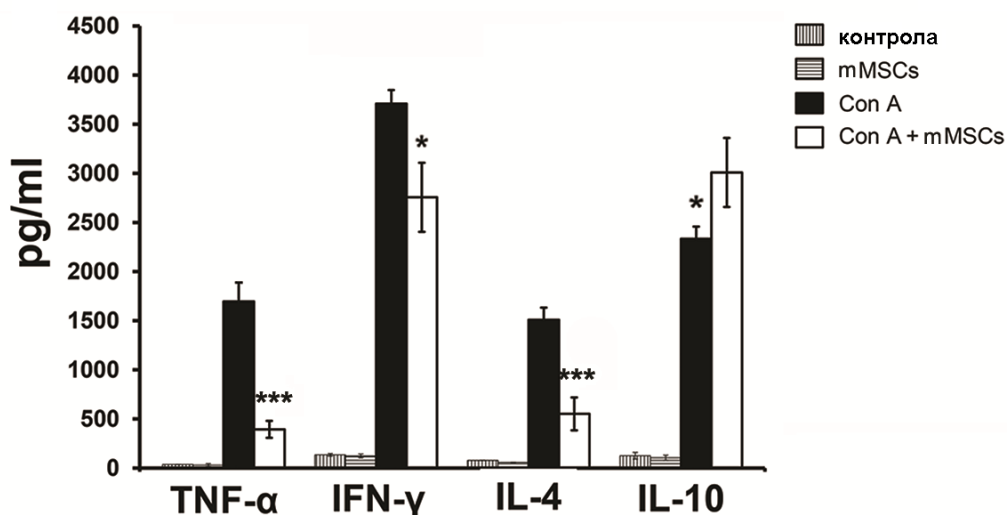


Слика 12. Репрезентативни исечци јетре обојени стандарним патохистолошким бојењем, увећање x 100 (H&E).

4.1.1. Серумске концентрације проинфламацијских цитокина $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$ и $IL-4$ су мање док је концентрација антиинфламацијског $IL-10$ већа након примене mMSCs

Како је код мишева са хепатитисом који су примили mMSCs уочено значајно смањење концентрације трансаминаза у серуму и одсуство масовне некрозе хепатоцита, испитано је да ли су ове разлике последица разлике у продукцији проинфламацијских vs антиинфламацијских цитокина.

Мерењем цитокина у серуму, 8 сати након интравенске примене Con A, ELISA методом (графикон 2), утврђено је статистички значајно смањење концентрације проинфламацијских $TNF-\alpha$ ($p < 0.001$), $IFN-\gamma$ ($p < 0.05$) и $IL-4$ ($p < 0.001$) и статистички значајан пораст антиинфламацијског $IL-10$ ($p < 0.05$) у серуму мишева који су након Con A примили mMSCs, у поређењу са мишевима којима је дат само Con A (Графикон 2).



Графикон 2. Вредности цитокина у серуму. Концентрација TNF- α , IFN- γ и IL-4 је статистички значајно мања, док је концентрација IL-10 статистички значајно већа у серуму мишева коју су непосредно након Con A (12mg/kgTT) примили 5×10^5 mMSCs у поређењу са мишевима којима је апликован само Con A. Нема значајне разлике у концентрацији серумских цитокина између контролних група. Представљени резултати 2 експеримента са најмање 8 мишева по групи (средња вредност \pm SE; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

4.2. Примена mMSCs смањује инфламацију у јетри мишева којима је хепатитис изазван апликацијом Con A

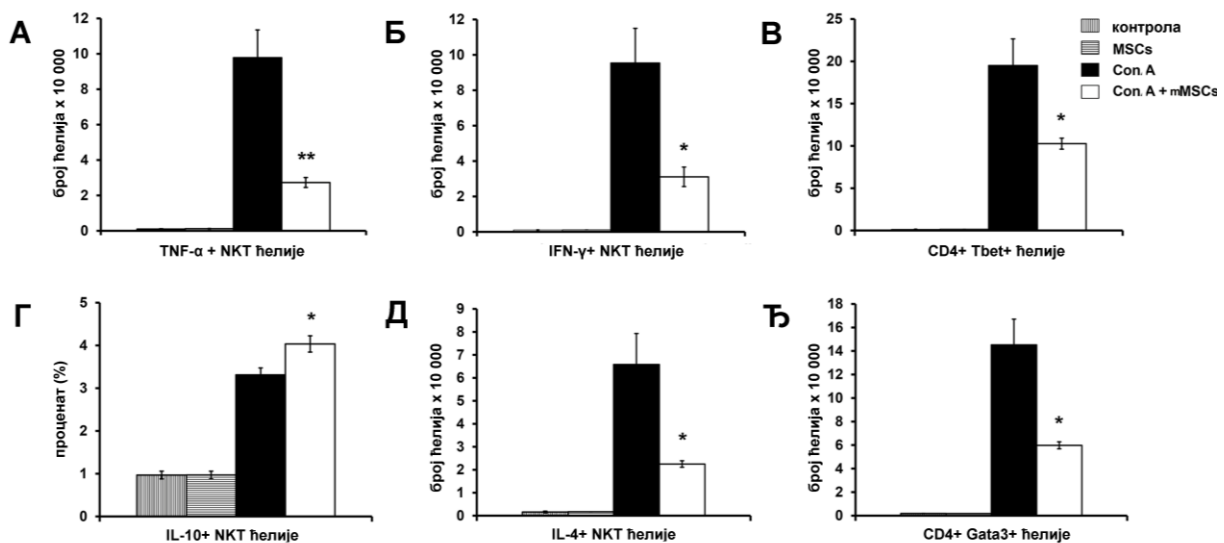
Налаз значајно мањег оштећења јетре као и мање серумске концентрације проинфламацијских цитокина у мишева који су примили mMSCs, имплицирали су претпоставку да би смањена инфилтрација инфламацијским ћелијама могла бити одговорна за уочене разлике. Зато су проточном цитометријом, одређивани проценат и број инфилтрушићих популација мононуклеарних ћелија као и функционални фенотип ових ћелија у јетри експерименталних животиња.

4.2.1. mMSCs значајно смањују број инфламацијских NKT ћелија у јетри

Обзиром да су претходне студије показале да NKT ћелије играју главну улогу у патогенези Con A индукованог хепатитиса, проточном цитометријом је одређен цитокински профил NKT ћелија, дефинисаних као CD4⁺CD1d тетрамер⁺ ћелије, изолованих из јетри мишева којима су интравенски апликовани Con A и mMSCs, или само Con A. Као што је приказано на графикону 3, осам сати након интравенске апликације Con A, број NKT ћелија, које продукују TNF- α и IFN- γ и које експримирају

Th1 транскрипциони фактор T-bet је био статистички значајно мањи у јетри мишева којима су интравенски апликоване mMSCs непосредно након Con A у поређењу са мишевима који су примили само Con A ($p < 0.01$ за $CD4^+ CD1d$ тетрамер $^+$ TNF- α^+ NKT ћелије; $p < 0.05$ за $CD4^+ CD1d$ тетрамер $^+$ IFN- γ^+ NKT ћелије; $p < 0.05$ за $CD4^+$ T-bet $^+$ ћелије) (Фигура 1). Уз то, број NKT ћелија које продукују IL-4 и експримирају Th2 транскрипциони фактор GATA3 је био статистички значајно ($p < 0.05$) мањи у јетри мишева који су примили mMSCs.

Код животиња којима су дати Con A и mMSCs регистрован је статистички значајно ($p < 0.05$) већи проценат NKT ћелија које продукују IL-10, указујући на могућу улогу mMSCs у поларизацији NKT ћелија. Међутим, када је анализиран апсолутни број ћелија ове популације у узорцима, није запажена разлика међу експерименталним групама (Фигура 1). У јетри мишева контролних група није било значајне разлике ($p > 0.05$) у апсолутном броју анализираних популација NKT ћелија (Фигура 1).



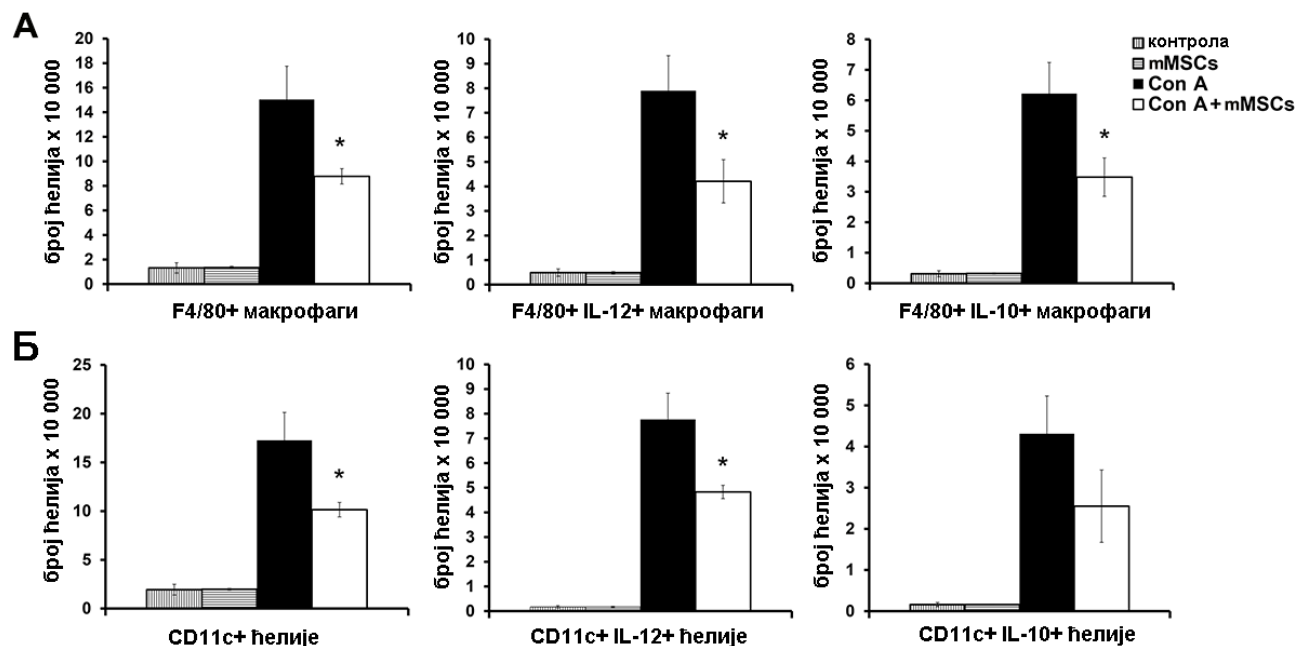
Фигура 1. Интравенски апликоване mMSCs смањују број NKT ћелија које продукују цитокине у јетри мишева којима је индукован Con A хепатитис. NKT ћелије изоловане из јетре мишева су анализирание методом проточне цитометрије, 8 сати након третмана. Укупан број NKT ћелија које продукују (А) TNF- α , (Б) IFN- γ , (В) Tbet $^+$, (Д) IL-4 и (Ћ) Gata3 $^+$ је статистички значајно мањи у јетри мишева са хепатитисом који су примили MSCs. (Г) Процент IL-10 $^+$ NKT ћелија је статистички значајно већи након третмана MSCs. Резултати су приказани као средња вредност \pm SE (8 мишева по групи) (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4.2.2. mMSCs значајно смањују присуство макрофага и дендритских ћелија у јетри

У циљу даљег испитивања потенцијалног механизма протективног ефекта примене mMSCs у фулминантном хепатитису, методом проточне цитометрије у јетри је анализирана инфилтрација и доминантни фенотип макрофага и дендритских ћелија.

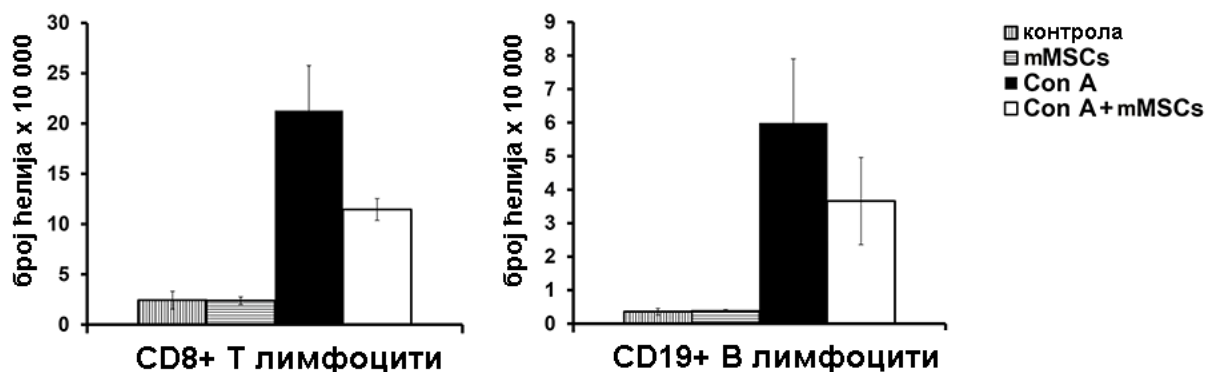
Интравенска примена mMSCs, статистички је значајно смањила укупан број макрофага, дефинисаних као F4/80⁺ ћелије, као и макрофага који продукују IL-12 и IL-10 у јетри мишева којима је хепатитис индукован апликацијом Con A (Фигура 2А).

Такође, уочено је да mMSCs значајно утичу на пораст броја CD11c⁺ дендритских ћелија. Укупан број CD11c⁺ дендритских ћелија, као и дендритских ћелија које продукују IL-12 је био значајно редукован у јетри мишева којима су интравенски апликоване mMSCs непосредно након Con A у поређењу са мишевима који су примили само Con A (Фигура 2Б).



Фигура 2. Бројчана заступљеност ћелија које презентују антигене у ткиву јетре мишева након примене Con A и mMSCs. Укупан број (А) F4/80⁺ макрофага, макрофага који продукују IL-12 и IL-10, као и (Б) CD11c⁺ дендритских ћелија и дендритских ћелија који продукују IL-12 био је статистички значајно мањи у у јетри мишева којима су након индукције хепатитиса трансплантиране mMSCs (5×10^5). Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (8 мишева у групи) (* $p < 0.05$).

Није постојала статистички значајна ($p > 0.05$) разлика у броју $CD8^+$ Т лимфоцита нити у броју $CD19^+$ В лимфоцита, који су инфилтрисали јетру експерименталних мишева (Фигура 3).



Фигура 3. Бројчана заступљеност Т и В лимфоцита лимфоцита у јетри мишева којима су дати Con A и mMSCs. Не постоји разлика у броју $CD8^+$ Т лимфоцита и $CD19^+$ В лимфоцита у јетри мишева којима су након индукције хепатитиса трансплантиране mMSCs (5×10^5), у поређењу са мишевима којима су примили само Con A (12mg/kg TT). Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (8 мишева у групи).

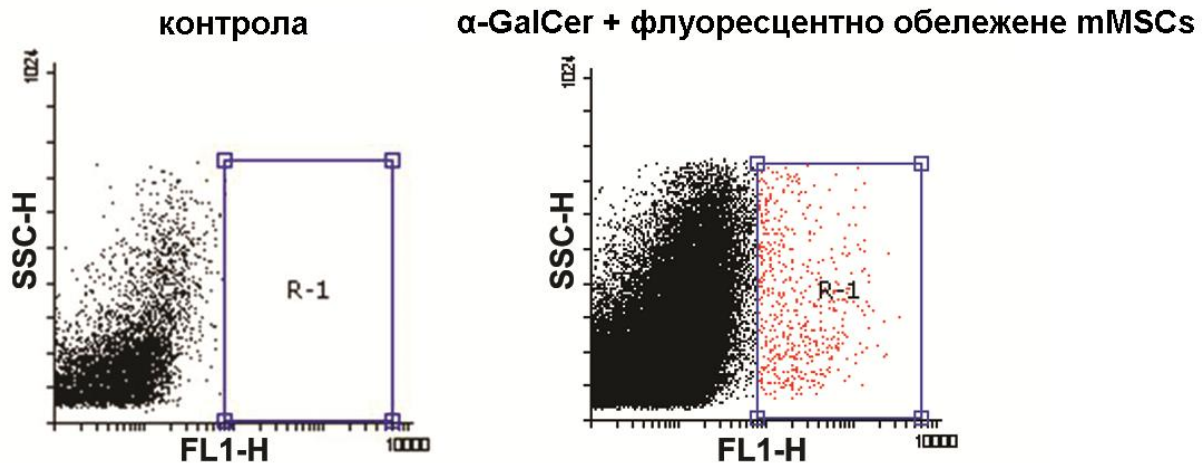
4.3. Примена mMSCs значајно смањује оштећење јетре изазвано α -GalCer-ом

У циљу испитивања да ли mMSCs супримирају ефекторске функције NKT ћелија јетре директно или посредством ћелија које презентују антигене, у даљем току истраживања коришћен је модел фулминантног хепатитиса који је изазван α -GalCer-ом, специфичним и снажним активатором NKT ћелија.

У ту сврху, након што су проточном цитометријом 2 сата после третмана, у јетри животиња са α -GalCer-индукованим хепатитисом детектоване интравенски апликоване флуоресцентно обележене mMSCs (Слика 13), одређене су концентрације трансаминаза у серуму и анализирани патохистолошки препарати јетре како би се испитало да ли mMSCs могу да редукује оштећење јетре изазвано α -GalCer-ом.

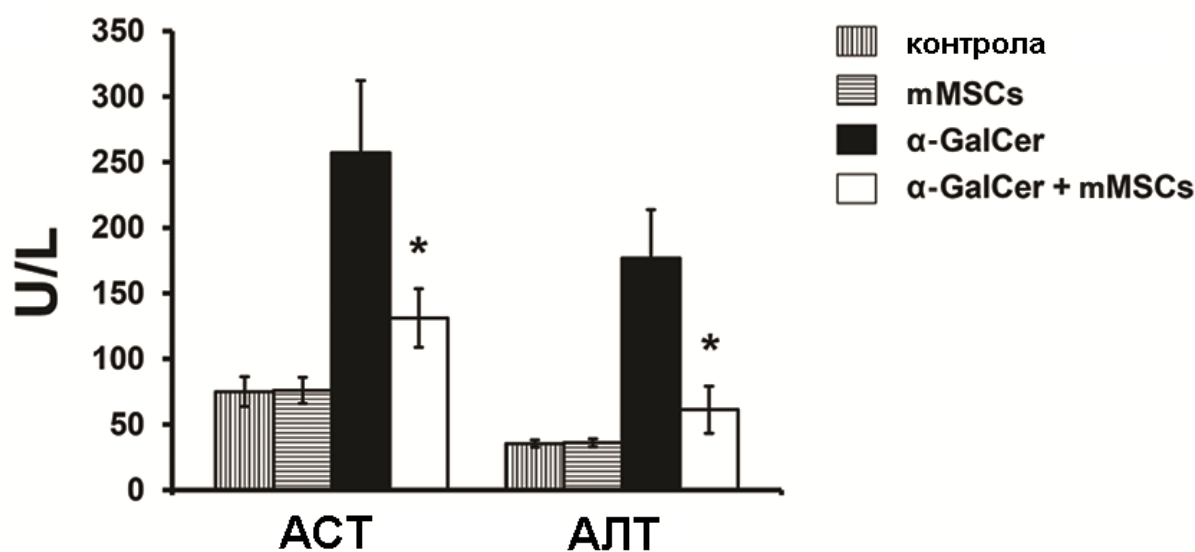
Као експерименталне животиње коришћени су мишеви соја C57BL/6 насумично сврстани у две експерименталне и две контролне групе. Мишеви прве експерименталне групе интравенски су примили α -GalCer (50 μ g/kg TT), претходно растворен у физиолошком раствору (0.9%NaCl), док су мишеви друге експерименталне групе непосредно након α -GalCer-а интравенски примили 5×10^5 mMSCs ресуспендованих у

200 μ l 0.9%NaCl-a. Мишеви груписани у прву контролну групу су интравенски примили само 0.9%NaCl, док су мишеви сврстани у другу контролну групу интравенски примили само mMSCs.



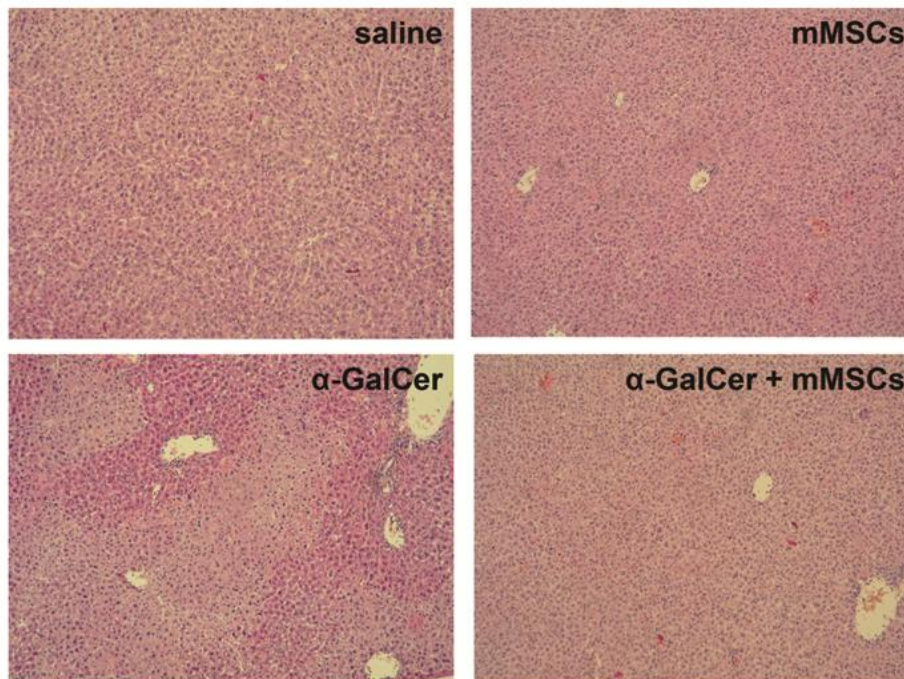
Слика 13. Детекција системски апликованих mMSCs у јетру мишева 2 сата након индукције хепатитиса применом α -GalCer-а. Флуоресцентно (CFSE) обележене mMSCs мигрирају у јетру мишева којима је индукован хепатитис применом α -GalCer-а (50 μ g/kg TT).

Концентрација трансаминаза (ACT и АЛТ) у серуму мишева експерименталних група, мерена 16 сати након апликације α -GalCer-а (50 μ g/kg TT), је показала да интравенска примена 5×10^5 mMSCs редукује тешко оштећење јетре изазвано α -GalCer-ом. Као што је приказано на графикону 5, концентрација ACT и АЛТ је статистички значајно ($p < 0.05$) мања у серуму мишева који су после α -GalCer-а примили mMSCs, у поређењу са мишевима којима је интравенски дат само α -GalCer. Није постојала статистички значајна разлика ($p > 0.05$) у концентрацији трансаминаза у серуму између мишева контролних група (Графикон 3).



Графикон 3. Концентрација трансминаза у серуму мишева након примене α -GalCer и mMSCs. Постоји статистички значајан пад АСТ и АЛТ у серуму мишева који су интравенски у једној дози (5×10^5) примили mMSCs после α -GalCer-а ($50\mu\text{g/kg}$ ТТ) у поређењу са мишевима којима је интравенски дат само α -GalCer. Не постоји статистички значајна разлика у серумској концентрацији трансминаза између мишева контролних група. Представљени резултати 2 експеримента са 8 мишева по групи (средња вредност \pm SE; * $p < 0.05$).

Патохистолошка анализа јетре је потврдила резултате биохемијских испитивања (Слика 14). Значајно мање оштећење јетре је уочено код мишева који су примили 5×10^5 mMSCs после интравенске апликације α -GalCer-а ($50\mu\text{g/kg}$ ТТ). Код мишева који су примили само α -GalCer била је присутна масовна, дисеминована некроза хепатоцита (слика 4) праћена губитком нормалне грађе ткива јетре док су појединачна и ретка поља некрозе мале површине била присутна у јетри мишева који су примили mMSCs после α -GalCer-а. Као што се може видети на слици 14, јетре мишева обе контролне групе су биле очуване и непромењене грађе.

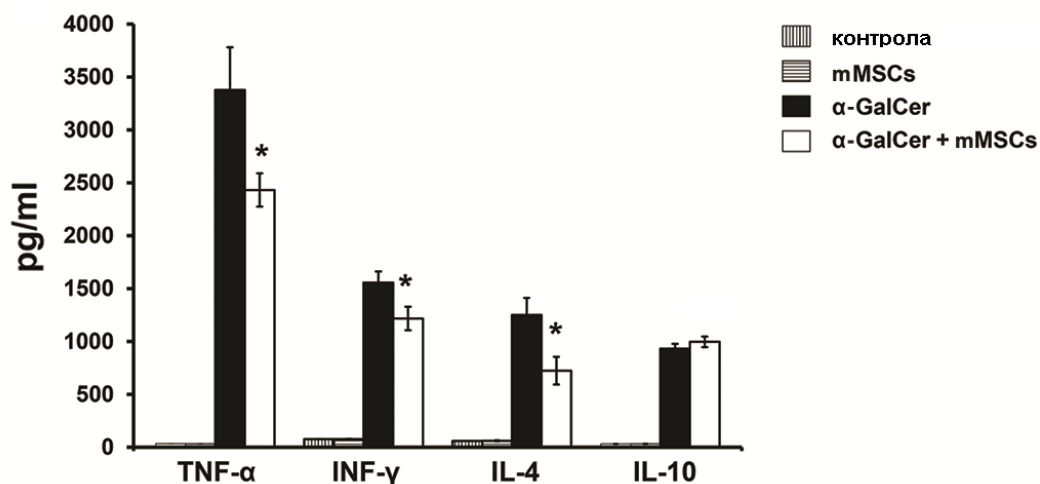


Слика 14. Репрезентативни исечци јетре мишева након примене α -GalCer-а и mMSCs. Стандарно патохистолошко бојење (H&E), увећање x 100.

4.3.1. Примена mMSCs смањује концентрацију TNF- α , IFN- γ и IL-4 у серуму

Обзиром да су резултати биохемијских и патохистолошких испитивања показали да примена mMSCs смањује оштећење јетре у α -GalCer хепатитису и да су ови резултати у складу са резултатима добијеним у Con A моделу, испитано је да ли mMSCs утичу на продукцију цитокина и фенотипске и функционалне карактеристике главних ефекторских ћелија у јетри на исти начин на који су на ове процесе утицале у Con A хепатитису.

Мерењем цитокина у серуму 2 сата након интравенске примене α -GalCer (50 μ g/kg TT) (Графикон 4), утврђено је статистички значајно смањење концентрације TNF- α ($p < 0.05$), IFN- γ ($p < 0.05$) и IL-4 ($p < 0.05$) у серуму мишева који су примили 5×10^5 mMSCs, у поређењу са мишевима којима је дат само α -GalCer. Као што се може видети на графикону 4, није било статистичке разлике ($p > 0.05$) у концентрацији IL-10 између испитиваних група.

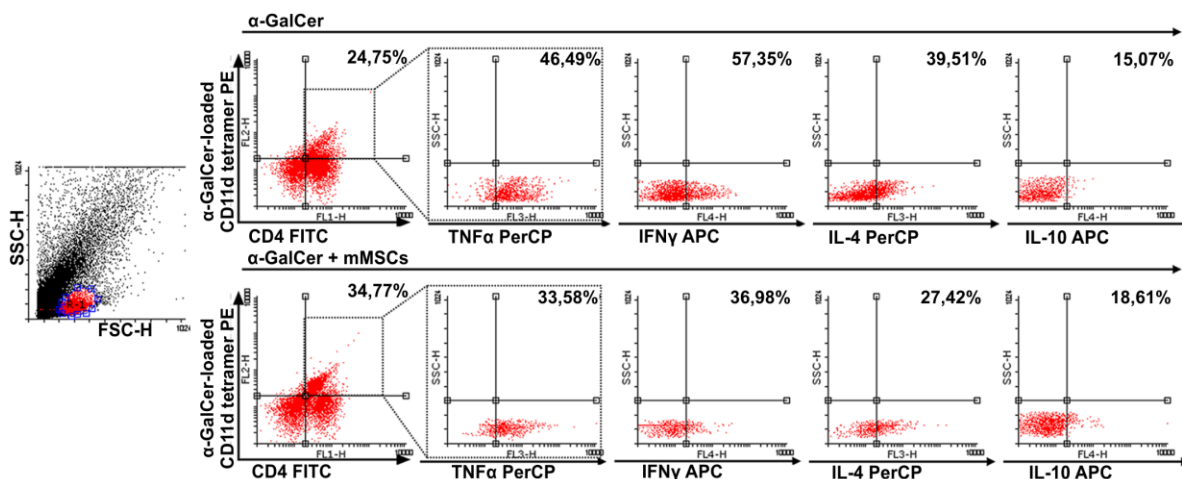


Графикон 4. Серумске вредности цитокина након примене α -GalCer-a и mMSCs. Концентрација серумског TNF alpha, INF- γ и IL-4 је статистички значајно мања код мишева који су после α -GalCer-a интравенски примили 5×10^5 mMSCs у поређењу са мишевима којима је дат само α -GalCer. Не постоји статистички значајна разлика у концентрацији серумског IL-10 између експерименталних група. Серумска концентрација цитокина је мерена 2 сата након интравенске апликације α -GalCer-a ($50\mu\text{g/kg}$ TT). Представљени резултати 2 експеримента са најмање 8 мишева по групи (средња вредност \pm SE; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4.3.2. mMSCs смањују број интрахепатичних NKT ћелија које продукују проинфламацијске цитокине

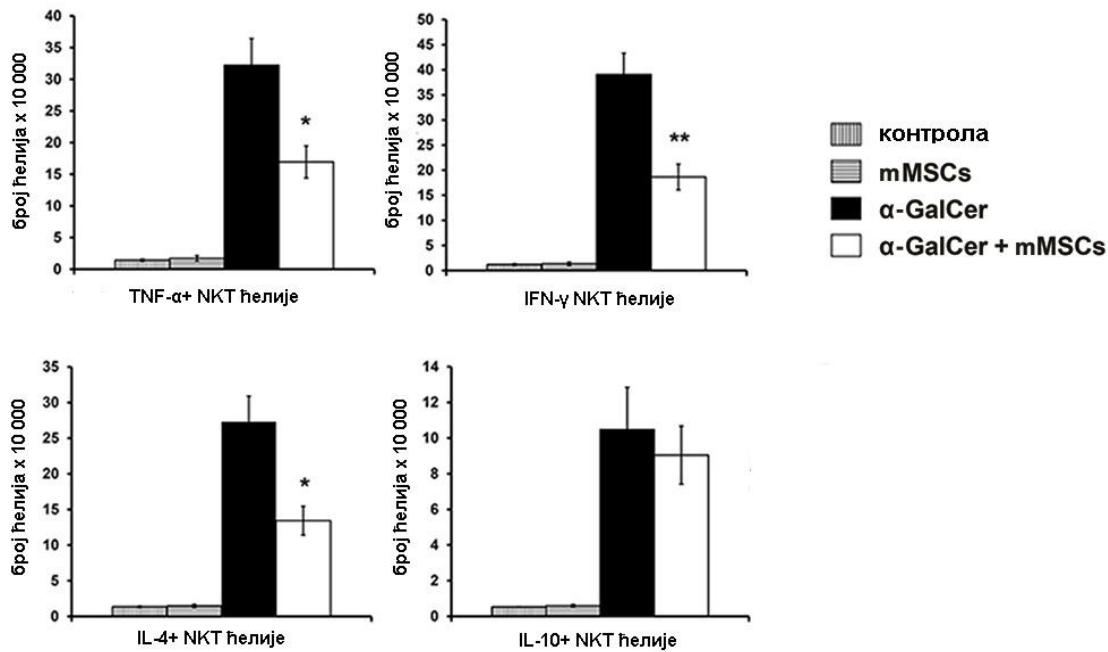
Након што је уочено да у серуму мишева који су примили α -GalCer и mMSCs постоји значајна разлика у концентрацији цитокина у односу на мишове којима је дат само α -GalCer (Графикон 4), проточном цитометријом су анализирани фенотипске и функционалне карактеристике ћелија имунског система које имају важну улогу у патогенези фулминантног хепатитиса.

Као што је приказано на слици 15, посматрајући процентуалну заступљеност цитокин-продукујућих NKT ћелија у јетри 2 сата након интравенске апликације α -GalCer ($50\mu\text{g/kg}$ TT), примена mMSCs (5×10^5) значајно је смањила инфлукс NKT ћелија које продукују TNF- α ($p < 0.05$), INF- γ ($p < 0.01$) и IL-4 ($p < 0.05$) (Слика 15). Између експерименталних група није било значајне разлике ($p > 0.05$) у броју NKT ћелија које продукују IL-10 (Слика 15).



Слика 15. Смањена процентуална заступљеност инфламацијских NKT ћелија у јетри мишева са α -GalCer хепатитисом којима су апликоване mMSCs. NKT ћелије изоловане из јетре су анализирани проточном цитометријом. Репрезентативни плотови приказују процентуалну заступљеност NKT ћелија које продукују TNF- α , IFN- γ , IL-4 и IL-10 у јетри мишева којима је апликован само α -GalCer (50 μ g/kg TT) или α -GalCer и mMSCs (5×10^5).

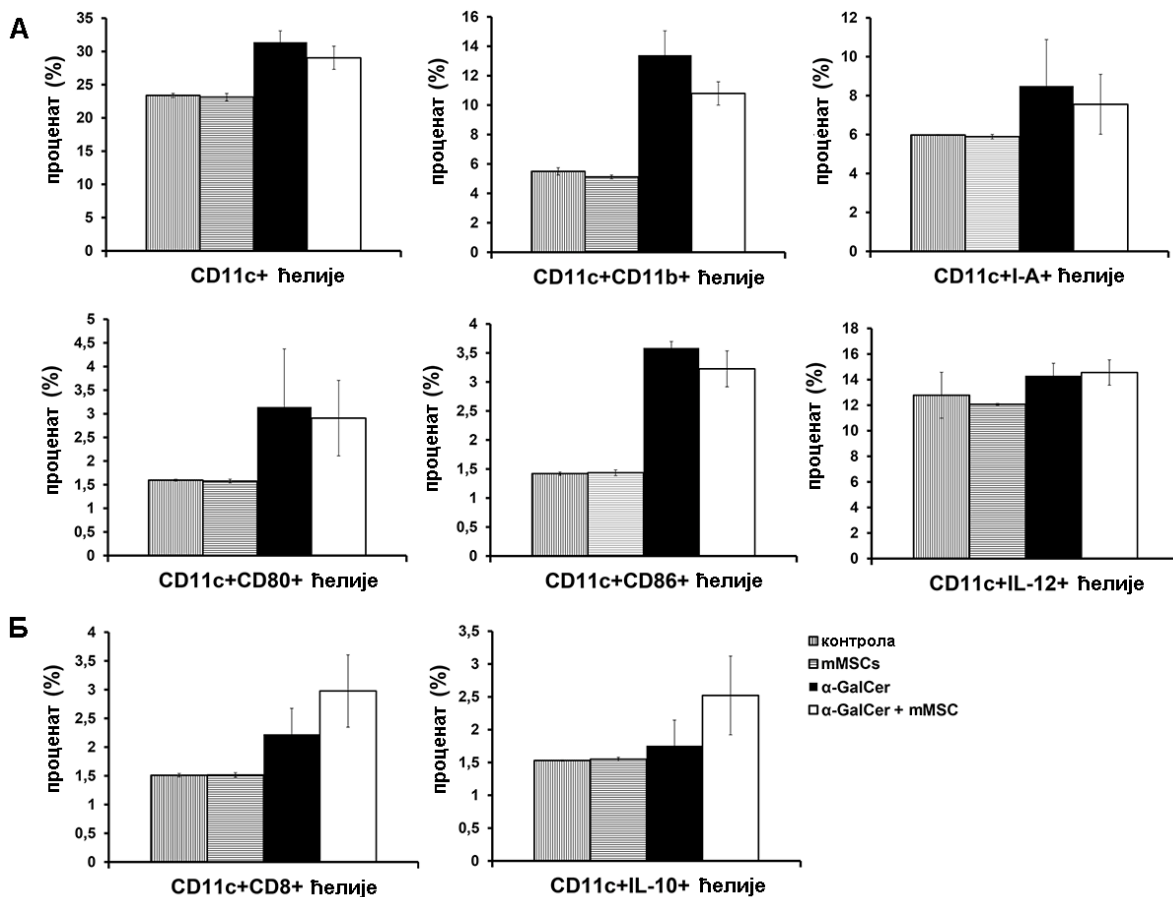
Забележене разлике у процентуалној заступљености различитих популација NKT ћелија постојале су и када је анализиран апсолутни број тих популација у узорцима, па је тако број NKT ћелија које продукују TNF- α , IFN- γ и IL-4 у мишева који су након α -GalCer (50 μ g/kg TT) примили mMSCs (5×10^5) био статистички значајно ($p < 0.05$) мањи него у јетри мишева којима је апликован само α -GalCer. Разлика у апсолутном броју NKT ћелија које продукују IL-10 у јетри мишева са хепатитисом није достигла статистичку значајност након третмана MSCs ($p > 0.05$) (Фигура 4).



Фигура 4. Број NKT ћелија које продукују цитокине у јетри мишева којима су апликовани α -GalCer и mMSCs. Статистички значајно мањи број NKT ћелија које продукују TNF- α , IFN- γ и IL-4 у јетри мишева којима су дате mMSCs (5×10^5). Резултати 2 експеримента са најмање 8 мишева по групи (средња вредност +/- SE; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

4.3.3. Примена mMSCs не мења заступљеност дендритских ћелија у јетри мишева којима је хепатитис изазван α -GalCer-ом

У даљем току истраживања је уочено да примена mMSCs (5×10^5) не утиче значајно на присуство, фенотипске и функционалне карактеристике инфламацијских CD11c⁺ дендритских ћелија које експримирају CD11b, MHC молекуле II класе, ко-стимулаторне молекуле CD80 и CD86, нити дендритских ћелија које продукују IL-12 у јетри мишева са α -GalCer хепатитисом (Фигура 5). Међу експерименталним групама није било статистички значајне разлике ($p > 0.05$) ни у броју регулаторних дендритских ћелија, дефинисаних као CD11c⁺CD8⁺ ћелије које продукују IL-10 (Фигура 5), што указује да су mMSCs модулирале продукцију цитокина директно у NKT ћелијама, независно од дендритских ћелија.

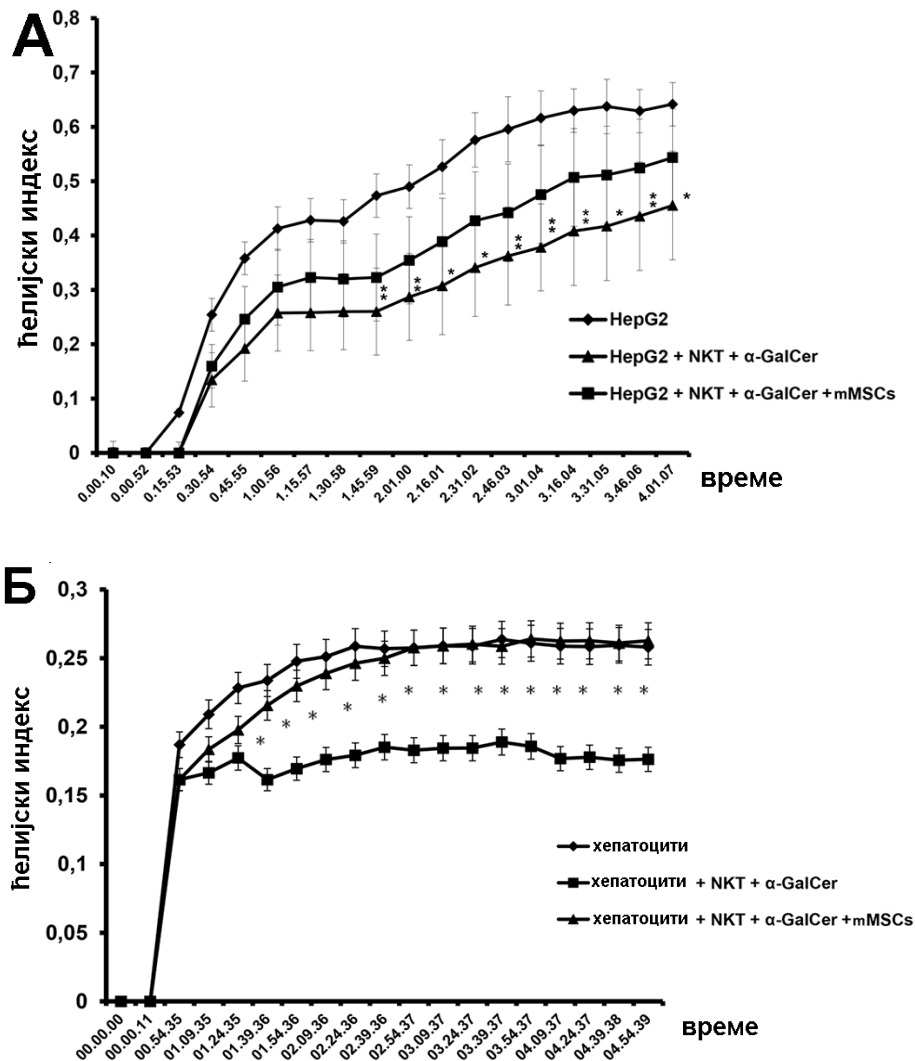


Фигура 5. У α -GalCer хепатитису, примена mMSCs не утиче значајно на фенотип интрахепатичних дендритских ћелија. Не постоји разлика ($p > 0.05$) у процентуалној заступљености (А) инфламацијских и (Б) регулаторних дендритских ћелија у јетри мишева којима су дати α -GalCer ($50 \mu\text{g}/\text{kg}$ ТТ) и 5×10^5 mMSCs, у поређењу са мишевима који су примили само α -GalCer. Резултати 2 експеримента са најмање 8 мишева по групи (средња вредност \pm SE).

4.3.4. Интравенска апликација mMSCs смањује цитотоксичку активност NKT ћелија јетре

Пошто је у јетри оболелих мишева који су примили mMSCs показана јасна разлика у броју инфламацијских NKT ћелија, која није праћена разликом у броју активираних дендритских ћелија, у даљем току истраживања у циљу откривања механизма хепатопротективног ефекта mMSCs у NKT-посредованом хепатитису, анализиран је ефекат mMSCs на хепатотоксичност NKT ћелија. Цитотоксичност NKT ћелија јетре испитана је у 48-часовној култури са ћелијама хепатоцелуларног карцинома односно мишјим хепатоцитима (таргет ћелије), у односу ефектор: таргет 10:1, коришћењем xCELLigence система (Фигура 6).

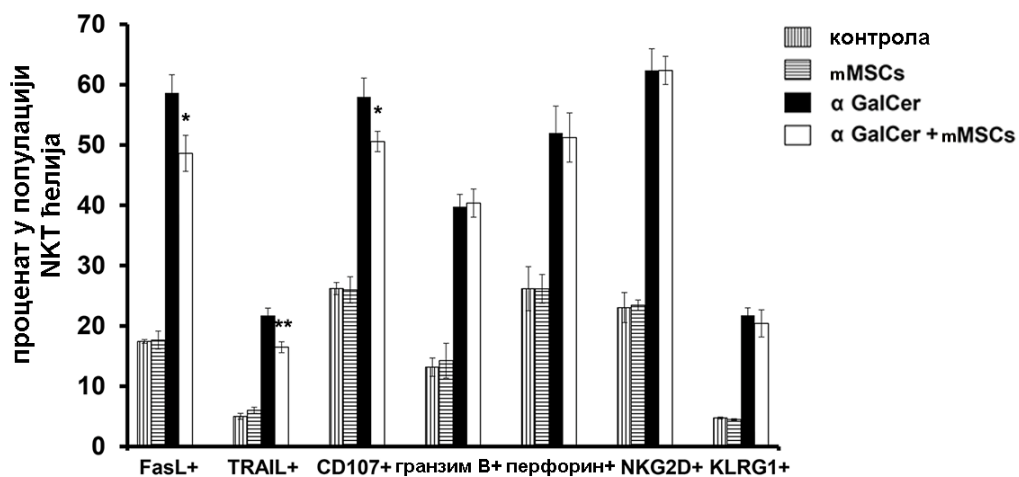
На фигури 6 је приказано да NKT ћелије изоловане магнетном сепарацијом из јетри мишева који су након α -GalCer примили mMSCs показују значајно ($p < 0.05$) мању цитотоксичку активност према HepG2 ћелијама (А) хепатоцитима (Б) у поређењу са NKT ћелијама мишева којима је апликован само α -GalCer. Ова разлика је статистички убедљивија од другог сата кокултивације. Смањен убилачки потенцијал NKT ћелија је највероватније последица имуномодулаторних активности убризганих mMSCs.



Фигура 6. Системска апликација mMSCs смањује цитотоксичку активност NKT ћелија јетре према HepG2 туморским ћелијама. Цитотоксичка активност NKT ћелија према (А) HepG2 таргет ћелијама и (Б) хепатоцитима испитивана је xCELLigence системом у трајању од 48 сати, однос ефектор: таргет 10:1. Резултати су представљени кроз ћелијски индекс таргет ћелија у реалном времену. Хепатотоксичност NKT ћелија изолованих из јетри мишева који су примили, α -GalCer (50 μ g/kg TT) и 5×10^5 mMSCs је значајно мања у поређењу са хепатотоксичношћу NKT ћелија изолованих из јетри мишева који су примали само α -GalCer. Приказане вредности су средње вредности \pm SE; * $p < 0.05$, најмање 8 мишева по групи.

4.3.5. Примена mMSCs значајно смањује експресију FasL, TRAIL и CD107, али не утиче на експресију перфоруина, гранзимаВ, NKG2D и KLRG1 на интрахепатичним NKT ћелијама

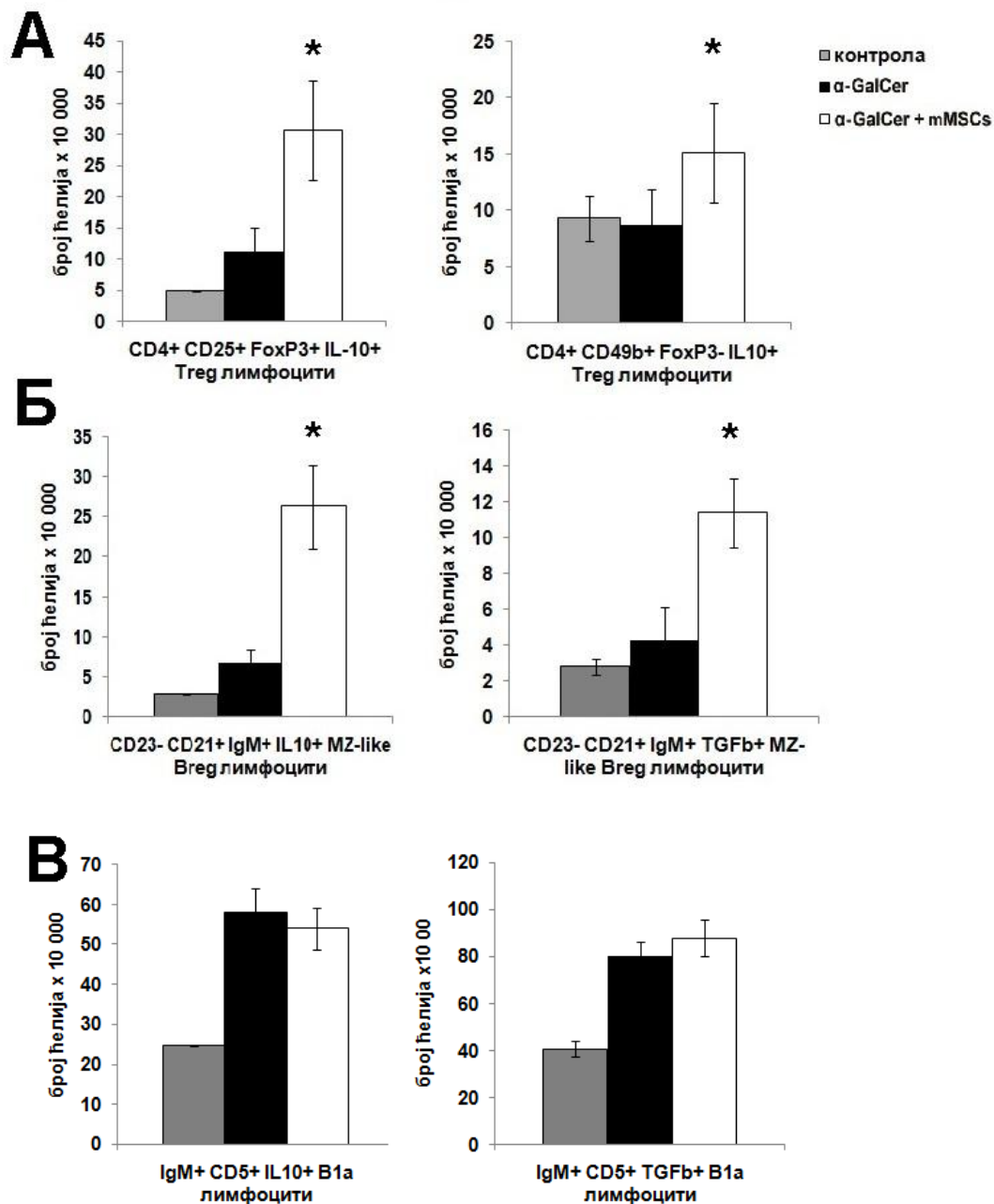
Са циљем да се дефинишу могући разлози смањене цитотоксичке активности NKT ћелија, следећи корак у истраживању био је да се испита функционални фенотип NKT ћелија у јетри мишева обе експерименталне групе. У оквиру изоловане популације NKT ћелија јетре, анализирана је експресија FasL, TRAIL (енгл. *TNF-related apoptosis-inducing ligand*), CD107, перфоруина, гранзима В, NKG2D и KLRG1 молекула. Резултати приказани на графикаону 5, јасно указују да мишеви који су након α -GalCer (50 μ g/kg TT) примили 5×10^5 mMSCs имају смањену процентуалну заступљеност лигананда који индукују апоптозу, FasL ($p < 0.05$) и TRAIL ($p < 0.01$), као и дегранулационог маркера CD107 ($p < 0.05$) на NKT ћелијама јетре у поређењу са мишевима који су примили само α -GalCer (Графикон 5). Истовремено, није постојала статистички значајна разлика ($p > 0.05$) у процентуалној заступљености цитотоксичких медијатора (перфоруина и гранзима В), као ни рецептора (NKG2D и KLRG1) исказаних на NKT ћелијама јетре између експерименталних група (Графикон 5).



Графикон 5. Примена mMSCs смањује процентуалну заступљеност FasL, TRAIL и CD107 на NKT ћелијама, али не утиче на заступљеност перфоруина, гранзима В, NKG2D и KLRG1 на NKT ћелијама у јетри мишева. Мишеви који су након α -GalCer примили 5×10^5 mMSCs, имају смањен проценат FasL, TRAIL и CD107 на NKT ћелијама у поређењу са мишевима који су примили само α -GalCer (50 μ g/kg TT). Истовремено, не постоји статистички значајна разлика у процентуалној заступљености перфоруина, гранзима В, NKG2D и KLRG1 на NKT ћелијама између експерименталних група. Приказане вредности су средње вредности +/- SE; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

4.3.6. Примена mMSCs повећава број регулаторних лимфоцита у јетри мишева којима је изазван фулминанти хепатитис

Познато је да MSCs повећавају експресију транскрипционог фактора FoxP3 у лимфоцитима и промовишу настанак и експанзију CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg лимфоцита који продукују IL-10⁺ (266, 267). Анализом фенотипа моноклеарних ћелија које су инфилтрисале јетре мишева који су примили само α -GalCer (50 μ g/kg TT) односно α -GalCer и 5 x 10⁵ mMSCs, уочено је да апликација mMSCs значајно повећава присуство регулаторних ћелија у јетри. Као што се може видети на графикону, статистички значајно ($p < 0.05$) већи број CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg лимфоцита који продукују IL-10 и CD4⁺CD49b⁺FoxP3⁻ лимфоцита који продукују IL-10 инфилтрисао је јетре мишева који су примили mMSCs 2 сата након апликовања α -GalCer, у поређењу са мишевима којима је дат само α -GalCer (Фигура 7А). Уз то, убризгавање mMSCs узроковало је статистички значајно ($p < 0.05$) повећање апсолутног броја CD23⁻CD21⁺IgM⁺ MZ-like B лимфоцита који продукују IL-10 и TGF- β у јетри мишева са хепатитисом (Фигура 7Б). Међутим, између експерименталних група није било разлике у броју перитонеалних B1a регулаторних IgM⁺CD5⁺ лимфоцита који продукују IL-10 и TGF- β нити у броју перитонеалних IgM⁺CD5⁻ B1b регулаторних лимфоцита (Фигура 7В).



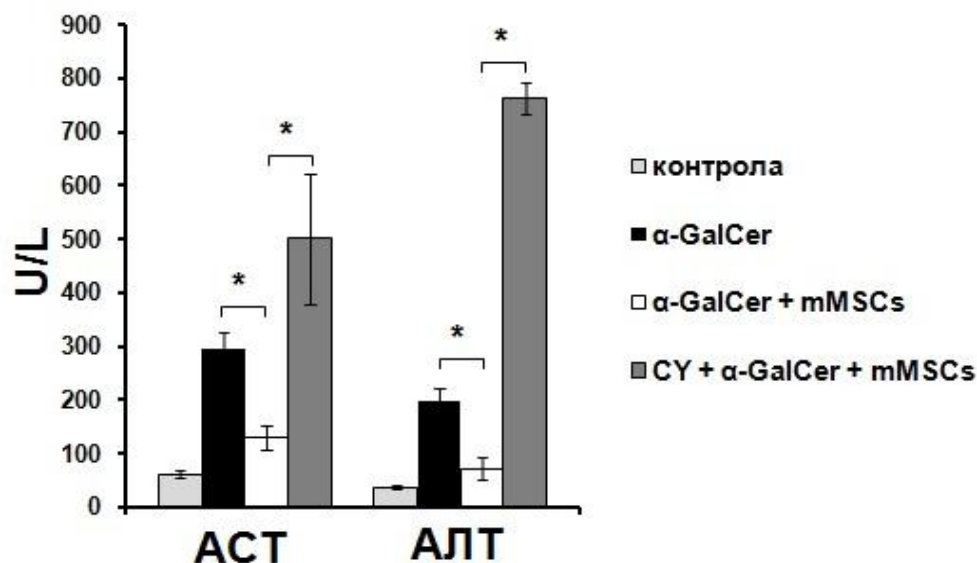
Фигура 7. Примена mMSCs повећава број регулаторних лимфоцита у јетри мишева којима је изазван хепатитис. Мишеви који су након α-GalCer примили mMSCs, имају већи број CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺IL-10⁺ и CD4⁺CD49b⁺FoxP3⁻IL-10⁺ Treg лимфоцита, као и број CD23⁻CD21⁺IgM⁺ MZ-like B лимфоцита који продукују IL-10 и TGF-β у односу на мишеве који су примили само α-GalCer. Не постоји статистички значајна разлика у броју перитонеалних B1a (IgM⁺CD5⁺) и B1b (IgM⁺CD5⁻) регулаторних лимфоцита између експерименталних група. Приказане вредности су средње вредности +/- SE; * p<0.05.

Добијени налази сугеришу да повећавање броја *MZ-like* В регулаторних и Treg лимфоцита у инфламираној јетри промовише стварање имуносупресивне микросредине и може бити један од механизма који се налази у основи хепатопротективног ефекта mMSCs у акутном оштећењу јетре у коме су NKT ћелије главне ефекторске ћелије.

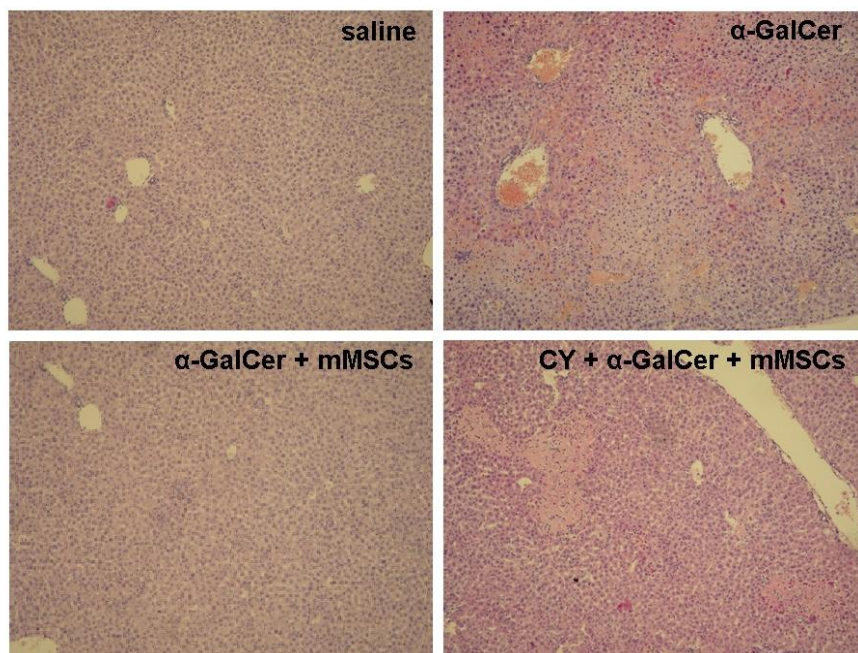
4.3.7. Деплеција Treg лимфоцита циклофосфамидом значајно смањује капацитет mMSCs да редукују оштећење јетре узроковано активацијом NKT ћелија

Да би се испитао значај Treg лимфоцита за имуносупресивни ефекат mMSCs у акутном оштећењу јетре које је изазвано активацијом NKT ћелија, мишевима је пре индукције болести циклофосфамидом деплетирана ова популација лимфоцита.

Концентрација трансаминаза у серуму мишева експерименталних група и патохистолошка анализа ткива јетре су показале да недостатак Treg лимфоцита укида хепатопротективни ефекат mMSCs у хепатитису који је изазван α -GalCer-ом. Као што је приказано на графикону 6, концентрација АСТ и АЛТ је статистички значајно ($p < 0.05$) већа у серуму мишева који су 72 сата пре α -GalCer-а и MSCs примили СУ, у поређењу са мишевима третираним α -GalCer-ом и mMSCs којима нису деплетирани протективни Treg лимфоцити. У складу са биохемијским налазом, на патохистолошким исечцима јетри мишева којима недостају Treg лимфоцити, јасно се уочавају велика поља некрозе хепатоцита и масовна инфилтрација инфламацијским ћелијама (Слика 16).



Графикон 6. Концентрација трансаминаза у серуму мишева након примене CY, α -GalCer и mMSCs. Постоји статистички значајан пораст АСТ и АЛТ у серуму мишева који су интравенски примили CY пре α -GalCer-а и mMSCs у поређењу са мишевима којима није дат CY. Представљени резултати 2 експеримента са 8 мишева по групи (средња вредност +/- SE; * $p < 0.05$).

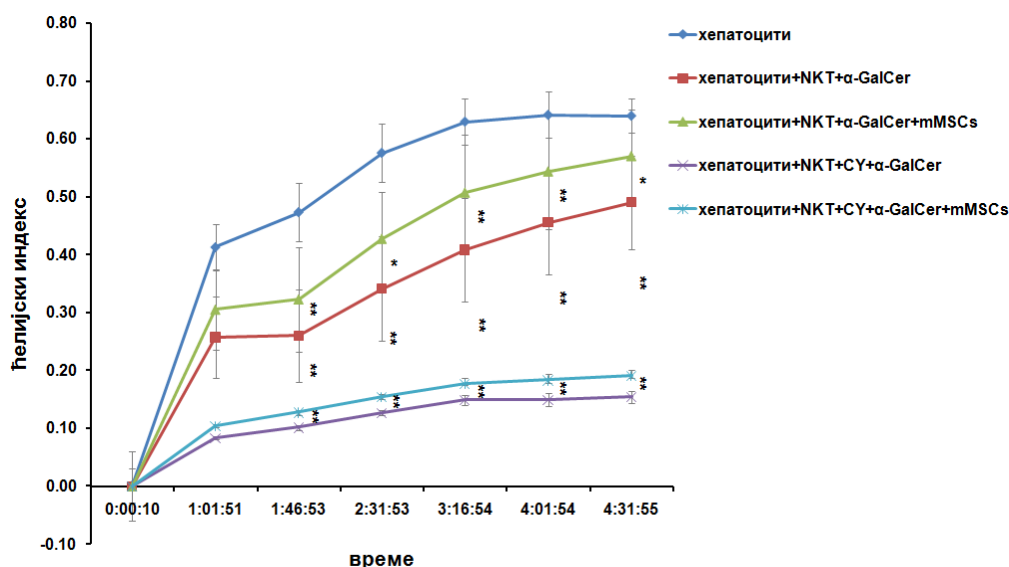


Слика 16. Репрезентативни исечци јетре мишева након примене CY. Стандарно патохистолошко бојење (H&E), увећање x 100.

4.3.8. Супресија хепатотоксичности NKT ћелија мезенхималним матичним ћелијама је значајно смањена након деплеције Treg лимфоцита

Налаз значајно већег оштећења јетре као и веће серумске концентрације трансаминаза у мишева са хепатитисом којима су пре примене mMSCs деплетирани Treg лимфоцити, навели су на претпоставку да недостатак Treg лимфоцита смањује имуномодулаторни ефекат mMSCs на NKT ћелије јетре. Зато је цитотоксичност NKT ћелија испитивана у 48-часовној култури са мишјим хепатоцитима (таргет ћелије), у односу ефектор: таргет 10:1, коришћењем xCELLigence система.

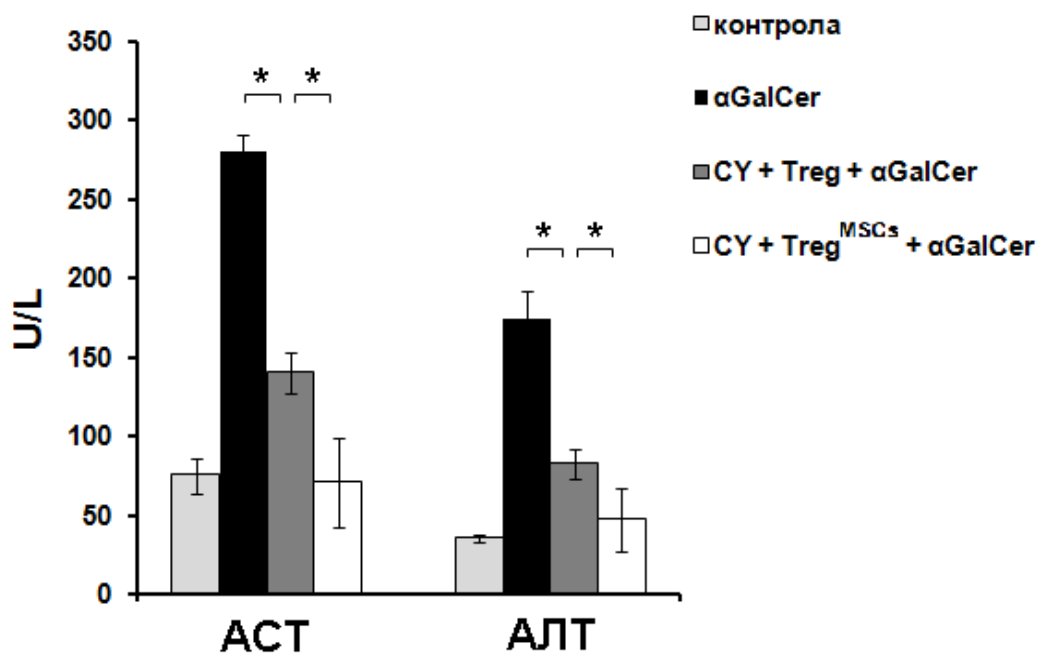
На графикону 7 је приказано да NKT ћелије изоловане магнетном сепарацијом из јетри мишева који су након α -GalCer-а примили mMSCs показују статистички значајно ($p < 0.05$) мању цитотоксичку активност у односу на NKT ћелије мишева којима су пре примене α -GalCer и mMSCs деплетирани Treg лимфоцити. Дакле, смањен убилачки потенцијал NKT ћелија је највероватније последица не само директних имуномодулаторних активности убризганих mMSCs на NKT ћелије, већ и индиректног ефекта на ове ћелије посредством Treg лимфоцита.



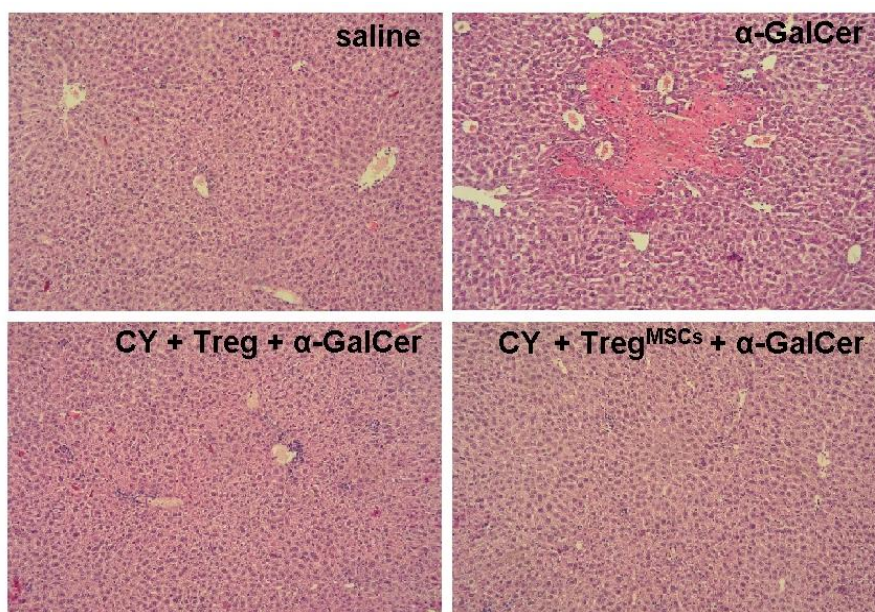
Графикон 7. Системска апликација CY смањује имуномодулаторни утицај mMSCs на NKT ћелије јетре. Цитотоксичка активност NKT ћелија према хепатоцитима испитивана је xCELLigence системом у трајању од 48 сати, однос ефектор: таргет 10:1. Резултати су представљени кроз ћелијски индекс таргет ћелија у реалном времену. Хепатотоксичност NKT ћелија изолованих из јетри мишева који су примили, CY (10 mg/kg TT), α -GalCer (50 μ g/kg TT) и 5×10^5 mMSCs је значајно већа у поређењу са хепатотоксичношћу NKT ћелија изолованих из јетри мишева којима нису деплетирани Treg лимфоцити. Приказане вредности су средње вредности +/- SE; * $p < 0.05$, најмање 8 мишева по групи.

Како би се потврдило да је повећање броја Treg лимфоцита у јетри животиња са хепатитисом један од кључних механизма имуномодулаторног ефекта mMSCs у акутном оштећењу јетре, извршен је адоптивни трансфер регулаторних ћелија. Мишеви којима су деплетирани Treg лимфоцити, су 24h пре индукције хепатитиса α -GalCer-ом, примили Treg односно Treg лимфоците претходно кокултивисане у *transwell* систему са mMSCs (Treg^{MSCs}).

У експерименталној групи којој су након CY и индукције хепатитиса убризгани Treg^{MSCs}, забележени су статистички значајно ($p < 0.05$) смањење серумских трансаминаза и значајно мања некроза и инфилтрација мононуклеарним ћелијама у јетри, у односу на ове параметре оштећења јетре у мишева којима су убризгани Treg лимфоцити, као и у односу на мишеве којима је апликовани само α -GalCer (Графикон 8, слика 17). Добијени резултати сугеришу да mMSC паракриним механизмом значајно поспешују анти-инфламаторне ефекте Treg лимфоцита у акутном оштећењу јетре узрокованом активацијом NKT ћелија.



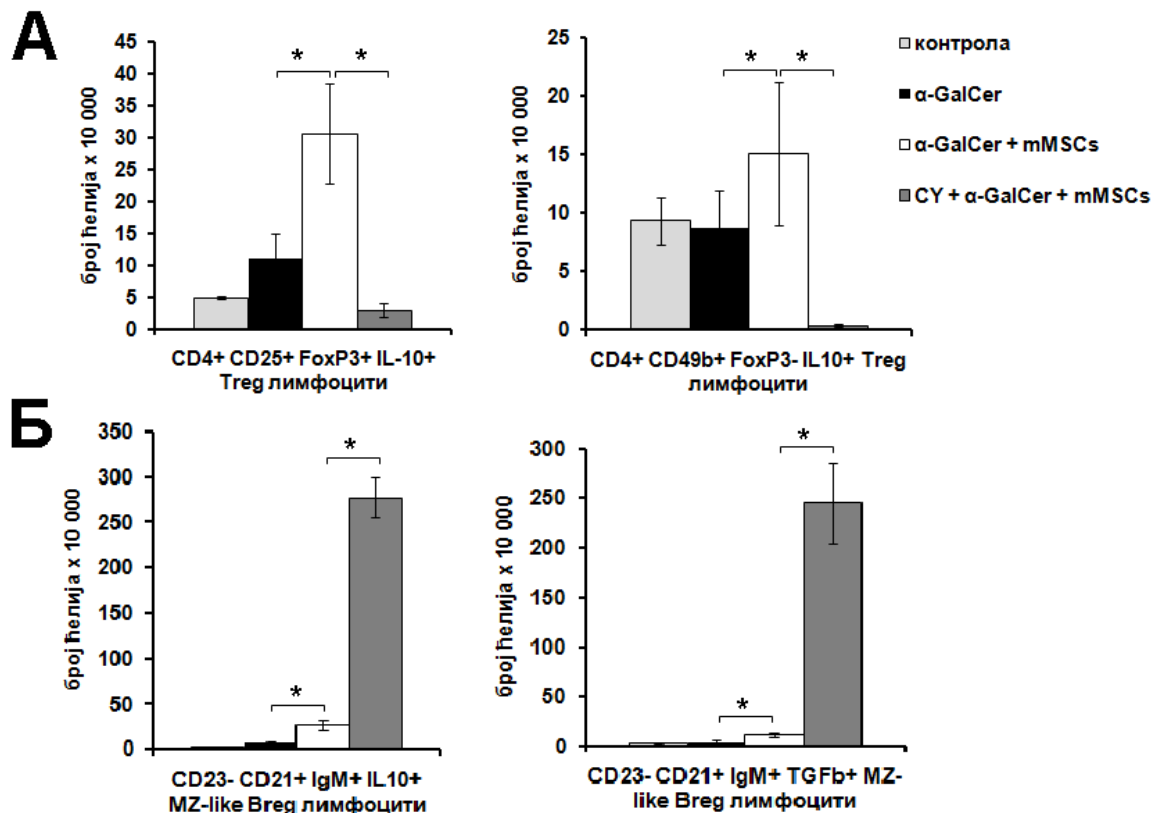
Графикон 8. Концентрација трансаминаза у серуму мишева са хепатитисом након адоптивног трансфера регулаторних лимфоцита. Концентрација трансаминаза (АСТ и АЛТ) је статистички значајно мања у серуму мишева којима је након примене CY (10 mg/kg TT) и α -GalCer (50 μ g/kg TT) извршен адоптивни трансфер Treg лимфоцита кокултивисаних са mMSCs (Treg^{MSCs}), у поређењу са мишевима којима су апликовани Treg лимфоцити. Представљени резултати 2 експеримента са најмање 10 мишева по групи (средња вредност +/- SE; * $p < 0.05$).



Слика 17. Репрезентативни исечци јетре мишева након примене CY. Стандарно патохистолошко бојење (H&E), увећање x 100.

4.3.9. Примена mMSCs компензаторно повећава број Vreg лимфоцита у јетри оболелих мишева којима су деплетирани Treg лимфоцити

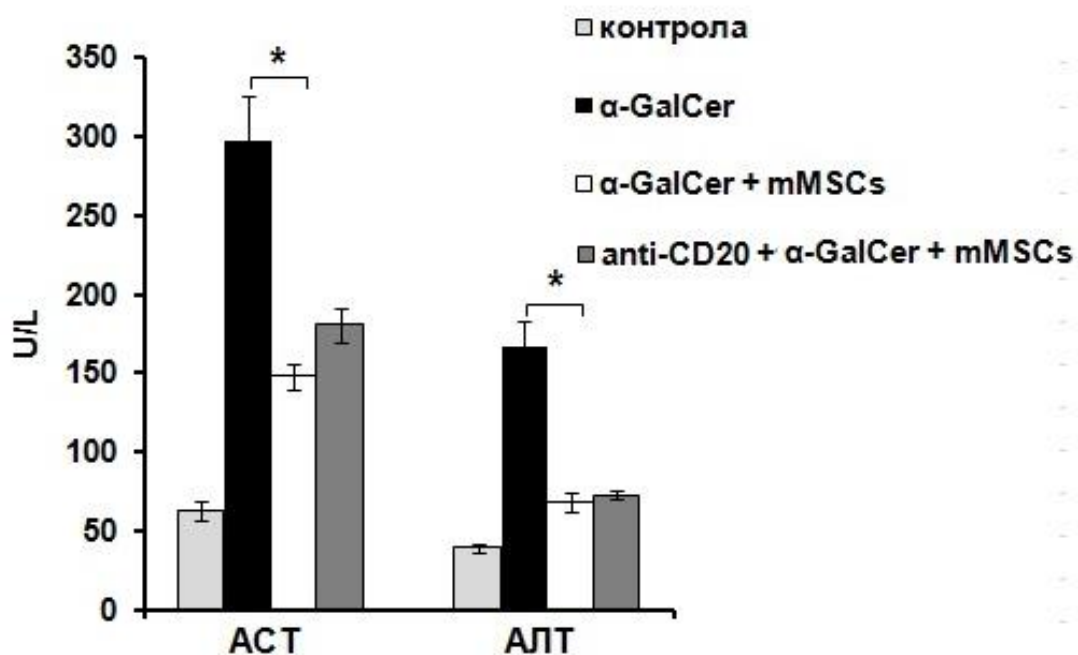
Интересантно, апликација mMSCs мишевима којима су деплетирани Treg лимфоцити (Фигура 8А), узрокује веће присуство Vreg лимфоцита у јетру мишева којима је изазван фулминантни хепатитис. Забележен је статистички значајно ($p < 0.05$) већи број $CD23^- CD21^+ IgM^+$ *MZ-like* Vreg лимфоцита у јетри животиња којима је пре α -GalCer-а и mMSCs дат CY (Фигура 8Б), међутим, јасно је да овај, вероватно компензаторни, пораст броја хепатичких Vreg лимфоцита није ублажио оштећење јетре (Графикон 6, слика 16).



Фигура 8. Примена mMSCs код мишева са хепатитисом без Treg лимфоцита значајно повећава број Breg лимфоцита у јетри. Мишеви који су пре α-GalCer-а и mMSCs примили CY, имају већи број CD23⁻CD21⁺IgM⁺ MZ-like Breg лимфоцита који продукују IL-10 и TGF-β у односу на мишеве којима нису деплетирани Treg лимфоцити. Приказане вредности су средње вредности +/- SE; * p<0.05.

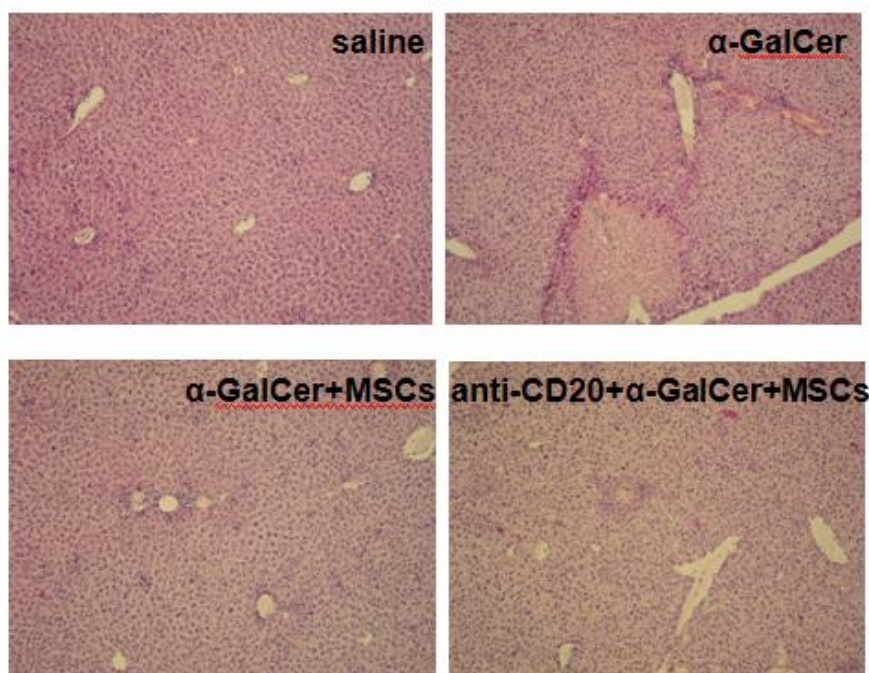
4.3.10. Недостатак Breg лимфоцита не утиче на хепатопротективан ефекат mMSCs у фулминантном хепатитису

У циљу испитивања значаја Breg лимфоцита за терапијске ефекте mMSCs у хепатитису изазваном α-GalCer-ом, експерименталним животињама су, применом anti-CD20 антитела, деплетирани Breg лимфоцити. Недостатак ових ћелија није значајно утицао на капацитет mMSCs да редукују акутно оштећење јетре (Графикон 9, слика 18). Као што се уочава на графикону 8, mMSCs су смањиле концентрације трансаминаза (p<0.05) у серуму мишева којима је пре апликације α-GalCer-а деплетирана популација Breg лимфоцита у сличној мери као у мишева са хепатитисом којима није апликовано anti-CD20 антитело (Графикон 9).



Графикон 9. Концентрација трансминаза у серуму мишева након примене anti-CD20, α -GalCer и mMSCs. Нема статистички значајне разлике у концентрацији АСТ и АЛТ у серуму мишева који су интравенски примили anti-CD20 пре α -GalCer-а и mMSCs, у поређењу са мишевима којима није дато anti-CD20 антитело. Представљени резултати 2 експеримента са 8 мишева по групи (средња вредност +/- SE; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

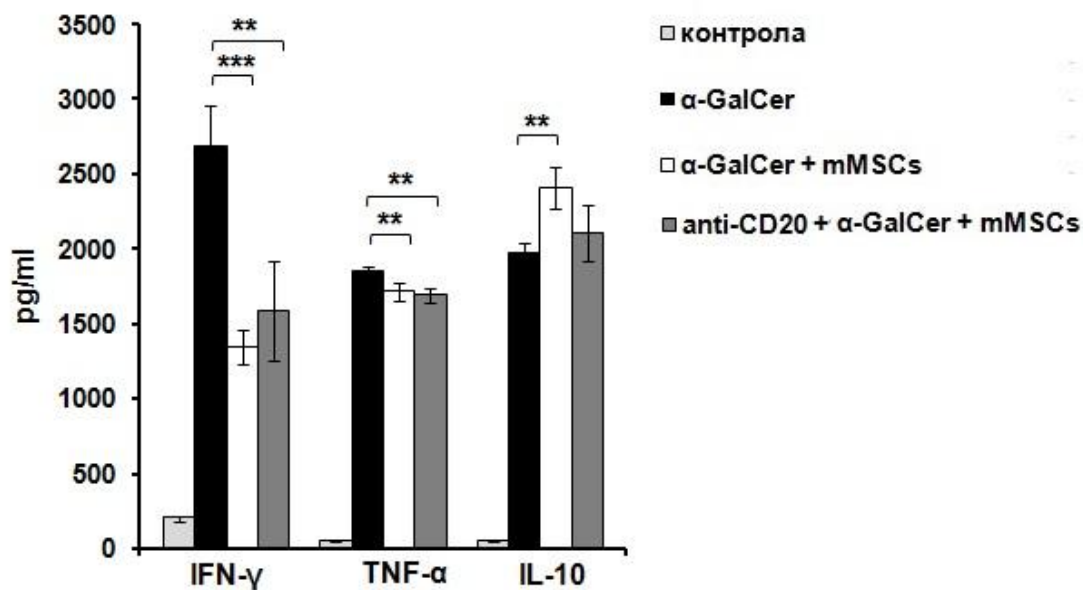
Патохистолошком анализом је потврђено да протективни ефекат mMSCs у фулминантном хепатитису не зависи од Vreg лимфоцита (Слика 18). На препаратима јетри оболелих мишева са/без Vreg лимфоцита који су примили mMSCs уочавају се смањена инфилтрација инфламацијским ћелијама као и мања поља некрозе у односу на мишеве којима је апликован само α -GalCer (Слика 18).



Слика 18. Репрезентативни исечци јетре мишева након примене anti-CD20 антитела. Стандарно патохистолошко бојење (H&E), увећање x 100.

Статистички значајно смањење концентрације проинфламацијских цитокина IFN- γ ($p < 0.01$) и TNF- α ($p < 0.01$) је забележено у серуму мишева којима су пре интравенске примене α -GalCer и mMSCs деплетирани Breg лимфоцити у поређењу са мишевима којима је дат само α -GalCer (Графикон 10). Није било статистичке разлике ($p > 0.05$) у концентрацији IL-10 у серуму животиња поменутих експерименталних група.

Такође, на графикону се јасно уочава и да нема статистички значајне разлике у концентрацији IFN- γ и TNF- α ($p > 0.05$) у серуму животиња којима су пре примене α -GalCer и mMSCs деплетирани Breg лимфоцити, у односу на групу која није примила anti-CD20 антитело (Графикон 10). Ови налази сугеришу да Breg лимфоцити нису од кључне важности за постизање терапијског ефекта mMSCs у фулминатном хепатитису.

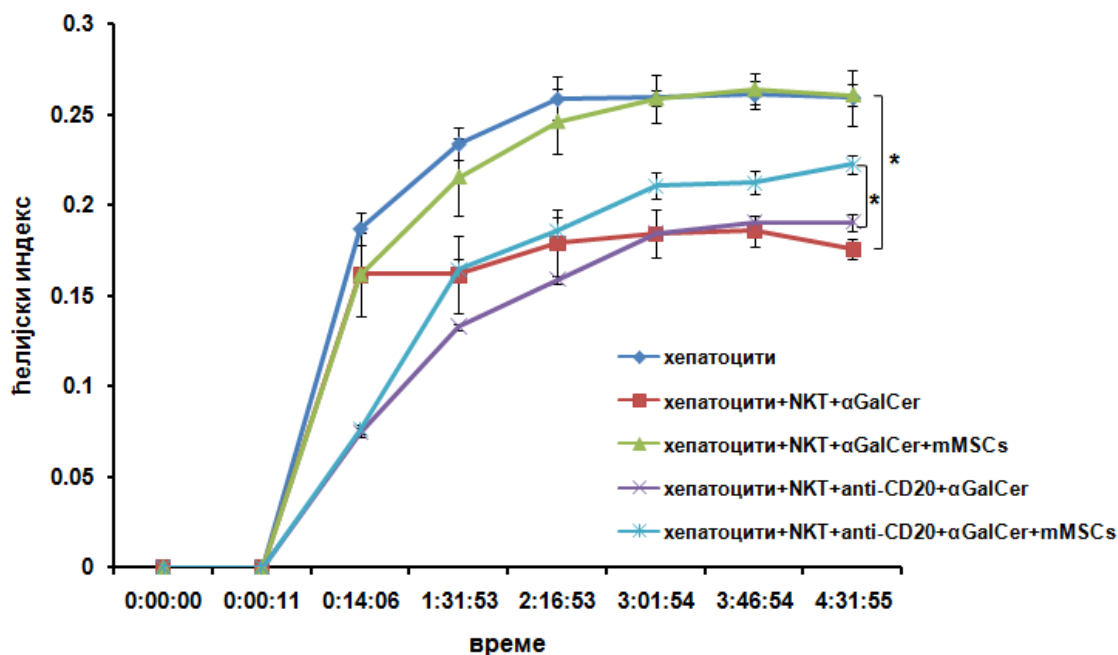


Графикон 10. Серумске вредности цитокина након примене mMSCs у мишева без Breg лимфоцита којима је индукован хепатитис. Концентрација серумског IFN-γ и TNF-α је статистички значајно мања код мишева који су после anti-CD20 антитела интравенски примили α-GalCer и mMSCs у поређењу са мишевима којима је дат само α-GalCer. Не постоји статистички значајна разлика у концентрацији серумског IL-10 између експерименталних група. Нема значајне разлике у концентрацији цитокина између мишева са и без Breg лимфоцита којима су непосредно након изазивања хепатитиса дате mMSCs. Серумска концентрација цитокина је мерена 2 сата након интравенске апликације α-GalCer-a (50μg/kg TT). Представљени резултати 2 експеримента са најмање 8 мишева по групи (средња вредност +/- SE; * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001).

4.3.11. Деpleција Breg лимфоцита anti-CD20 антителом не утиче на супресивни ефекат mMSCs на хепатотоксичност NKT ћелија

Након што је биохемијском и патохистолошком анализом као и мерењем концентрације цитокина у серуму показано да деpleција Breg лимфоцита не мења значајно имуномодулаторни капацитет mMSCs у фулминантном хепатитису, испитан је утицај деpleције ових регулаторних ћелија на супресивни ефекат mMSCs на цитотоксичку активност NKT ћелија (Графикон 11). Није било статистички значајне разлике ($p > 0.05$) у хепатотоксичности NKT ћелија изолованих из јетри мишева који су примили α-GalCer и mMSCs у односу на NKT ћелије животиња којима су пре примене α-GalCer и mMSCs деплетирани Breg лимфоцити, што недвосмислено указује да ова

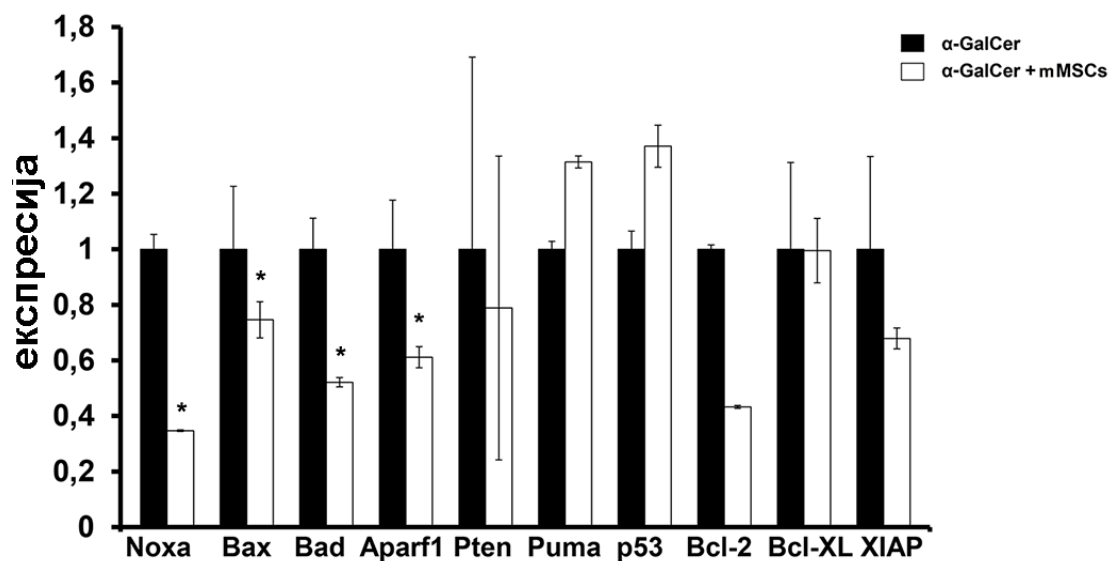
популација регулаторних лимфоцита не доприноси директно супресивном ефекту mMSCs на NKT ћелије јетре.



Графикон 11. Системска примена anti-CD20 антитела не мења имуномодулаторни утицај mMSCs на NKT ћелије јетре. Цитотоксичка активност NKT ћелија према хепатоцитима испитивана је xCELLigence системом у трајању од 48 сати, однос ефектор: таргет 10:1. Нема статистички значајне разлике у цитотоксичком потенцијалу NKT ћелија изолованих из јетри мишева којима су пре индукције хепатитиса α-GalCer (50μg/kg TT) и апликације 5 x 10⁵ mMSCs деплетирани Breg лимфоцити (anti-CD20 антитело, 10 mg/kg TT), у односу на NKT ћелије изоловане из мишева који су примили само α-GalCer (50μg/kg TT) и 5 x 10⁵ mMSCs. Приказане вредности су средње вредности +/- SE; * p<0.05, најмање 8 мишева по групи.

4.3.12. Примена mMSCs супримира проапоптотске гене

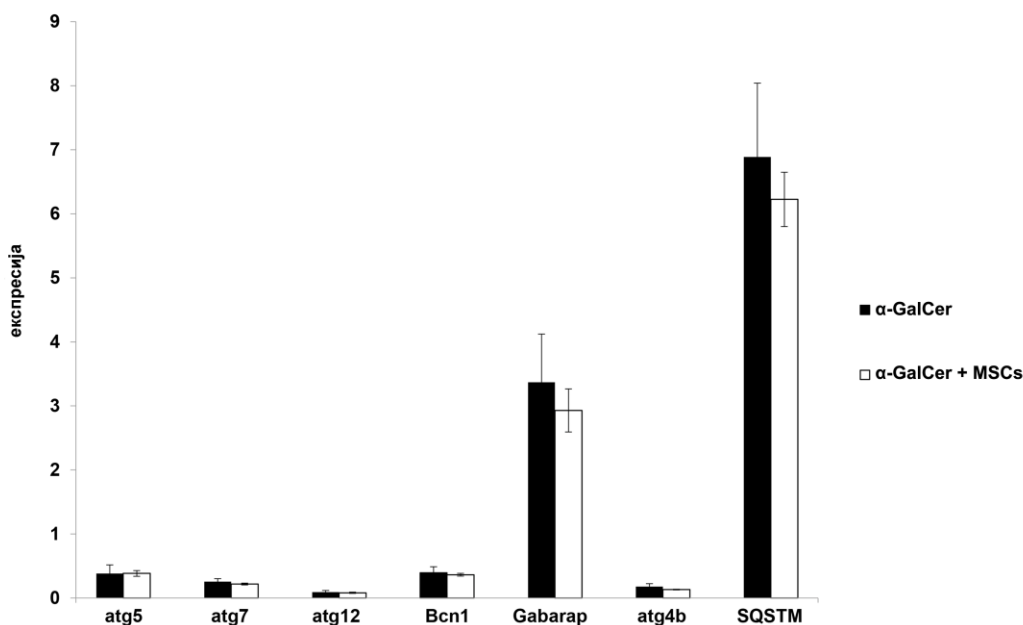
RT-PCR методом детектовано је значајно смањење нивоа iRNK за проапоптотске гене *Bax*, *Bad* и *Apafl* у хомогенатима јетре мишева који су примили 5 x 10⁵ mMSCs непосредно након α-GalCer (50μg/kg TT) у поређењу са мишевима којима је дат само α-GalCer (Графикон 12). Није било значајне разлике у нивоу iRNK за проапоптотске гене *Pten*, *Puma* и *p53* као и анти-апоптотске *Bcl-2*, *Bcl-xL* и *XIAP* између експерименталних група (Графикон 12). Ови резултати указују да mMSCs ублажавају α-GalCer хепатитис супресијом цитотоксичке активности NKT ћелија и последичним смањењем апоптотске смрти хепатоцита.



Графикон 12. RT-PCR анализа експресије проапоптотских и анти-апоптотских гена у хомогенатима јетре након примене α -GalCer и mMSCs. Експресија гена за *Bax*, *Bad* и *Apaf1* је била значајно смањена у хомогенатима јетри мишева који су примили 5×10^5 mMSCs непосредно након α -GalCer у поређењу са мишевима којима је дат само α -GalCer (50 μ g/kg TT). Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* $p < 0.05$).

Пошто је показано да mMSCs превенирају апоптозу или програмирану ћелијску смрт типа 1, у даљем низу експеримената испитивано је да ли mMSCs утичу на програмирану смрт типа 2 или аутофагију у јетри мишева којима је индукован фулминантни хепатитис.

Експресија гена чији производи регулишу процес аутофагије (*atg4b*, *atg5*, *atg7*, *atg12* и *Bcl1*) је одређивана у ткиву јетре методом PCR. Разлика у експресији ових гена није достигла статистичку значајност ($p > 0.05$) у хомогенатима јетри мишева који су примили α -GalCer и mMSCs односно само α -GalCer (Графикон 13).



Графикон 13. Експресија гена који регулишу процес аутофагије у јетри мишева са хепатитисом након апликације mMSCs. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност ± SE.

4.4. mMSCs супримирају NKT ћелије паракриним механизмом

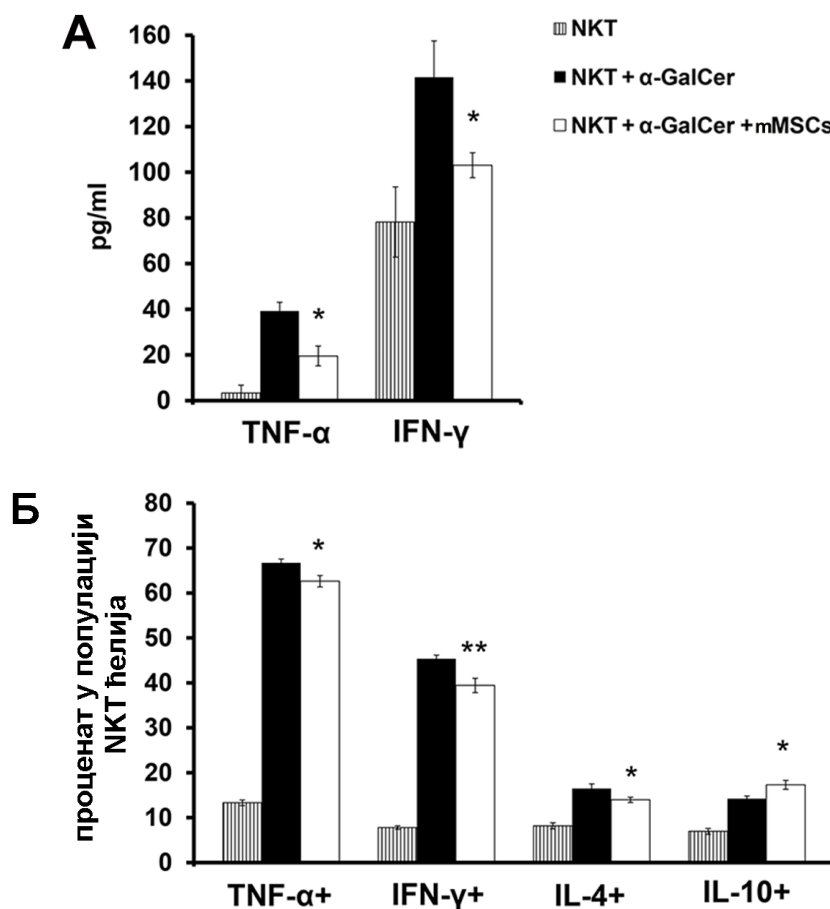
У раније публикованим истраживањима је показано да mMSCs имуносупресивно делују на ћелије имунског систем директним контактом или паракриним механизмом, продукцијом солубилних фактора (221).

Након што је уочено да интравенска апликација mMSCs код мишева са α-GalCer хепатитисом смањују цитотоксичку активност и продукцију проинфламацијских цитокина у NKT ћелијама, испитано је да ли је за имуномодулаторно дејство mMSCs на NKT ћелије јетре неопходан директан међућелијски контакт.

Најпре је у том циљу анализирана секреција цитокина *in vitro*, мерењем концентрације цитокина у супернатантима α-GalCer-ом (100 ng/ml) стимулираних NKT ћелија изолованих из јетре здравих мишева, кокултивисаних са mMSCs у *transwell* систему, у односу 10:1. Концентрација цитокина (TNF-α и IFN-γ) у супернатантима је одређивана колориметријском методом односно комерцијалним ELISA китовима специфичним за мишје цитокине, 48 сати након кокултивације. Као што је приказано на графикону, статистички значајно ($p < 0.05$) мања концентрација TNF-α и IFN-γ је измерена у супернатантима *in vitro* активираних NKT ћелија које су биле у *transwell* систему са

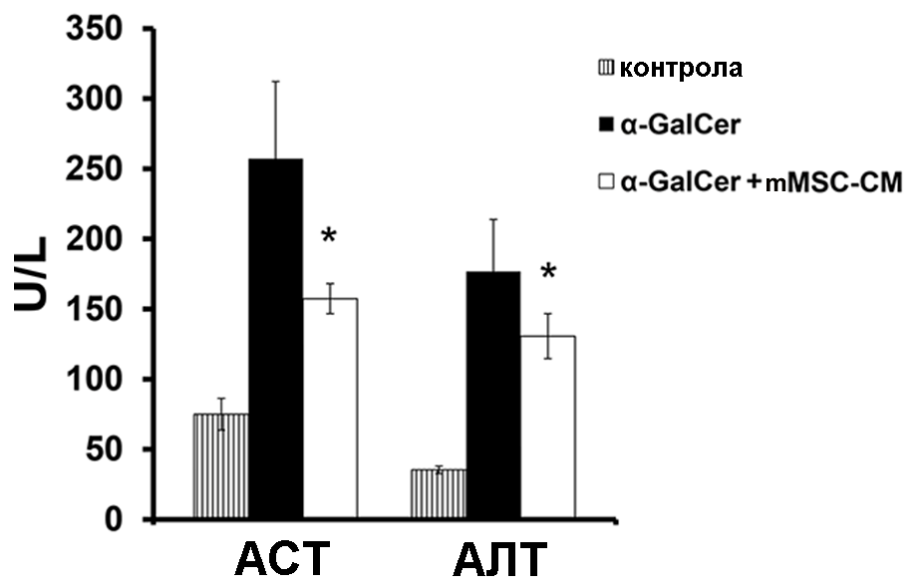
mMSCs у односу на концентрацију цитокина у супернатантима *in vitro* активираних NKT ћелија које су култивисане саме (Фигура 9А).

У стимулираним NKT ћелија јетре кокултивисаним у *transwell* систему са mMSCs на претходно описан начин, је испитана продукција TNF- α , IFN- γ , IL-4 и IL-10 проточном цитометријском анализом. Добијени подаци су показали да излагање NKT ћелија јетре солубилним факторима које продукују mMSCs у *transwell* систему, статистички значајно смањује проценат NKT ћелија које продукују TNF- α ($p < 0.05$), IFN- γ ($p < 0.01$) и IL-4 ($p < 0.05$), док повећава процентуалну заступљеност имуносупресивних IL-10⁺ NKT ћелија ($p < 0.05$) (Фигура 9Б).



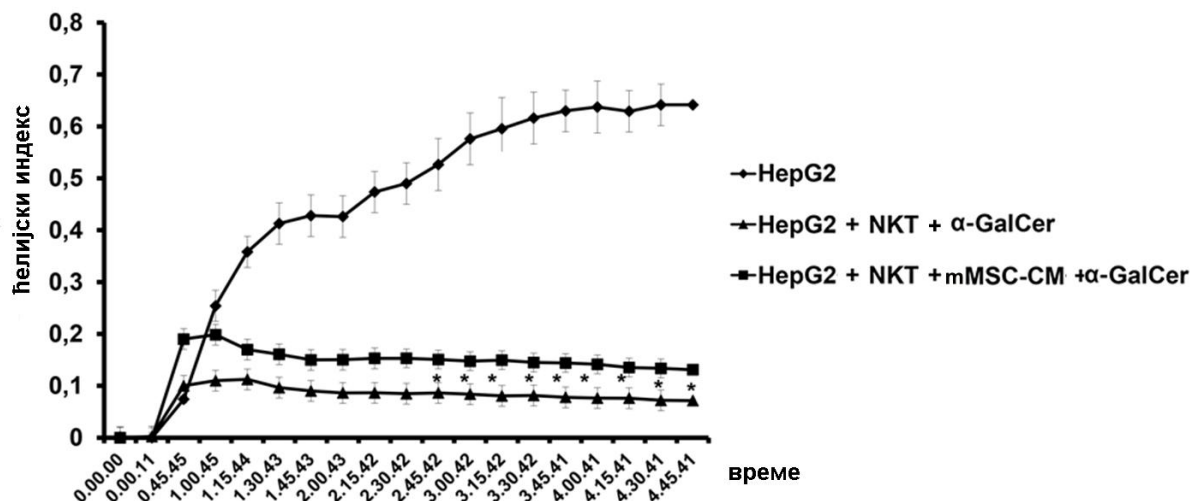
Фигура 9. *In vitro* кокултивација NKT ћелија јетре и mMSCs. (А) Смањена концентрација TNF- α и IFN- γ у супернатантима *in vitro* активираних NKT ћелија јетре кокултивисаних у *transwell* систему са mMSCs, у трајању од 48 сати (однос 10:1). (Б) Статистички значајно мањи проценат TNF- α +, IFN- γ + и IL-4+ NKT ћелија и већи проценат IL-10+ NKT ћелија је био у *transwell* систему са mMSCs. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

У циљу додатне потврде налаза да за имуносупресивни ефекат mMSCs на NKT ћелије јетре није неопходан директан међућелијски контакт, испитано је да ли примена mMSC-СМ смањује оштећење хепатоцита у α -GalCer-ом индукованом хепатитису. Концентрација трансаминаза (АСТ и АЛТ) у серуму мишева експерименталних група, мерена 16 сати након третмана, је показала да интравенска примена 200 μ l mMSC-СМ редукује хепатитис изазван α -GalCer-ом (50 μ g/kg ТТ) (Графикон 14). Као што је приказано на графикону 14, концентрација АСТ и АЛТ је статистички значајно ($p < 0.05$) мања у серуму мишева који су непосредно након апликовања α -GalCer-а примили mMSC-СМ, у поређењу са мишевима којима је интравенски дат само α -GalCer.



Графикон 14. Концентрација трансаминаза у серуму мишева након примене α -GalCer и mMSC-СМ. Концентрација АСТ и АЛТ у серуму оболелих животиња је била значајно мања после примене mMSC-СМ (200 μ l). Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* $p < 0.05$).

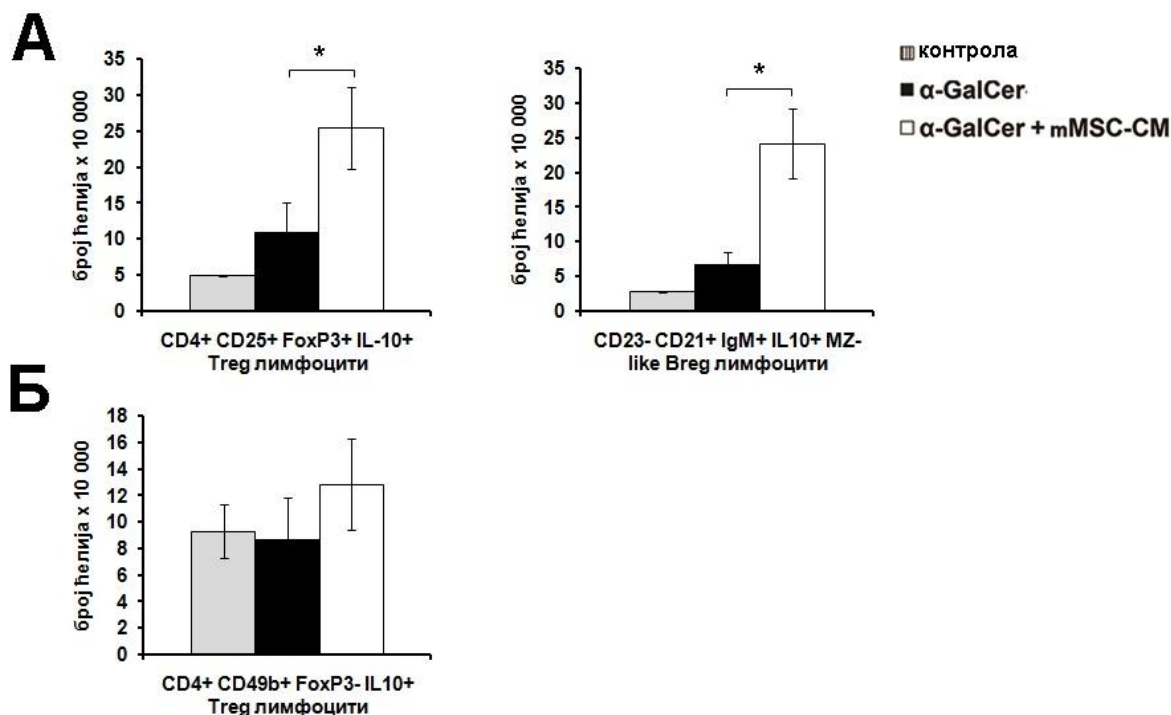
Обзиром да је системска администрација mMSC-СМ значајно смањила концентрације трансаминаза у серуму, у даљем току истраживања испитан је имуномодулаторни ефекат mMSC-СМ на цитотоксичку активност NKT ћелија јетре мишева оболелих од хепатитиса. На графикону 15 се види да NKT ћелије оболелих мишева који су примили 200 μ l mMSC-СМ показују значајно ($p < 0.05$) мању цитотоксичност у поређењу са NKT ћелијама мишева којима је апликован само α -GalCer.



Графикон 15. Интравенска апликација mMSC-CM смањује цитотоксичност NKT ћелија јетре према HepG2 туморским ћелијама. Цитотоксичка активност NKT ћелија према HepG2 таргет ћелијама испитивана је xCELLigence системом у трајању од 48 сати, однос ефектор: таргет 10:1. Резултати су представљени кроз ћелијски индекс таргет ћелија у реалном времену. Хепатотоксичност NKT ћелија изолованих из јетри мишева који су примили α -GalCer (50 μ g/kg TT) и 200 μ l mMSC-CM је значајно мања у поређењу са хепатотоксичношћу NKT ћелија изолованих из јетри мишева који су примали само α -GalCer. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* p <0.05).

4.4.1. mMSCs повећавају број регулаторних ћелија у јетри посредством солубилних фактора

Смањено оштећење јетре мишева који су након α -GalCer-а примили mMSC-CM повезано је са статистички значајим (p <0.05) повећањем броја CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Treg и CD23⁻CD21⁺IgM⁺ MZ-like Breg лимфоцита у јетри (Фигура 10А). Разлика у броју протективних CD4⁺CD49b⁺FoxP3⁻ Treg лимфоцита који продукују IL-10 није достигла статистичку значајност између испитиваних група (p >0.05) (Фигура 10Б). Добијени резултати указују да mMSCs паракриним механизмом привлаче регулаторне ћелије у јетру животиња којима је изазвано акутно оштећење јетре.

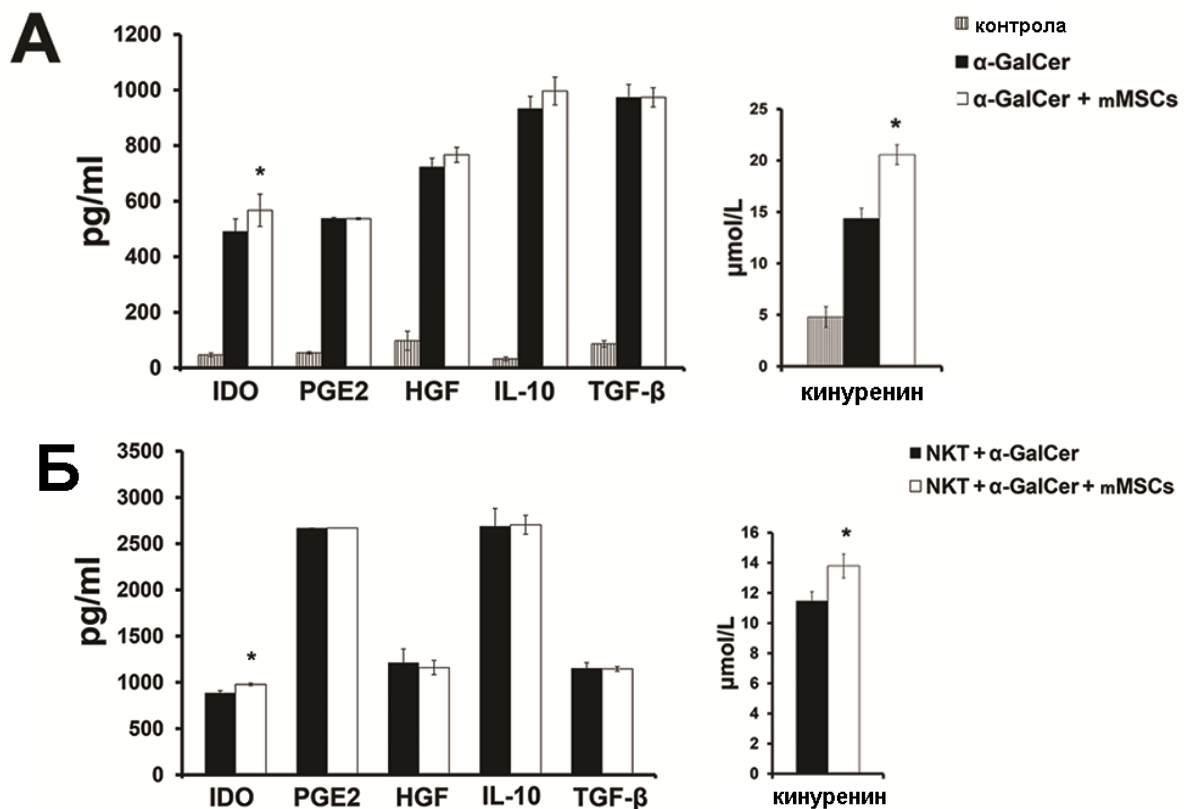


Фигура 10. mMSC-CM повећава број регулаторних лимфоцита у јетри мишева са индукованим хепатитисом. (А) Статистички значајно већи број CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ Tрег и CD23⁻CD21⁺IgM⁺ MZ-like Bрег лимфоцита у јетри мишева којима су дати α-GalCer (50μg/kg TT) и 5 x 10⁵ mMSCs, у поређењу са мишевима који су примили само α-GalCer. (Б) Не постоји разлика (p>0.05) у броју CD4⁺CD49b⁺FoxP3⁻ Tрег лимфоцита који продукују IL-10 између експерименталних група. Резултати 2 експеримента са најмање 8 мишева по групи (средња вредност +/- SE; * p<0.05).

4.5. mMSCs супримирају NKT ћелије активношћу ензима IDO и iNOS

Познато је да су IDO, PGE₂, HGF, IL-10 и TGF-β најважнији медијатори којима mMSCs супримирају ћелије имунског система и следствено смањују инфламацију. У циљу даљег испитивања паракриног механизма имуносупресивног ефекта mMSCs на NKT ћелије јетре, спектрофотометријском методом су измерене концентрације поменутих фактора у серуму мишева третираних α-GalCer-ом односно α-GalCer-ом и mMSCs, као и у супернатантима стимулираних NKT ћелија јетре култивисаних са или без mMSCs. Није било статистички значајне разлике у концентрацији PGE₂, HGF, IL-10 и TGF-β између испитиваних група (Фигура 11А). Међутим, показано је да је концентрација IDO и кинуренина, продукта ензимске активности IDO, статистички значајно (p<0.05) већа у серуму мишева са α-GalCer хепатитисом којима су апликоване mMSCs (5 x 10⁵) у поређењу са мишевима са хепатитисом који нису примили mMSCs (Фигура 11А).

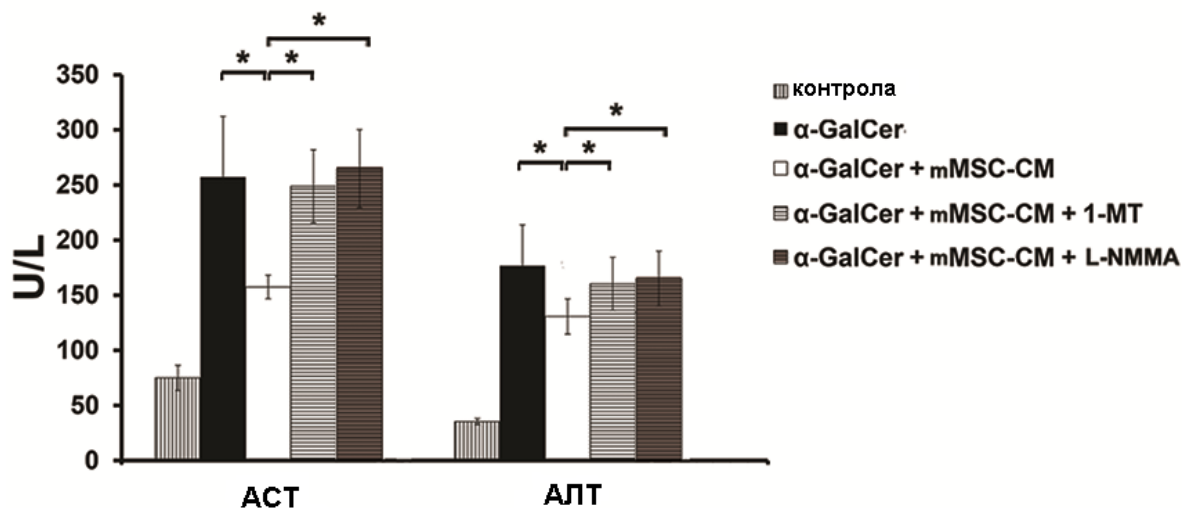
Добијени налаз је верификован мерењем солубилних фактора које продукују MSCs у супернатантима културе. Статистички значајно ($p < 0.05$) већа концентрација IDO и кинуренина је измерена у супернатантима α -GalCer-ом стимулираних NKT ћелија кокултивисаних са mMSCs у *transwell* систему, док није било значајне разлике ($p > 0.05$) у концентрацији осталих медијатора (Фигура 11Б). Добијени резултат је потврдио важну улогу IDO-а у супресији ефекторских функција NKT ћелија.



Фигура 11. mMSCs супримирају ефекторске функције NKT ћелија каталитичком активношћу ензима IDO. (А) Концентрација IDO и кинуренина у серуму мишева који су после α -GalCer-а примили mMSCs је статистички значајно већа у поређењу са концентрацијом у мишева којима је дат само α -GalCer. (Б) Статистички значајно већа концентрација IDO и кинуренина је у супернатантима *in vitro* активираних NKT ћелија јетре кокултивисаних у *transwell*-у са mMSCs. Нема значајне разлике у концентрацији PGE₂, HGF, IL-10 и TGF- β између група. (средња вредност +/- SE; * $p < 0.05$).

Обзиром да подаци у литератури указују да је IDO кључни фактор којим hMSC модулирају имунски одговор, док mMSCs свој имуносупресивни утицај остварују активношћу iNOS (238), у даљем току истраживања су у циљу дефинитивне потврде улоге IDO и испитивања значаја iNOS, које продукују mMSCs у супресији ефекторских

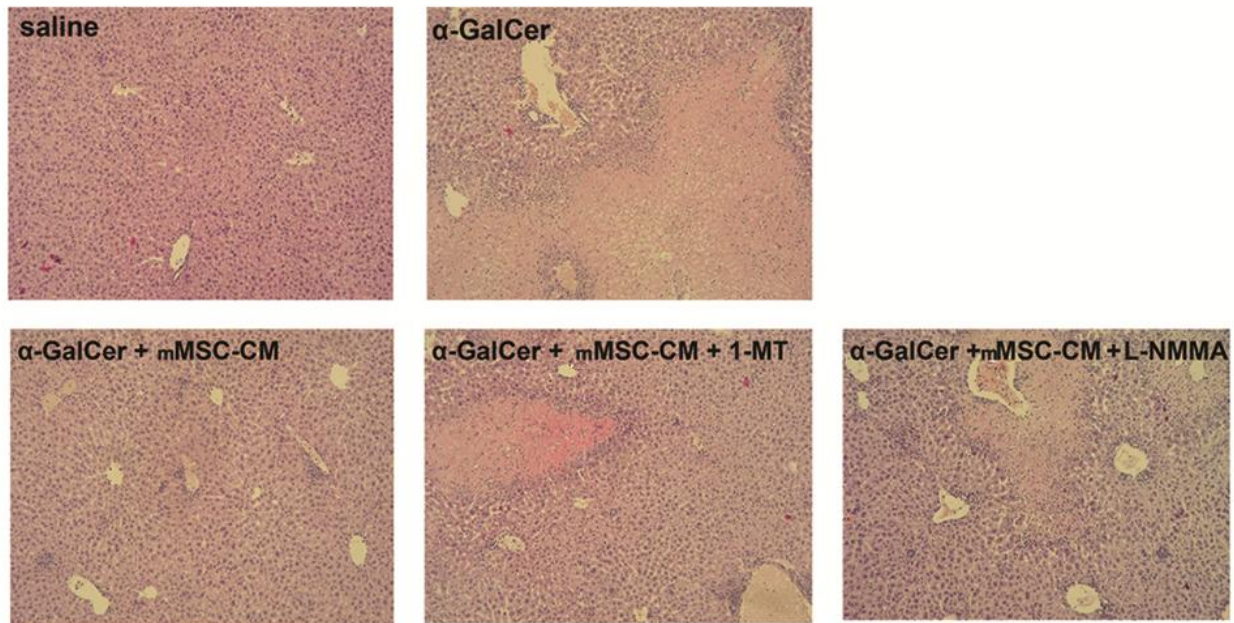
функција NKT ћелија јетре, коришћени фармаколошки инхибитори поменутих ензима. Мишевима је непосредно након индуковања хепатитиса α -GalCer-ом (50 μ g/kg TT), апликован mMSC-CM (200 μ l) у који је претходно растворен 1-MT (1mM), фармаколошки инхибитор IDO, односно L-NMMA (1mM), инхибитор iNOS. Присуство инхибитора у mMSC-CM, поништило је хепатопротективни ефекат mMSC-CM у експерименталном хепатитису. Концентрација трансминаза (АСТ и АЛТ) у серуму мишева експерименталних група, мерена 16 сати након третмана, је показала да интравенска примена 200 μ l mMSC-CM+1-MT, односно mMSC-CM+ L-NMMA не може да редукује тешко оштећење јетре изазвано α -GalCer-ом (50 μ g/kg TT). Као што је приказано на графикону 18, концентрација АСТ и АЛТ је статистички значајно ($p < 0.05$) већа у серуму мишева са хепатитисом којима је апликован mMSC-CM са додатком инхибитора ензима IDO и iNOS, у поређењу са мишевима који су интравенски примили mMSC-CM (Графикон 16).



Графикон 16. Концентрација трансминаза у серуму мишева са α -GalCer хепатитисом након примене mMSC-CM+1-MT, односно mMSC-CM+ L-NMMA. Концентрација АСТ и АЛТ је значајно већа у серуму оболелих животиња након апликације 200 μ l mMSC-CM у који су додати 1-MT (1mM) и L-NMMA (1mM) у поређењу са мишевима који су примили mMSC-CM (200 μ l). (средња вредност +/- SE; * $p < 0.05$).

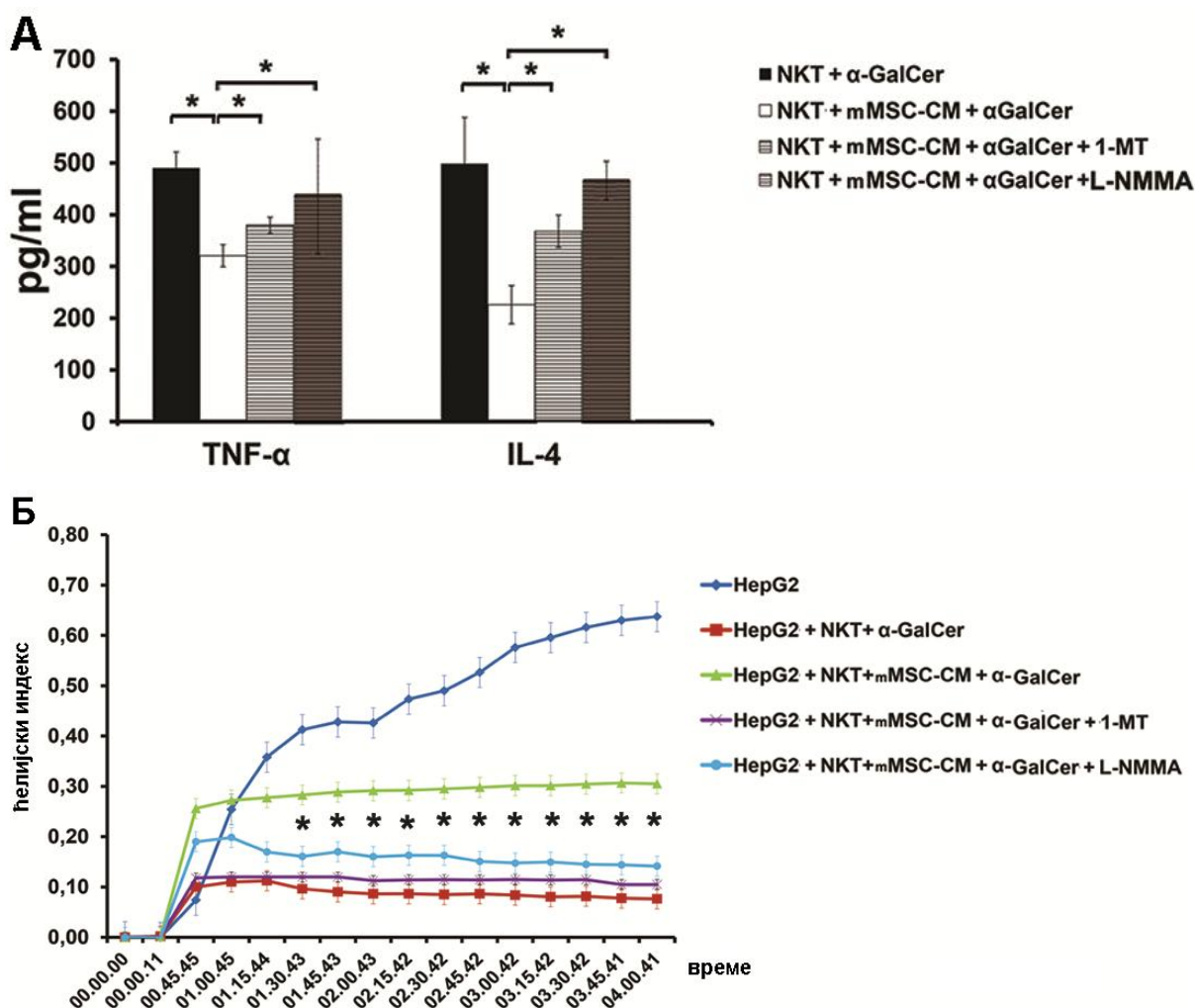
Патохистолошка анализа ткива јетре експерименталних животиња је потврдила резултате биохемијских испитивања (Слика 19). У јетри мишева који су након интравенске апликације α -GalCer-а примили mMSC-CM у којем су фармаколошки блокирани ензими IDO и iNOS уочава се масовна, дисеминована некроза хепатоцита

праћена инфилтрацијом мононуклеарних ћелија насупрот очуваној структури ткива јетре мишева који су примили mMSC-CM после α -GalCer-а. Као што се може видети на слици 19, јетре мишева контролне групе су биле непромењене грађе.



Слика 19. Репрезентативни исечци јетре обојени стандарним патохистолошким бојењем, увећање x 100 (H&E).

У складу са резултатима добијеним *in vivo*, уочено је да NKT ћелије култивисане у mMSC-CM значајно мање продукују проинфламацијске цитокине TNF- α и IL-4 (Фигура 12А) и испољавају значајно мању хепатотоксичност према циљној ћелијској линији HepG2 (Фигура 12Б). Међутим, присуство 1-МТ, односно L-NMMA у mMSC-CM је укинуло супресивни утицај MSC-CM на главне ефекторске функције NKT ћелија: продукцију цитокина (Фигура 12А) и цитотоксичност (Фигура 12Б).

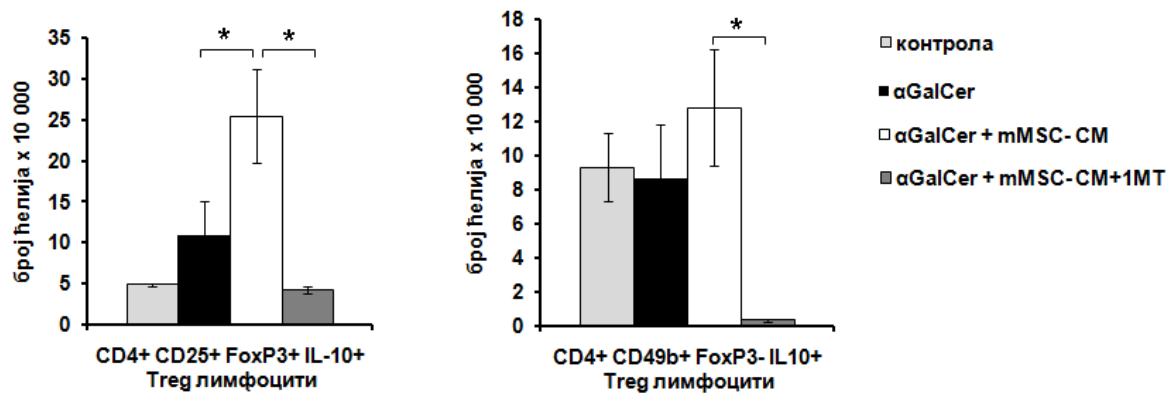


Фигура 12. Имуносупресивни утицај mMSCs на ефекторске функције NKT ћелија зависи од IDO и iNOS. *In vitro* стимулисане NKT ћелије (α -GalCer; 100ng/ml) су култивисане у трајању од 48 сати у mMSC-CM, mMSC-CM + 1-MT односно mMSC-CM + L-NMMA. Присуство 1-MT (1 mM), односно L-NMMA (1 mM) у mMSC-CM је укинуло супресивни утицај кондиционираног медијума на (А) продукцију цитокина и (Б) цитотоксички потенцијал NKT ћелија према циљним HepG2 ћелијама.

4.5.1. Ефекат mMSC-CM на експанзију Treg лимфоцита су губи у присуству IDO инхибитора

Након што је показано да mMSCs супримирају ефекторске функције NKT ћелија каталитичком активношћу ензима IDO, а обзиром да је добро познато да IDO промовише настанак Treg лимфоцита *in vitro* и *in vivo* (183), испитано је какав је ефекат овог ензима пореклом из mMSCs на накупљање регулаторних ћелија у инфламрану јетру. Као што је приказано на Фигури 13, укупан број хепатичких $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ и $CD4^+CD49b^+FoxP3^-$ Treg лимфоцита који продукују IL-10 је статистички значајно

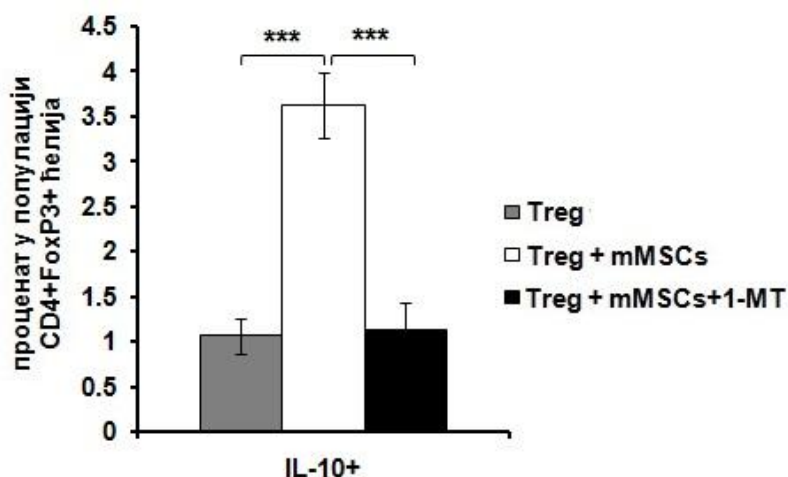
($p < 0.05$) смањен у мишева који су након α -GalCer-а (50 μ g/kg TT) примили 200 μ l mMSC-CM+1-MT, у поређењу са животињама којима су апликовани α -GalCer и 200 μ l mMSC-CM.



Фигура 13. mMSCs посредством ензима IDO повећавају број Treg лимфоцита у инфламираној јетри мишева. Укупан број CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ и CD4⁺CD49b⁺FoxP3⁻ Treg лимфоцита у јетри који продукују IL-10 је статистички значајно смањен након апликације 200 μ l mMSC-CM у који је додат фармаколошки инхибитор ензима IDO (1mM) у поређењу са мишевима којима је апликован mMSC-CM (200 μ l). Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* $p < 0.05$).

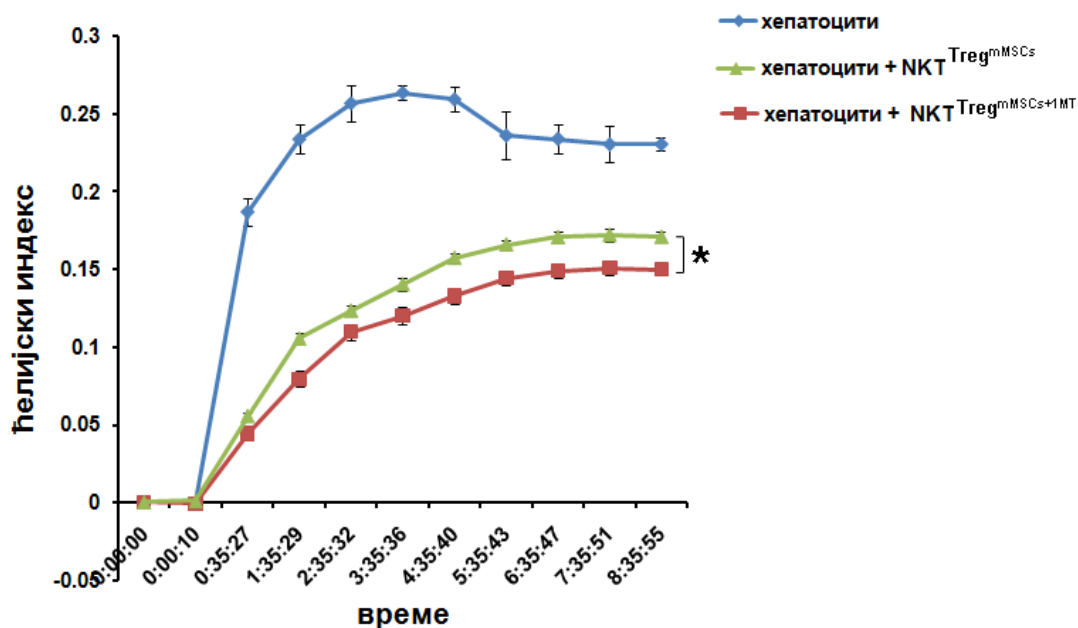
Претходне студије су показале да у хепатитису изазваном α -GalCer-ом, Treg лимфоцити продукцијом имуносупресивног IL-10 значајно смањују пролиферацију, индукују апоптозу и супримирају продукцију цитокина у NKT ћелијама (315). Како би се потврдило да је IDO најважнији имуномодулаторни фактор којим mMSCs промовишу настанак протективних Treg лимфоцита које супримирају хепатотоксичност NKT ћелија јетре, споведени су *in vitro* експерименти.

У оквиру изоловане популације Treg лимфоцита, анализирана је експресија IL-10 након 48 сати кокултивације са mMSCs у *transwell* систему. На графикону 17 се уочава да mMSCs паракриним механизмом статистички значајно ($p < 0.001$) повећавају процентуалну заступљеност IL-10⁺ Treg лимфоцита у *transwell*-у. У присуству фармаколошког инхибитора IDO-а у култури овај ефекат mMSCs на Treg лимфоците се изгубио.



Графикон 17. Процентуална заступљеност IL-10+ Treg лимфоцита након култивације са mMSCs са или без 1-MT. Treg лимфоцити су култивисани у трајању од 48 сати са mMSCs. Присуство 1-MT (1 mM) у култури смањило је процентуалну заступљеност IL-10+ Treg лимфоцита у култури. Приказане вредности су средње вредности +/- SE; *** p<0.001.

Treg лимфоцити кокултивисани у *transwell* систему са mMSCs у присуству 1-MT (Treg^{mMSCs+1MT}) односно без присуства 1-MT (Treg^{mMSCs}) су покупљени и засејани у кокултуру са NKT ћелијама јетре. Цитотоксичност NKT ћелија јетре као ефекторских ћелија је испитана према мишјим хепатоцитима у реалном времену (Графикон 18). NKT ћелије које су биле у кокултури су Treg^{mMSCs} показују значајно (p<0.05) мању цитотоксичку активност у поређењу са NKT ћелијама које су кокултивисане са Treg^{mMSCs+1MT}. Дакле, фармаколошка инхибиција IDO при mMSC:Tregs интеракцији смањује капацитет Tregs лимфоцита да супримирају хепатотоксичност NKT ћелија.



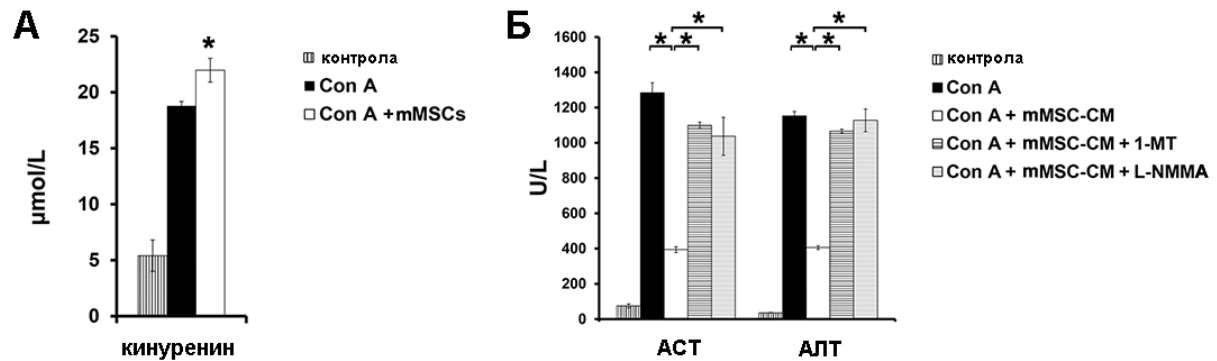
Графикон 18. Присуство 1-МТ у култури Treg лимфоцита и mMSCs смањује капацитет Treg лимфоцита да супримирају хепатотоксичност NKT ћелија. NKT ћелије које су култивисане са Treg^{mMSCs} показују значајно ($p < 0.05$) мању цитотоксичку активност према хепатоцитима у поређењу са NKT ћелијама које су култивисане са Treg^{mMSCs+1MT}. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* $p < 0.05$).

4.6. mMSCs модулирају функције NKT ћелија у Con A хепатитису активношћу ензима IDO и iNOS

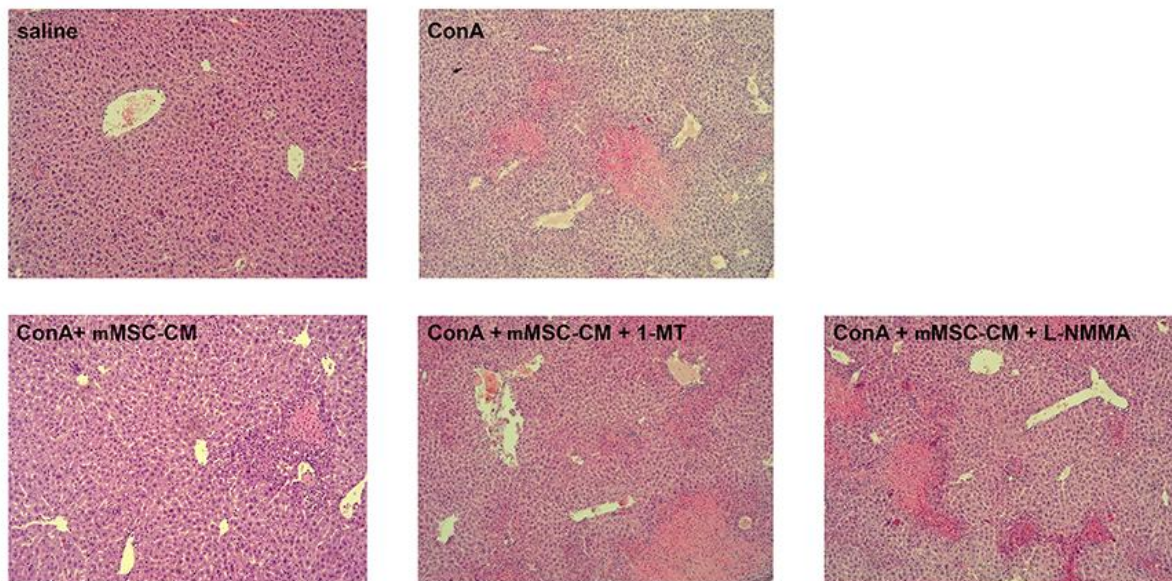
Након што је биохемијским тестовима, патохистолошком анализом и испитивањем ефекторских функција NKT ћелија показано да примена mMSC-CM у коме су фармаколошки инактивирани ензими IDO и iNOS не ублажава експериментални хепатитис изазван α -GalCer-ом, испитано је како изостанак активности поменутих ензима у mMSC-CM утиче на инфламацију и оштећење ткива јетре у хепатитису индукованом Con A.

Аналогно резултатима добијеним у α -GalCer моделу, спектрофотометријском методом је показано да интравенска примена 5×10^5 mMSCs узрокује статистички значајан ($p < 0.05$) пораст концентрације кинуренина у серуму експерименталних животиња којима је акутно оштећење јетре изазвано апликацијом Con A (12mg/kg TT) (Фигура 14А). Такође, уочени су значајно ($p < 0.05$) већа концентрација трансаминаза (АСТ и АЛТ) (Фигура 14Б), већа некроза хепатоцита као и већа инфилтрација мононуклеарних

ћелија у јетри (Слика 20) C57BL/6 мишева који су примили mMSC-CM+1-MT, односно mMSC-CM+ L-NMMA у поређењу са мишевима којима је након Con A апликован mMSC-CM.

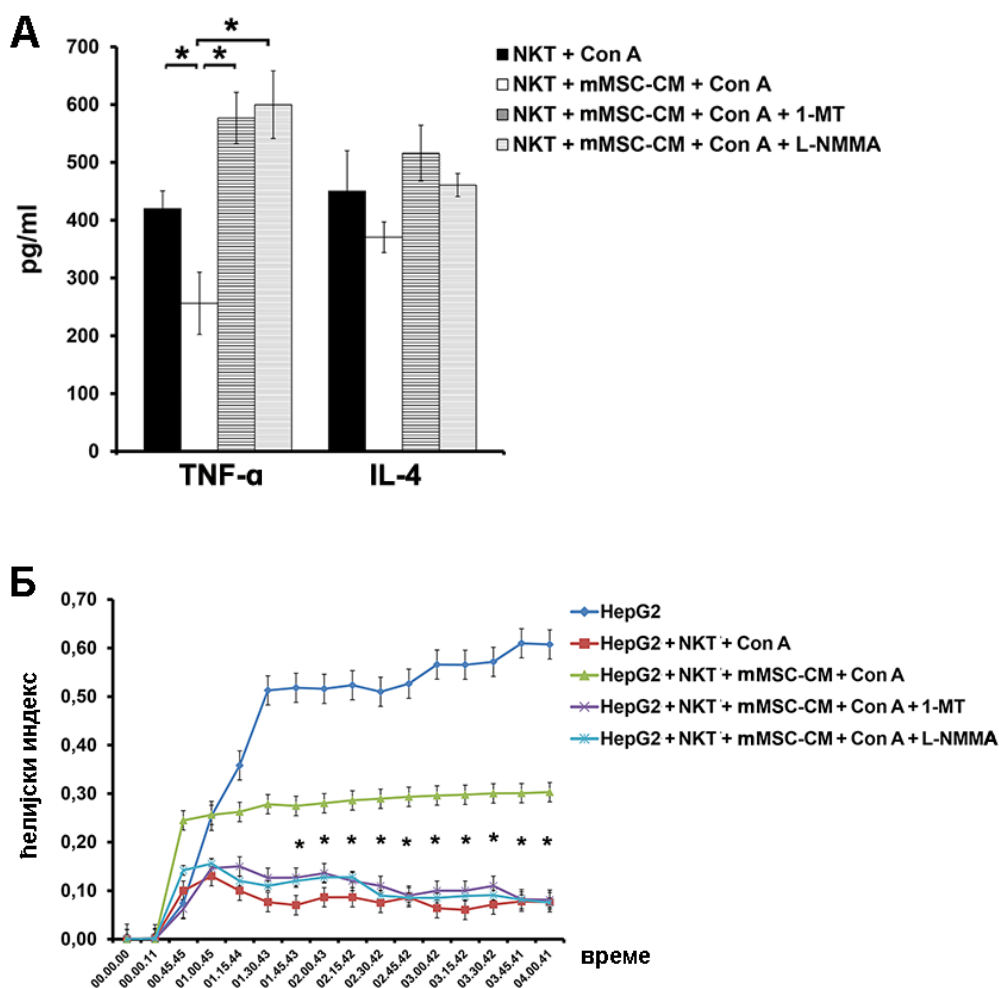


Фигура 14. mMSCs паракриним механизмом редукују акутно оштећење јетре мишева изазвано Con A. (А) Концентрација кинууренина у серуму мишева који су после Con A (12 mg/kg TT) интравенски примили 5×10^5 mMSCs је статистички значајно већа у поређењу са концентрацијом у мишева којима је дат само Con A. **(Б)** Значајно већа концентрација АСТ и АЛТ у серуму животиња којима је након индукције акутног хепатитиса (Con A; 12 mg/kg TT) апликовано 200µl mMSC-CM+1-MT, односно 200µl mMSC-CM+ L-NMMA у поређењу са концентрацијом трансминаза у серуму мишева са хепатитисом који су примили mMSC-CM (200µl). Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* $p < 0.05$).



Слика 20. Репрезентативни исечци јетре обојени стандарним патохистолошким бојењем, увећање x 100 (H&E).

У даљем току истраживања испитан је утицај фармаколошких инхибитора IDO (1mM, 1MT) и iNOS (1mM, L-NMMA) присутних у mMSC-CM на концентрације релевантних цитокина и на цитотоксички потенцијал NKT ћелија јетре према циљним ћелијама *ex vivo*. Добијени резултати су указали да блокада ензимске активности IDO и iNOS укида имunosупресивни ефекат mMSC-CM на продукцију проинфламацијског TNF- α у NKT ћелијама изолованим из јетри мишева којима је хепатитис изазван применом Con A (12 mg/kg TT) као и на хепатотоксичност ових NKT ћелија, што јасно корелира са налазима добијеним у α -GalCer-моделу (Фигура 15 А, Б). Разлика у продукцији IL-4 није достигла статистичку значајност.

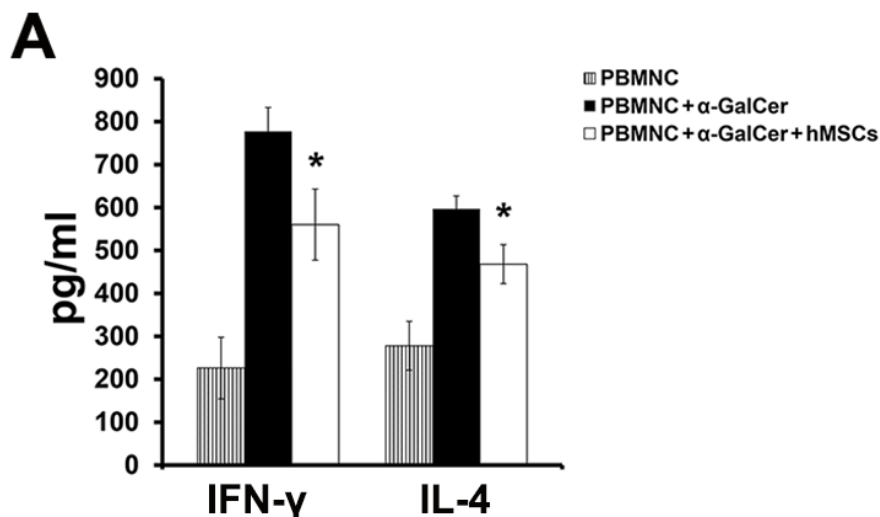


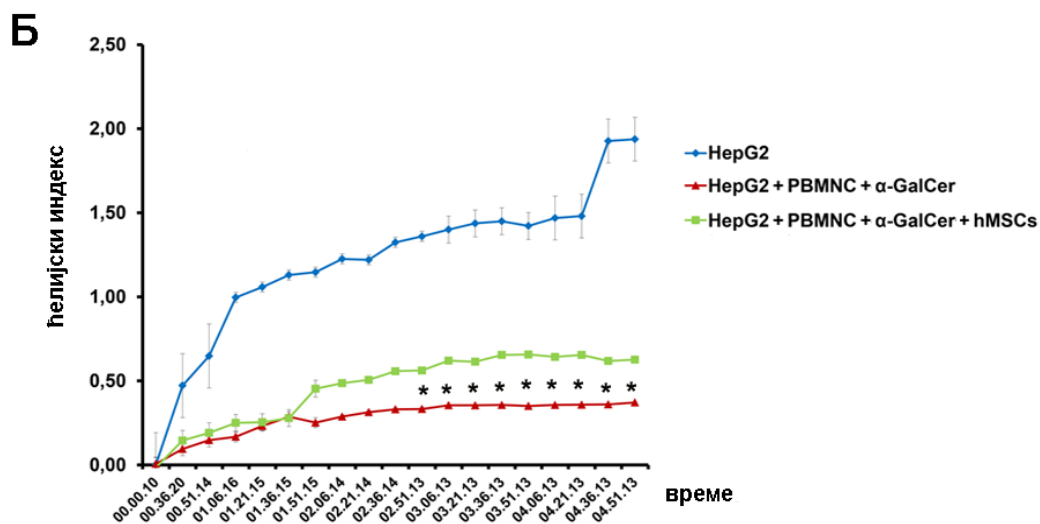
Фигура 15. Имносупресивни утицај mMSCs на ефекторске функције NKT ћелија зависи од IDO и iNOS. *In vitro* стимулисане NKT ћелије су култивисане у трајању од 48 сати у mMSC-CM, mMSC-CM + 1-MT односно mMSC-CM + L-NMMA. Присуство 1-MT (1 mM), односно L-NMMA (1 mM) у mMSC-CM је укинуло супресивни утицај кондиционираног медијума на (А) продукцију цитокина и (Б) цитотоксички потенцијал NKT ћелија према циљним HepG2 ћелијама.

4.7. Продукцијом IDO-a и активношћу iNOS-a hMSCs модулирају ефекторске функције α -GalCer-ом стимулираних хуманих PBMNC

Након што је показано да mMSCs имају снажан имуносупресивни ефекат на мишће NKT ћелије како *in vivo*, тако и *in vitro*, у даљем току истраживања је испитана имуномодулаторна активност hMSCs на хумане NKT ћелије. Како би се показала релевантност резултата добијених у експерименталном моделу, испитано је да ли hMSCs утичу на продукцију цитокина као и на цитотоксички потенцијал *in vitro* активираних хуманих NKT ћелија.

Концентрација IFN- γ и IL-4 у супернатантима α -GalCer-ом стимулираних PBMNC кокултивисаних у *transwell* систему са hMSCs је била статистички значајно ($p < 0.05$) мања у поређењу концентрацијом у супернатантима стимулираних PBMNC које су биле култивисане без матичних ћелија (Фигура 16А). Такође, испитан је цитотоксички потенцијал стимулираних PBMNC претходно кокултивисаних са hMSCs према ћелијама хепатоцелуларног карцинома у 48-часовној култури, у односу ефектор: таргет 10:1, коришћењем xCELLigence система. Као што се може видети на Фигури 16Б, hMSCs су статистички значајно ($p < 0.05$) смањиле и цитотоксичку активност α -GalCer-ом стимулираних PBMNC према таргет HepG2 ћелијској линији.

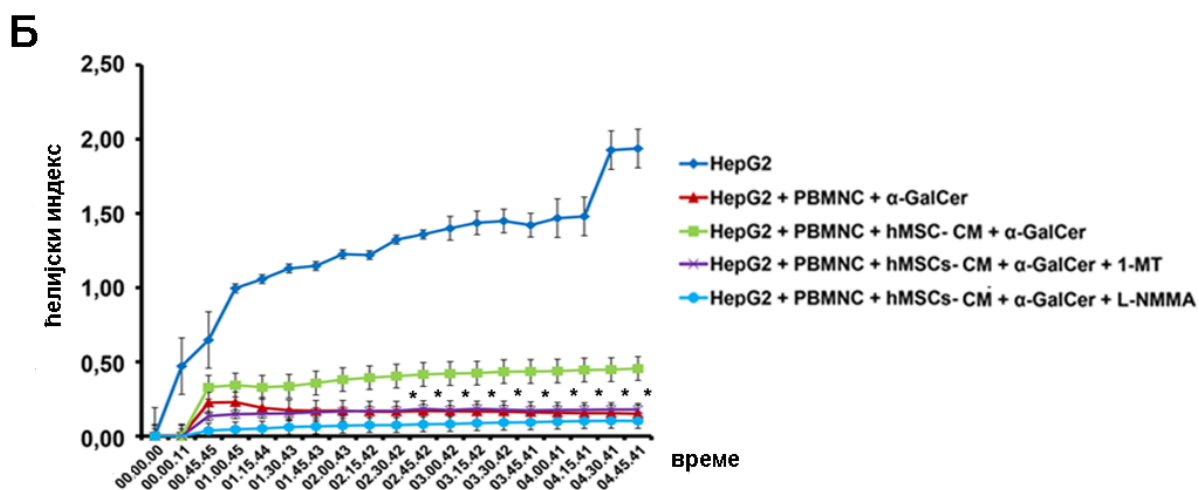
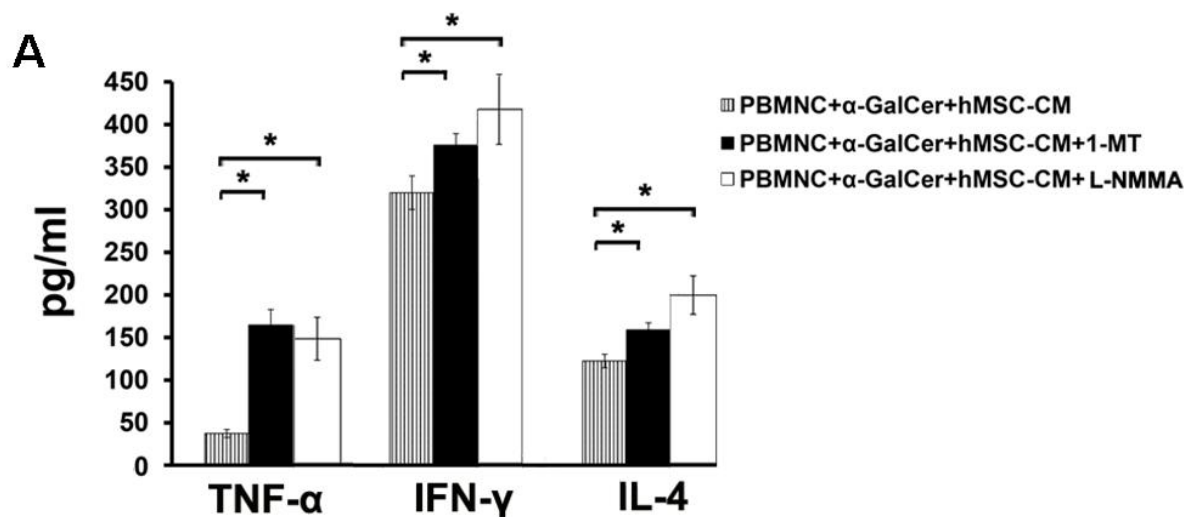




Фигура 16. hMSCs супримирају ефекторске функције хуманих NKT ћелија паракриним механизмом. (А) Смањена концентрација IFN- γ и IL-4 у супернатантима *in vitro* α -GalCer-ом стимулираних хуманих PBMNC кокултивисаних у *transwell* систему са hMSCs, у трајању од 48 сати (однос 10:1). (Б) Статистички значајно мањи цитотоксички потенцијал *in vitro* α -GalCer-ом стимулираних хуманих PBMNC кокултивисаних у *transwell* систему са hMSCs према HepG2 таргет линији. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* p <0.05).

Након што је показана важност ензима IDO и iNOS за имуносупресивни ефекат mMSCs на мишје NKT ћелија, испитан је значај ових молекула за имуномодулаторни утицај hMSC на ефекторске функције хуманих NKT ћелија.

У складу са резултатима добијеним у експерименталним моделима, при култивацији α -GalCer-ом стимулираних PBMNC у hMSC-СМ у присуству инхибитора IDO, 1-МТ, и инхибитора iNOS, L-NMMA, имуносупресивни ефекат hMSC-СМ на продукцију цитокина (TNF- α , IFN- γ и IL-4) и цитотоксичност стимулираних PBMNC се скоро у потпуности изгубио, што је указало да IDO и iNOS имају кључну улогу у интеракцији hMSCs и хуманих NKT ћелија (Фигура 17А, Б).



Фигура 17. hMSCs супримирају ефекторске функције хуманих NKT ћелија посредством ензима IDO и iNOS. *In vitro* α-GalCer-ом стимулисане хумане PBMNC су култивисане у трајању од 48 сати у hMSC-CM, hMSC-CM + 1-MT односно hMSC-CM + L-NMMA. Присуство 1-MT (1 mM), односно L-NMMA (1 mM) у hMSC-CM је укинуло супресивни утицај кондиционираног медијума на (A) продукцију цитокина и (Б) цитотоксички потенцијал α-GalCer-ом стимулисане хумане PBMNC према циљним HepG2 ћелијама.

5. ДИСКУСИЈА

Резултати спроведеног истраживања указују да примена MSCs смањује инфламацију у моделу акутног оштећења јетре узрокованог активацијом NKT ћелија.

5.1. Интравенски трансплантиране mMSCs мигрирају у јетру и смањују акутно оштећење јетре мишева

Због свог имуномодулаторног потенцијала и способности самообнављања и диференцијације, MSCs представљају потенцијално средство за лечење бројних дегенеративних и аутоимунских болести (233, 316).

Иако је *in vitro* постигнута трансдиференцијација MSCs у хепатоците, већина објављених студија указује да се терапијски ефекат MSCs у акутном оштећењу јетре првенствено заснива на имуномодулаторним својствима ових ћелија (317). На инфламацију у ткиву, MSCs реагују тако што модулирају функције ћелија имунског система и то путем директног контакта или секрецијом солубилних фактора (221).

Неколико студија је показало терапијски учинак MSCs у акутном хепатитису (291, 292, 296, 298, 299, 304) међутим, ефекат MSCs на фенотип и функцију NKT ћелија, главних ефекторских ћелија у акутном оштећењу јетре, до сада није објашњен. Ова студија је по први пут показала да MSCs ублажавају акутно оштећење јетре узроковано активацијом NKT ћелија, смањујући цитотоксички потенцијал као и способност NKT ћелија јетре да продукују проинфламацијске цитокине. Резултати ове студије недвосмислено указују да су IDO и iNOS главни солубилни фактор чијом ензимског активношћу MSCs модулирају фенотип и функције NKT ћелија.

NKT ћелије представљају јединствену субпопулацију Т лимфоцита, која експримира инваријантни α ланац ($V\alpha 14$ - $J\alpha 18$ код мишева; $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$ код људи) TCR-а, упарен са $V\beta$ ланцем ограниченог репертоара ($V\beta 8.2$, $V\beta 7$ или $V\beta 2$ код мишева; $V\beta 11$ код људи), као и маркере који се налазе на NK ћелијама (318). Након снажне активације гликолипидним антигенима презентованим у контексту CD1d молекула, који је налик МНС молекулу I класе, NKT ћелије продукују Th1, Th2 и Th17 цитокине (319). NKT ћелије су најзаступљеније у микроваскуларном одељку јетре (320, 321, 322) и сматра се да имају кључну улогу у патогенези акутног оштећења овог органа, заједно са Т лимфоцитима, макрофагима и дендритским ћелијама. У основи оштећења јетре посредованог NKT ћелијама налази се индукција апоптозе хепатоцита посредством

FasL:Fas интеракције, активација перфорин/гранзим система и продукција проинфламацијских цитокина IFN- γ , IL-4 и TNF- α (68).

У приказаној студији је најпре показано да mMSCs након интравенске апликације у значајном броју мигрирају у инфламирано ткиво јетре (слика 11, 13). Анализирањем биохемијских показатеља (ниво трансминаза у серуму) и хистолошких препарата јетри животиња којима је индукован хепатитис показано је да мишеви који су примили дозу mMSCs развијају блажи облик експерименталног фулминантног хепатитиса.

Уочено је да је након интравенске примене mMSCs, у серуму мишева којима је индуковано акутно оштећење јетре применом Con A односно α -GalCer-a, концентрација АСТ и АЛТ, сигурних показатеља оштећења хепатоцита, статистички значајно мања ($p < 0.05$), у поређењу са животињама које нису примиле матичне ћелије (Графикон 1, 3).

У циљу потврде резултата биохемијских испитивања урађена је патохистолошка анализа препарата јетре мишева експерименталних и контролних група. Јетре мишева са индукованим хепатитисом којима су апликоване mMSCs биле су очуване грађе са местимично присутним пољима некрозе хепатоцита (Слика 12, 14). Супротно, у јетри мишева који нису примили mMSCs, јасно је уочљива масовна, дисеминована некроза хепатоцита (Слика 12, 14).

У складу са овим резултатима су подаци из претходно објављених студија које су документовале да MSCs изоловане из масног ткива снижавају вредности трансминаза у мишевима којима је хепатитис индукован применом Con A (291, 298). Обзиром да у имунопатогенези фулминантног хепатитиса NKT ћелије имају кључну улогу, у овде описаном истраживању је коришћењем патофизиолошки релевантнијег анималног модела који је изазван применом α -GalCer-a, специфичног активатора NKT ћелија, недвосмислено доказано да mMSCs имају протективан ефекат у овој болести.

5.2. Примена MSCs смањује инфламацију у јетри

Одређивање концентрације цитокина у серуму (ELISA техником) као и анализа функционалног фенотипа инфламацијских ћелија проточном цитометријом су потврдили да примена mMSCs значајно смањује број инфламацијских ћелија у ткиву јетре и следствено томе концентрације проинфламацијских цитокина у серуму животиња којима је индукован експериментални хепатитис.

У складу са резултатима претходних студија (291, 292, 298), у овој студији је показано да mMSCs редукују оштећење јетре индуковано применом Con A, на тај начин што смањују број главних ефекторских ћелија, TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺, IL-4⁺ NKT ћелија, дендритских ћелија и макрофага у јетри, што је праћено смањењем концентрације проинфламацијских цитокина TNF- α , IFN- γ и IL-4 у серуму, и повећањем концентрације протективног IL-10. Протективна улога IL-10 у Con A хепатитису, заснива се на супресивном ефекту овог цитокина на продукцију TNF- α (287). Sun и сарадници су показали да интраспленична апликација MSCs у мишева третираних Con A узрокује повећање продукције IL-10 уз истовремено смањење експресије TNF- α , IFN- γ и FasL у лимфоцитима и Купферовим ћелијама (295). Познато је да TNF- α директно индукује апоптозу хепатоцита преко рецептора за TNF, каспазе 8, митохондријалног цитохрома *c* и активације каспазе 3 (293), док IFN- γ води ћелије јетре у апоптозу посредством Fas рецептора (294). Стога, супресивни ефекат MSCs на продукцију проинфламацијских цитокина, може објаснити смањену апоптотску смрт синусоидалних ендотелних ћелија и хепатоцита и следствено мање оштећење јетре у фулминантном хепатитису.

У даљем току истраживања је било неопходно испитати да ли се у основи имунорегулаторног ефекта MSCs на NKT ћелије налази директна међућелијска интеракција или индиректни ефекат MSCs посредован ћелијама које презентују антигене у јетри. Зато је истраживање настављено на другом моделу фулминантног хепатитиса, који је мишевима индукован α -GalCer-ом. Примена mMSCs статистички значајно је смањила инфлукс TNF α ⁺, IFN γ ⁺ и IL-4⁺ NKT ћелија у јетру и следствено томе значајно смањила оштећење ткива јетре изазвано α -GalCer-ом (Фигура 4, слика 15). Уз то, mMSCs нису утицале на продукцију цитокина и поларизацију интрахепатичних дендритских ћелија нити на способност ових ћелија да презентују антигене (Фигура 5). На основу ових резултата, закључено је да протективни ефекат mMSCs у акутном оштећењу јетре узрокованом активацијом NKT ћелија није посредован дендритским ћелијама већ се заснива на директном имуносупресивном ефекту на NKT ћелије.

Познато је да MSCs подстичу експанзију Treg и Breg лимфоцита, међутим значај ових ћелијских популација за супресију фулминантног хепатитиса применом MSCs није дефинисан. Због тога је у овој студији, испитан молекуларни механизам интеракције MSCs и регулаторних лимфоцита током акутне инфламације јетре. Пошто Bregs лимфоцити играју важну имуносупресивну улогу током хепатитиса (157), и обзиром да

у инфламаторној средини MSCs промовишу експанзију Bregs (323), у приказаном истраживању је анализирана интеракција поменутих ћелија током акутног хепатитиса. Иако је апликација mMSCs значајно повећала број IL-10⁺ и TGFβ⁺ MZ-like Breg у јетри мишева са хепатитисом у односу на групу која је примила само α-GalCer (Фигура 7Б), јасно је да повећана заступљеност ових регулаторних ћелија није кључна у супресији фулминантног хепатитиса применом MSCs, обзиром да деплеција Bregs није смањила хепатопротективни капацитет MSCs (Графикон 9, слика 18). Насупрот томе, деплецијом Treg лимфоцита се у потпуности изгубио терапијски ефекат MSCs (Графикон 6, слика 16), што је указало на неопходност и значај Treg лимфоцита за постизање имуносупресије у јетри применом MSCs.

5.3. Примена mMSCs смањује апоптозу у јетри

α-GalCer повећава експресију FasL и TRAIL молекула на NKT ћелијама, рецептора одговорних за индукцију апоптозе хепатоцита (307). У акутном оштећењу јетре је показано да MSCs инхибирају апоптозу хепатоцита тако што смањују експресију *Bax* и *Bad* проапоптотских гена (324). *Bax* интерагује са продуктом гена *Noxa*, чија је експресија индукована IFN-γ на *p53* независан начин (325). Са друге стране, експресија проапоптотског гена *PUMA* је индукована на *p53*-зависан начин и има важну улогу у митохондријском (унутрашњем) путу активације апоптозе на тај начин што интерагује са антиапоптоским протеином (*Bcl-2*) (326, 327). IDO пореклом из MSCs супримира експресију NKG2D рецептора на CD8⁺ Т лимфоцитима, као и активационих рецептора NKp30, NKp44 и NKG2D на NK ћелијама (270, 273). У складу са налазима поменутих студија, резултати овог истраживања су показали да mMSCs редукују експресију лиганата који индукују апоптозу хепатоцита FasL и TRAIL, дегранулационог маркера CD107 што за последицу има смањење хепатотоксичке активности NKT ћелија (Графикон 5). mMSCs супримирају и активацију каспазе-3 и експресију проапоптотских гена *Noxa*, *Bax*, *Bad* и *Apafl*, смањујући оштећење ткива јетре (Графикон 10). На основу резултата описане студије, може се закључити да mMSCs смањују експресију проапоптотских медијатора али без утицаја на *p53*-зависну *PUMA*-индуковану активацију антиапоптотских гена као што је *Bcl-2*.

5.4. Фармаколошка инактивација IDO и iNOS у mMSCs укида директан имуносупресивни ефекат mMSCs на NKT ћелије

Познато је да MSCs супримирају имунски одговор ангажовањем инхибиторних молекула при адхезији са ћелијама имунског система или тако што продукују солубилне медијаторе. Резултати овде приказане студије по први пут показују да mMSCs, паракриним механизмом смањују цитотоксички потенцијал као и способност NKT ћелија да продукују инфламацијске цитокине, што резултира значајном редукцијом оштећења јетре. Експерименти у којима су mMSCs и NKT ћелије кокултивисане у *transwell* систему као и евидентан хепатопротективан ефекат mMSC-CM су недвосмислено показали да директан међућелијски контакт није неопходан за имуносупресивни утицај mMSCs на NKT ћелије (Фигура 9).

Доступни подаци у литератури везани за паракрини ефекат MSCs на ћелије имунског система указују да су потенцијални медијатори који учествују у интеракцији MSCs и NKT ћелија IDO, iNOS, TGF- β , HGF, PGE₂ и IL-10 (221).

Резултати приказани у овој студији показују да присуство 1-MT, специфичног инхибитора IDO, као и L-NMMA, специфичног инхибитора iNOS, у mMSC-CM, укида хепатопротективни ефекат mMSC-CM. У групи животиња којима је након α -GalCer-а апликован mMSC-CM+1-MT односно mMSC-CM+L-NMMA концентрација трансaminaза у серуму, оштећење ткива јетре као и инфилтрација јетре инфламацијским ћелијама били су статистички значајно већи него у животиња које су примиле mMSC-CM (Графикон 14, слика 19).

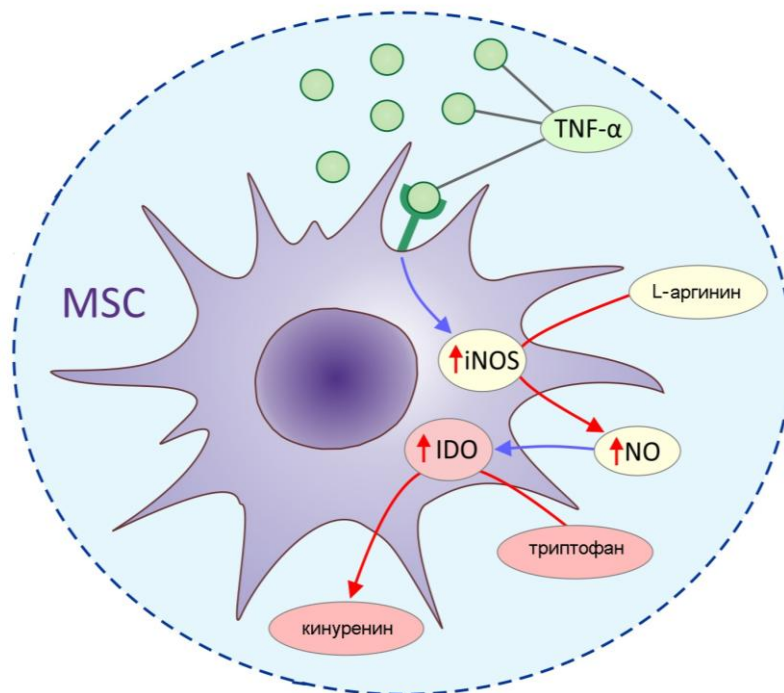
Такође, фармаколошка инхибиција IDO и iNOS у mMSC-CM, у којем су култивисане α -GalCer-ом стимулисане NKT ћелије јетре мишева, поништила је имуносупресивни ефекат mMSC-CM на NKT ћелије *in vitro*. Стимулисане NKT ћелије култивисане у mMSC-CM у којем су блокирани поменути имуносупресивни ензими, продуковале су значајно више проинфламацијских цитокина TNF- α и IL-4 и биле су токсичније за НерG2 ћелије, у поређењу са α -GalCer-ом стимулисаном NKT ћелијама које су култивисане у mMSC-CM без присуства инхибитора (Фигура 12). На овај начин је недвосмислено потврђена важна улога оба сигнална пута, и IDO и iNOS, пореклом из mMSCs, у модулацији ефекторских функција NKT ћелија.

IDO је интрацелуларни ензим који катализује почетну реакцију разградње есенцијалне аминокиселине триптофан у оквиру кинуренинског пута. IDO је првобитно описан као молекул који учествује у одржавању матуралне толеранције и стога се сматра једним

од еволутивно најважнијих механизма имунске компетенције и хумане репродукције (328). Овај ензим игра важну улогу у инфекцији, аутоимуности и онкогенези (329). IDO поседује снажну имуномодулаторну активност која се објашњава на два начина. Локална деплеција триптофана у ткивној микросредини односно медијуму, као и накупљање кинуренинских метаболита повећавају експресију GCN2 (енгл. *general control nonderepressible 2*) киназе што за последицу има редукцију пролиферације, повећање апоптозе и оштећену функцију Т лимфоцита у условима стреса (330, 331). У моделима аутоимунских болести је показано да IDO помера Th1/Th2 баланс на страну Th2 лимфоцита и повећава удео Treg лимфоцита у регулацији имунског одговора. Катаболити триптофана, L-кинуренин, 3-хидрокси-кинуренин и 3-хидрокси-антранилна киселина померају Th1/Th2 баланс у корист Th1 цитокинског профила, док насупротив томе, фармаколошка инхибиција IDO узрокује померање цитокинског одговора NKT ћелија у правцу Th2 фенотипа (319). Смањење продукције IL-4 у NKT ћелијама јетре мишева којима су након изазивања акутног оштећења јетре Con A или α -GalCer, апликоване MSCs, може се објаснити чињеницом да иако се IL-4 сматра Th2 (антиинфламацијским) цитокином, у контексту NKT-посредованог хепатитиса показано је да IL-4 има снажна проинфламацијска својства (55).

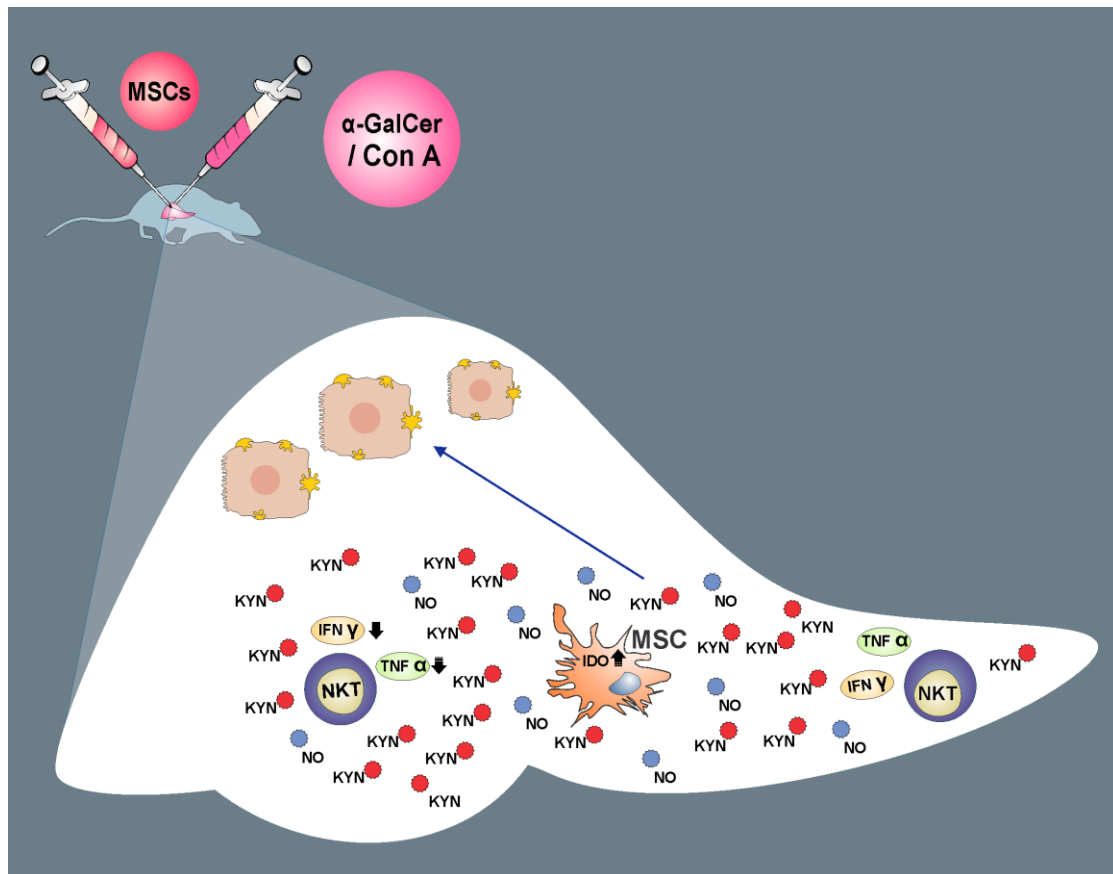
Синтеза IDO у MSCs може бити индукована директно (присуством IFN- γ у микросредини) или индиректно аутокрином стимулацијом матичних ћелија секретованим PGE₂ (273). Spaggiari и сарадници су у контексту NK-MSCs интеракције показали да оба механизма доприносе продукцији IDO у MSCs (273). IFN- γ и TNF- α пореклом из активираних NK ћелија, подстичу продукцију PGE₂ у MSCs, који затим аутокрино промовише синтезу и активност ензима IDO у MSCs (273). При кокултивацији у односу 1:1 или 10:1, IDO је кључни фактор којим MSCs супримирају пролиферацију, продукцију IFN- γ и цитотоксичку активност NK ћелија (273). Такође, познато је да IDO пореклом из MSCs супримира пролиферацију и индукује апоптозу Т и В лимфоцита услед деловања кинуренина и токсичних метаболита (хинолинске и 3-хидрокси-антранилне киселине) насталих каталитичком активношћу IDO, на ћелијски циклус лимфоцита (284, 307). Li и сарадници су показали да супресивни ефекат солубилних фактора (IDO, PGE₂ и TGF- β) на пролиферацију, продукцију цитокина и цитотоксичност CD8⁺ Т лимфоцита, поспешује интеракција (MIC) А/В, лиганда експримираног на MSCs, и NKG2D рецептора на CD8⁺ Т лимфоцитима (307). IDO фаворизује диференцијацију моноцита у IL-10⁺ CD206⁺ имуносупресивне M2 макрофаге који значајно доприносе супресији имунског одговора (281).

Продукцију NO, брзо дифундујућег гаса и биоактивног молекула из аминокиселине L-аргинин катализује ензим NOS (239, 332). NOS је код људи и мишева детерминисан са три гена: iNOS, прво откривен у макрофагима, nNOS у неуронима и eNOS у ендотелним ћелијама (333). Експресија гена за iNOS је индуцибилна и има важну улогу у имунорегулацији (333). Настали NO и реактивни азотни радикали модулирају TCR сигнализацију, експресију цитокинских рецептора и фенотип Т лимфоцита (334). Високе концентрације NO инхибирају пролиферацију Т лимфоцита и продукцију цитокина (334, 335). Познато је и да овај оксид утиче на активност бројних ензима, јонских канала и рецептора (336, 337). NO који продукују MSCs супримира фосфорилацију STAT5 молекула што зауставља ћелијски циклус у G1 фази (239). У приказаној студији је показано да трансплантација mMSCs повећава концентрацију кинуренина у серуму мишева којима је хепатитис изазван применом Con A односно α -GalCer-a и следствено смањује оштећење ткива јетре. *Ren* и сарадници су недавно показали да mMSCs углавном активношћу ензима iNOS и продукцијом NO директно супримирају пролиферацију и продукцију цитокина у лимфоцитима (238). Пошто је NO веома нестабилан молекул и делује само локално, имунске ћелије морају бити у непосредној близини mMSCs како би продуковани NO остварио свој имуносупресивни ефекат (239).



Слика 21. Мале концентрације NO аутокринно стимулишу експресију IDO у mMSCs и следствено продукцију кинуренина.

Инфламацијски цитокини и хемокини које ослобађају оштећени хепатоцити и имунске ћелије које инфилтришу ткиво јетре, индукују миграцију mMSCs у јетру (308). У инфламаторној средини, IFN- γ и TNF- α стимулишу mMSCs да експримирају iNOS (223). Пошто је познато да у присуству проинфламацијских цитокина, мале молекуларне концентрације NO узрокују повећану активност IDO (338), може се претпоставити да након стимулације α -GalCer-ом или Con A, активирани NKT ћелије секретују TNF- α и IFN- γ који индукују експресију iNOS у mMSCs и узрокују следствену продукцију NO, што за последицу има повећану активност IDO и супресију цитотоксичности NKT ћелија (Слика 21, 22).



Слика 22. Механизам хепатопротективног ефекта mMSCs у моделу акутног оштећења јетре које је изазвано активацијом NKT ћелија.

5.5. mMSCs повећавају експанзију и хепатопротективна својства Treg лимфоцита активношћу ензима IDO

Treg лимфоцити играју важну улогу у одржавању имунске толеранције у јетри, што потврђује чињеница да се током акутне фазе запаљења у јетри апоптозом значајно смањује број ових ћелија (339, 340). Као последица редукције броја интрахепатичких Treg, за кратко време се развија инфламација (341). Зато се сматра да је поновно успостављање *pool*-а Treg лимфоцита иницијални корак у супресији акутног хепатитиса (339). Познато је да MSCs промовишу експанзију Treg лимфоцита *in vitro* (221). Резултати приказаног истраживања указују да интравенска апликација mMSCs као и mMSC-CM, повећава укупан број Treg лимфоцита који следствено смањују инфламацију и некрозу јетре (Фигура 7А, 10А). Адоптивни трансфер Treg лимфоцита кокултивисаних са mMSCs се показао значајно ефикаснијим у смањењу акутног оштећења јетре у односу на трансфер Treg, сугеришући да mMSCs значајно појачавају имуносупресивне и хепатопротективне карактеристике Treg лимфоцита (Графикон 8, слика 7). Капацитет mMSCs да редукују хепатотоксичност NKT ћелија се деплецијом Treg лимфоцита потпуно губи (Графикон 6, слика 16), што јасно указује на важну улогу Treg лимфоцита за постизање имуносупресивног ефекта mMSCs током инфламације у јетри.

IDO катализује реакцију разградње триптофана до кинуренина, продукта који промовише експресију транскрипционог фактора FoxP3 у T лимфоцитима (342) и истовремено инхибира пролиферацију ефекторских T лимфоцита (339). У складу са тим, трансплантација mMSCs култивисаних у присуству инхибитора IDO-а, није повећала број Treg у јетри (Фигура 13) нити је имала терапијски ефекат у фулминантном хепатитису. Такође, Treg лимфоцити кокултивисани са mMSCs у присуству 1-MT нису редуковали хепатотоксичност NKT ћелија (Графикон 18). Обзиром да је познато да Treg лимфоцити секретују IL-10 којим супримирају активацију NKT ћелија јетре (315), а да IDO стимулише продукцију имуносупресивног IL-10 у активираним лимфоцитима, резултати овог истраживања сугеришу да mMSCs продукују IDO који повећава експресију IL-10 у Treg лимфоцитима, а да затим Treg лимфоцити овим антиинфламацијским цитокином супримирају хепатотоксичност NKT ћелија.

На основу добијених резултата се може закључити да су IDO и iNOS, главни медијатори којим mMSCs директно смањују цитотоксички потенцијал NKT ћелија и њихову способност да продукују проинфламацијске цитокине. Активношћу ензима IDO, mMSCs повећавају продукцију имуносупресивног IL-10 у Treg лимфоцитима и на тај начин додатно супримирају хепатотоксичност NKT ћелија. Посредством наведених механизма, директног и индиректног, у експерименталном моделу акутног хепатитиса mMSCs смањују оштећење јетре узрокованом активацијом NKT ћелија. Резултати ове студије допринеће бољем разумевању молекулских механизма одговорних за имуномодулаторне ефекте MSCs у терапији фулминантног хепатитиса и указаће на потенцијал клиничке примене MSCs у лечењу ове болести.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Из свега претходно описаног, могу се извести следећи закључци:

1. Примена mMSCs смањује оштећење хепатоцита у Con A хепатитису.

- 1.1. mMSCs инхибирају секрецију проинфламацијских цитокина и смањују присуство запаљенских ћелија у ткиву јетре.
- 1.2. Смањење параметара системске инфламације у мишева са хепатитисом који су примили MSCs, последица је смањене заступљености проинфламацијских NKT ћелија, дендритских ћелија као и макрофага у ткиву јетре.

2. Примена mMSCs редукује оштећење јетре у α -GalCer хепатитису.

- 2.1. Примена mMSCs утиче на значајно смањење инфламације у јетри.
- 2.2. Примена mMSCs смањује присуство ефекторских NKT ћелија у јетри при чему не мења заступљеност и функционалне карактеристике интрахепатичних дендритских ћелија..ж
- 2.3. mMSCs повећавају заступљеност протективних Treg и Vreg лимфоцита у јетри.
- 2.4. Недостатак Vreg лимфоцита не мења имуносупресивни ефекат који mMSCs имају у фулминантном хепатитису.
- 2.5. Супресија хепатотоксичности NKT ћелија мезенхималним матичним ћелијама је значајно смањена након деплеције Treg лимфоцита.
- 2.6. mMSCs инхибирају секрецију проинфламацијских цитокина у NKT ћелијама и смањују цитотоксичку активност ових ћелија, смањујући експресију лиганата који индукују апоптозу хепатоцита.
- 2.7. Примена mMSCs супримира експресију про-апоптотских гена у α -GalCer хепатитису.
- 2.8. Кључни фактори које продукују mMSCs и чијом ензимском активношћу mMSCs директно супримирају ефекторске функције NKT ћелија и смањују оштећење хепатоцита су IDO и iNOS.
- 2.9. Активношћу ензима IDO, mMSCs повећавају продукцију имуносупресивног IL-10 у Treg лимфоцитима којим индиректно супримирају хепатотоксичност NKT ћелија.

2.10. hMSCs смањују цитотоксичност и продукцију проинфламацијских цитокина у хуманим NKT ћелијама паракрино, активношћу имуномодулаторних ензима IDO и iNOS

СКРАЋЕНИЦЕ

IL	интерлеукин (<i>interleukin</i>)
ROS	реактивни медијатори кисеоника (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
IFN- γ	интерферон- γ (<i>interferon-γ</i>)
NKG2A	инхибиторни рецептор урођено убилачких ћелија (<i>The inhibitory NK cell receptor</i>)
NKT ћелије	урођеноубилачки Т лимфоцити (<i>natural killer T cells</i>)
NK ћелије	урођеноубилачке ћелије (<i>natural killer cells</i>)
TLR	рецептор сличан Toll- γ (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF- α	фактор некрозе тумора- α (<i>tumor necrosis factor-α</i>)
MHC	молекул II класе главни комплекс ткивне подударности (<i>major histocompatibility complex</i>)
α -GalCer	α -галактоцерамид
NO	азот оксид
iNOS	индуцибилна азот оксид синтаза
WT	<i>wild type</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
EDTA	етилен диамин тетра сирћетна киселина (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
HRP	<i>Streptavidin HorseRadish Peroxidase</i>
SE	стандардна грешка (<i>Standard Error</i>)

7. РЕФЕРЕНЦЕ

1. O'Grady JG, Alexander GM, Hayalaan KM, Williams R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 1989; 97:439-445.
2. Lee WM. Acute liver failure. *N Engl J Med* 1993; 329:1862-1872.
3. Muto Y. Present status of fulminant hepatitis in Japan (1989-1991). *Gastroenterol Jpn* 1993; 28 (Suppl 4):120-127.
4. Ichai P, Samuel D. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis in adults. *Liv Transp* 2008;14: 67-79.
5. Rezende G, Roque-Afonso AM, Samuel D, Gigou M, Nicand E, Ferre V, Dussaix E, Bismuth H, Feray C. Viral and clinical factors associated with the fulminant course of hepatitis A infection. *Hepatology* 2003; 38:613-618.
6. Williams R, Wendon J. Indications for orthotopic liver transplantation in fulminant liver failure. *Hepatology* 1994; 20:5-10.
7. Areia M, Romaozinho JM, Ferreira M, Amaro P, Leitao MC. Fulminant hepatic failure: a Portuguese experience. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007; 19:665-669.
8. Gow PJ, Jones RM, Dobson JL, Angus PW. Etiology and outcome of fulminant hepatic failure managed at an Australian liver transplant unit. *J Gastroenterol Hepatol* 2004;19:154-159.
9. Alvarez F, Berg PA, Bianchi FB, Bianchi L, Burroughs AK, Cancado EL, Chapman RW, Cooksley WG, Czaja AJ, Desmet VJ, Donaldson PT, Eddleston AL, Fainboim L, Heathcote J, Homberg JC, Hoofnagle JH, Kakumu S, Krawitt EL, Mackay IR, MacSween RN, Maddrey WC, Manns MP, McFarlane IG, Meyer zum Buschenfelde KH, Zeniya M. International Autoimmune Hepatitis. Group report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. *J Hepatol* 1999;31:929-938.
10. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 2006; 354:54-66.
11. Gimson AES, O'Grady JG, Ede R, Portmann B, Williams R. Late-onset hepatic failure: clinical, serological and histological features. *Hepatology* 1986; 6:288-294.
12. Girardi E, Zajonc DM. Molecular basis of lipid antigen presentation by CD1d and recognition by natural killer T cells. *Immunol Rev* 2012; 250:167-179.
13. Ridgway WM, Gershwin ME. Prometheus unbound: NKT cells inhibit hepatic regeneration. *Hepatology* 2014; 60:1133-1135.
14. Yin S, Wang H, Bertola A, Feng D, Xu MJ, Wang Y, Gao B. *Hepatology* 2014; 60:1356-1366.

15. Liao CM, Zimmer MI, Wang CR. The functions of type I and type II natural killer T cells in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19:1330-1338.
16. Yu KOA, Porcelli SA. The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy. *Immunology Letters*, 2005; 100:42-55.
17. Brossay L, Chioda M, Burdin N, Koezuka Y, Casorati G, Dellabona P, Kronenberg M. CD1d-mediated Recognition of an α -Galactosylceramide by Natural Killer T Cells Is Highly Conserved through Mammalian Evolution. *J Exp Med* 1998; 188:1521-1528.
18. Kain L, Webb B, Anderson BL, Deng S, Holt M, Costanzo A, Zhao M, Self K, Teyton A1, Everett C, Kronenberg M, Zajonc DM, Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The Identification of the Endogenous Ligands of Natural Killer T Cells Reveals the Presence of Mammalian α -Linked Glycosylceramides. *Immunity* 2014; 41:543-554.
19. Halder RC, Aguilera C, Maricic I, Kumar V. Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT cells prevents inflammatory liver disease. *J Clin Invest* 2007; 117:2302-2312.
20. Wu L, Gabriel CL, Parekh VV, Van Kaer L. Invariant natural killer T cells: innate-like T cells with potent immunomodulatory activities. *Tissue Antigens* 2009; 73:535-545.
21. Egawa T, Eberl G, Taniuchi I, Benlagha K, Geissmann F, Hennighausen L, Bendelac A, Littman DR. Genetic Evidence Supporting Selection of the V α 14i NKT Cell Lineage from Double-Positive Thymocyte Precursors. *Immunity* 2005; 22:705-716.
22. Blomqvist M, Rhost S, Teneberg S, Löfbom L, Osterbye T, Brigl M, Månsson JE, Cardell SL. Multiple tissue-specific isoforms of sulfatide activate CD1d-restricted type II NKT cells. *Eur J Immunol* 2009; 39:1726-1735.
23. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:101-117.
24. Stanic AK, Park JJ, Joyce S. Innate self recognition by an invariant, rearranged T-cell receptor and its immune consequences. *Immunology* 2003; 109: 171-184.
25. Teige A, Bockermann R, Hasan M, Olofsson KE, Liu Y, Issazadeh-Navikas S. CD1d-Dependent NKT Cells Play a Protective Role in Acute and Chronic Arthritis Models by Ameliorating Antigen-Specific Th1 Responses. *J Immunol* 2010; 185:345-356.
26. Taniguchi M, Tashiro T, Dashtsoodol N, Hongo N, Watarai H. The specialized iNKT cell system recognizes glycolipid antigens and bridges the innate and acquired immune systems with potential applications for cancer therapy. *Int Immunol* 2010; 22: 1-6.
27. Cerundolo V, Silk JD, Masri SH, Salio M. Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:28-38.

28. Chun T, Page MJ, Gapin L, Matsuda JL, Xu H, Nguyen H, Kang HS, Stanic AK, Joyce S, Koltun WA, Chorney MJ, Kronenberg M, Wang CR. CD1d-expressing Dendritic Cells but Not Thymic Epithelial Cells Can Mediate Negative Selection of NKT Cells. *J Exp Med* 2003; 197:907-918.
29. Pellicci DG, Uldrich AP, Kyparissoudis K, Crowe NY, Brooks AG, Hammond KJ, Sidobre S, Kronenberg M, Smyth MJ, Godfrey DI. Intrathymic NKT cell development is blocked by the presence of α -galactosylceramide. *Eur J Immunol* 2003; 33:1816-1823.
30. Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:131-142
31. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. MOUSE CD1-SPECIFIC NK1 T CELLS: Development, Specificity, and Function. *Annual Review of Immunology* 1997; 15:535-562.
32. Darmoise A, Teneberg S, Bouzonville L, Brady RO, Beck M, Kaufmann SH, Winau F. Lysosomal α -Galactosidase Controls the Generation of Self Lipid Antigens for Natural Killer T Cells. *Immunity* 2010; 33:216-228.
33. Van Kaer L, Parekh V, Wu L. Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity. *Cell and Tissue Research* 2011; 343:43-55.
34. Kumar V. NKT-cell subsets: promoters and protectors in inflammatory liver disease. *J Hepatol* 2013; 59:618-20.
35. Hong S, Scherer DC, Singh N, Mendiratta SK, Serizawa I, Koezuka Y, Van Kaer L. Lipid antigen presentation in the immune system; lessons learned from CD 1 d knockout mice. *Immunol Rev* 1999; 169:31-44.
36. Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *J Leukoc Biol* 2009; 86:513-528.
37. Duwaerts CC, Gregory SH. Targeting the diverse immunological functions expressed by hepatic NKT cells. *Expert Opin Ther Targets* 2011; 15:973-988.
38. Sköld M, Behar SM. Role of CD1d-Restricted NKT Cells in Microbial Immunity. *Infect Immun* 2003; 71:5447-5455.
39. Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:131-142.
40. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:297-336.

41. Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Curr Opin Immunol* 2008; 20:358-368.
42. Paget C, Ivanov S, Fontaine J, Renneson J, Blanc F, Pichavant M, Dumoutier L, Ryffel B, Renauld JC, Gosset P, Gosset P, Si-Tahar M, Faveeuw C, Trottein F. Interleukin-22 Is Produced by Invariant Natural Killer T Lymphocytes during Influenza A Virus Infection: Potential role in protection against lung epithelial damages. *J Biol Chem* 2012; 287:8816-8829.
43. Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, Bendelac A. Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of the Innate Immune System: NKT Cells Rapidly Activate NK Cells. *J Immunol* 1999; 163:4647-4650.
44. Kim EY, Battaile JT, Patel AC, You Y, Agapov E, Grayson MH, Benoit LA, Byers DE, Alevy Y, Tucker J, Swanson S, Tidwell R, Tyner JW, Morton JD, Castro M, Polineni D, Patterson GA, Schwendener RA, Allard JD, Peltz G, Holtzman MJ. Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease. *Nat Med* 2008; 14:633-640.
45. Meyer EH, Goya S, Akbari O, Berry GJ, Savage PB, Kronenberg M, Nakayama T, DeKruyff RH, Umetsu DT. Glycolipid activation of invariant T cell receptor+ NK T cells is sufficient to induce airway hyperreactivity independent of conventional CD4+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:2782-2787.
46. Li L, Huang L, Sung SS, Lobo PI, Brown MG, Gregg RK, Engelhard VH, Okusa MD. NKT Cell Activation Mediates Neutrophil IFN- γ Production and Renal Ischemia-Reperfusion Injury. *J Immunol* 2007; 178:5899-5911.
47. Pichavant M, Goya S, Meyer EH, Johnston RA, Kim HY, Matangkasombut P, Zhu M, Iwakura Y, Savage PB, DeKruyff RH, Shore SA, Umetsu DT. Ozone exposure in a mouse model induces airway hyperreactivity that requires the presence of natural killer T cells and IL-17. *J Exp Med* 2008; 205:385-393.
48. Nieuwenhuis EE, Matsumoto T, Exley M, Schleipman RA, Glickman J, Bailey DT, Corazza N, Colgan SP, Onderdonk AB, Blumberg RS. CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from lung. *Nat Med* 2002; 8:588-593.
49. Sada-Ovalle I, Chiba A, Gonzales A, Brenner MB, Behar SM. Innate Invariant NKT Cells Recognize *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Macrophages, Produce Interferon- γ , and Kill Intracellular Bacteria. *PLoS Pathog* 2008; 4:e1000239.
50. Smyth MJ, Crowe NY, Pellicci DG, Kyriassoudis K, Kelly JM, Takeda K, Yagita H, Godfrey DI. Sequential production of interferon-gamma by NK1.1 (+) T cells and

- natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood* 2002; 99:1259-66.
51. Galli G, Nuti S, Tavarini S, Galli-Stampino L, De Lalla C, Casorati G, Dellabona P, Abrignani S. CD1d-restricted Help To B Cells By Human Invariant Natural Killer T Lymphocytes. *J Exp Med* 2003; 197:1051-1057.
 52. Swain MG. Natural Killer T Cells within the Liver: Conductors of the Hepatic Immune Orchestra. *Digestive Diseases* 2010 28: 7-13.
 53. De Santo C, Arscott R, Booth S, Karydis I, Jones M, Asher R, Salio M, Middleton M, Cerundolo V. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat Immunol* 2010; 11:1039-1046.
 54. Wingender G, Hiss M, Engel I, Peukert K, Ley K, Haller H, Kronenberg M, von Vietinghoff S. Neutrophilic Granulocytes Modulate Invariant NKT Cell Function in Mice and Humans. *J Immunol* 2012; 188:3000-3008.
 55. Swain MG. Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clin Sci (Lond)* 2008; 114: 457-466.
 56. Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000; 192:921-30.
 57. Harada K, Isse K, Tsuneyama K, Ohta H, Nakanuma Y. Accumulating CD57 + CD3 + natural killer T cells are related to intrahepatic bile duct lesions in primary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2003; 23:94-100.
 58. Kita H, Naidenko OV, Kronenberg M, Ansari AA, Rogers P, He XS, Koning F, Mikayama T, Van De Water J, Coppel RL, Kaplan M, Gershwin ME. Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology* 2002; 123:1031-1043.
 59. Tajiri K, Shimizu Y. Role of NKT Cells in the Pathogenesis of NAFLD. *Int J Hepatol* 2012; 2012:6.
 60. Tajiri K, Shimizu Y, Tsuneyama K, Sugiyama T. Role of liver-infiltrating CD3+CD56+ natural killer T cells in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21:673-680.
 61. Adler M, Taylor S, Okebugwu K, Yee H, Fielding C, Fielding G, Poles M. Intrahepatic natural killer T cell populations are increased in human hepatic steatosis. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 1725-31.
 62. Cheriñavsky AC, Paladino N, Rubio AE, De Biasio MB, Periolo N, Cuarterolo M, Goñi J, Galoppo C, Cañero-Velasco MC, Muñoz AE, Fainboim H, Fainboim L.

- Simultaneous expression of th1 cytokines and IL-4 confers severe characteristics to type I autoimmune hepatitis in children. *Human Immunology* 2004; 65:683-691.
63. de Lalla C, Galli G, Aldrighetti L, Romeo R, Mariani M, Monno A, Nuti S, Colombo M, Callea F, Porcelli SA, Panina-Bordignon P, Abrignani S, Casorati G, Dellabona P. Production of Profibrotic Cytokines by Invariant NKT Cells Characterizes Cirrhosis Progression in Chronic Viral Hepatitis. *J Immunol* 2004; 173:1417-1425.
64. Fisicaro P, Valdatta C, Boni C, Massari M, Mori C, Zerbini A, Orlandini A, Sacchelli L, Missale G, Ferrari C. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut* 2009; 58:974-982.
65. Yamagiwa S, Matsuda Y, Ichida T, Honda Y, Takamura M, Sugahara S, Ishikawa T, Ohkoshi S, Sato Y, Aoyagi Y. Sustained response to interferon- α plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C is closely associated with increased dynamism of intrahepatic natural killer and natural killer T cells. *Hepatology* 2008; 48:664-672.
66. Jin Z, Sun R, Wei H, Gao X, Chen Y, Tian Z. Accelerated liver fibrosis in hepatitis B virus transgenic mice: Involvement of natural killer T cells. *Hepatology* 2011; 53:219-229.
67. Li B, Sun R, Wei H, Gao B, Tian Z. Interleukin-15 prevents concanavalin A-induced liver injury in mice via NKT cell-dependent mechanism. *Hepatology* 2006; 43:1211-1219.
68. Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:5498-5503.
69. Biburger M, Tiegs G. Alpha-galactosylceramide-induced liver injury in mice is mediated by TNF-alpha but independent of Kupffer cells. *J Immunol* 2005; 175:1540-1550.
70. Cao Z, Dhupar R, Cai C, Li P, Billiar TR, Geller DA. A Critical Role for IFN Regulatory Factor 1 in NKT Cell-Mediated Liver Injury Induced by α -Galactosylceramide. *J Immunol* 2010; 185:2536-2543.
71. Wu SJ, Yang YH, Tsuneyama K, Leung PS, Illarionov P, Gershwin ME, Chuang YH. Innate immunity and primary biliary cirrhosis: activated invariant natural killer T cells exacerbate murine autoimmune cholangitis and fibrosis. *Hepatology* 2011; 53:915-925.

72. Schruppf E, Jiang X, Zeissig S, Pollheimer MJ, Anmarkrud JA, Tan C, Exley MA, Karlsen TH, Blumberg RS, Melum E. The role of natural killer T cells in a mouse model with spontaneous bile duct inflammation. *Physiol Rep* 2017; 5:e13117.
73. Chuang YH, Lian ZX, Yang GX, Shu SA, Moritoki Y, Ridgway WM, Ansari AA, Kronenberg M, Flavell RA, Gao B, Gershwin ME. Natural killer T cells exacerbate liver injury in a transforming growth factor beta receptor II dominant-negative mouse model of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2008; 47:571-80.
74. Wehr A, Baeck C, Heymann F, Niemietz PM, Hammerich L, Martin C, Zimmermann HW, Pack O, Gassler N, Hittatiya K, Ludwig A, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Chemokine Receptor CXCR6-Dependent Hepatic NK T Cell Accumulation Promotes Inflammation and Liver Fibrosis. *J Immunol* 2013; 190:5226-5236.
75. Ishikawa S, Ikejima K, Yamagata H, Aoyama T, Kon K, Arai K, Takeda K, Watanabe S. CD1d-restricted natural killer T cells contribute to hepatic inflammation and fibrogenesis in mice. *J Hepatol* 2011; 54:1195-1204.
76. Minagawa M, Deng Q, Liu ZX, Tsukamoto H, Dennert G. Activated natural killer T cells induce liver injury by Fas and tumor necrosis factor- α during alcohol consumption. *Gastroenterology* 2004; 126:1387-1399.
77. Syn WK, Oo YH, Pereira TA, Karaca GF, Jung Y, Omenetti A, Witek RP, Choi SS, Guy CD, Fearing CM, Teaberry V, Pereira FE, Adams DH, Diehl AM. Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 51:1998-2007.
78. Syn WK, Agboola KM, Swiderska M, Michelotti GA, Liaskou E, Pang H, Xie G, Philips G, Chan IS, Karaca GF, Pereira Tde A, Chen Y, Mi Z, Kuo PC, Choi SS, Guy CD, Abdelmalek MF, Diehl AM. NKT-associated hedgehog and osteopontin drive fibrogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2012; 61:1323-1329.
79. Deng ZB, Liu Y, Liu C, Xiang X, Wang J, Cheng Z, Shah SV, Zhang S, Zhang L, Zhuang X, Michalek S, Grizzle WE, Zhang HG. Immature myeloid cells induced by a high-fat diet contribute to liver inflammation. *Hepatology* 2009; 50:1412-1420.
80. Shimamura K, Kawamura H, Nagura T, Kato T, Naito T, Kameyama H, Hatakeyama K, Abo T. Association of NKT cells and granulocytes with liver injury after reperfusion of the portal vein. *Cell Immunol* 2005; 234:31-38.
81. Arrenberg P, Maricic I, Kumar V. Sulfatide-Mediated Activation of Type II Natural Killer T Cells Prevents Hepatic Ischemic Reperfusion Injury In Mice. *Gastroenterology* 2011; 140:646-655.

82. Lappas CM, Day YJ, Marshall MA, Engelhard VH, Linden J. Adenosine A2A receptor activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation. *J Exp Med* 2006; 203:2639-2648.
83. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005; 6:345-52.
84. Wang HY, Wang RF. Regulatory T cells and cancer. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:217-23.
85. Holm TL, Nielsen J, Claesson MH. CD4+CD25+ regulatory T cells: phenotype and physiology. *APMIS*. 2004; 112:629-41.
86. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune response. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:531-562
87. Miyara M, Sakaguchi S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol Med* 2007; 13:108-116.
88. D'Abrosio D. Regulatory T cells: how do they find their space in the immunological arena? *Semin Cancer Biol* 2006; 16:91-97.
89. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P.. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:1206-1212.
90. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Chen JF, Enjyoji K, Linden J, Oukka M, Kuchroo VK, Strom TB, Robson SC. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*. 2007; 204:1257-1265.
91. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 175:4180-4183.
92. Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchenker W, Martin F, Zitvogel L. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- β dependent manner. *J Exp Med* 2005; 202:1075-1085.
93. Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H. Human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res* 2003; 63:4516-4520.
94. Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 2004; 172:4676-4680.

95. Chang KM. Regulatory T cells and the liver: a new piece of the puzzle. *Hepatology* 2005; 41:700-702.
96. Longhi M, Ma Y, Bogdanos D, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Impairment of CD4+CD25+ regulatory T-cells in autoimmune liver disease. *J Hepatol* 2004; 41:31–37.
97. Longhi M, Ma Y, Mitry R, Bogdanos D, Heneghan M, Cheeseman P, Mieli-Vergani G, Vergani D. Effect of CD4+ CD25+ regulatory T-cells on CD8 T-cell function in patients with autoimmune hepatitis. *J Autoimmun* 2005; 25:63–71.
98. Longhi MS, Hussain M, Mitry R, Arora S, Mieli-Vergani G, Vergani D, Ma Y. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2006; 176:4484–4491.
99. Lan RY, Cheng C, Lian ZX, Tsuneyama K, Yang GX, Moritoki Y, Chuang YH, Nakamura T, Saito S, Shimoda S, Tanaka A, Bowlus CL, Takano Y, Ansari AA, Coppel RL, Gershwin ME. Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2006; 43:729–737.
100. Wei HX, Chuang Y, Li B, Wei H, Sun R, Moritoki Y, Gershwin M, Lian ZX, Tian Z. CD4+CD25+ Foxp3+ regulatory T cells protect against T cell-mediated fulminant hepatitis in a TGF- β -dependent manner in mice. *J Immunol* 2008; 181:7221-7229.
101. Lehmann J, Huehn J, de la Rosa M, Maszyzna F, Kretschmer U, Krenn V, Brunner M, Scheffold A, Hamann A. Expression of the integrin $\alpha E\beta 7$ identifies unique subsets of CD25+ as well as CD25- regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:13031–13036.
102. Suffia I, Reckling S, Salay G, Belkaid Y. A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol* 2005; 174:5444–5455.
103. Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, Arora SK, Mieli-Vergani G, Vergani D, et al. Functional study of CD4+CD25+ regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis. *J Immunol* 2006; 176:4484-4491.
104. Lan RY, Cheng C, Lian ZX, Tsuneyama K, Yang GX, Moritoki Y, et al. Liver-targeted and peripheral blood alterations of regulatory T cells in primary biliary cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2006; 43:729-737.
105. Vergani D, Choudhuri K, Bogdanos DP, Mieli-Vergani G. Pathogenesis of autoimmune hepatitis. *Clin Liver Dis* 2002; 6:727-737.

106. Dennert G, Aswad F. The role of NKT cells in animal models of autoimmune hepatitis. *Crit Rev Immunol* 2006; 26:453-473.
107. Lalor PF, Shields P, Grant A, Adams DH. Recruitment of lymphocytes to the human liver. *Immunol Cell Biol* 2002; 80:52-64.
108. Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol* 1999; 163:6236-6243.
109. Erhardt A, Biburger M, Papadopoulos T, Tiegs G. IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology* 2007; 45:475-485.
110. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008; 112:1570-1580.
111. Rosser EC, Blair PA, Mauri C. Cellular targets of regulatory B cell-mediated suppression. *Molecular Immunology* 2014; 62:296-304.
112. Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol* 2006; 176:705–710.
113. Yang M, Rui K, Wang S, Lu L. Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol* 2013; 10:122-132.
114. Mauri C, Bosma A. Immune Regulatory Function of B Cells. *Annu Rev Immunol* 2012; 30:221-241.
115. He Y, Qian H, Liu Y, Duan L, Li Y, Shi G. The Roles of Regulatory B Cells in Cancer. *J Immunol Res* 2014; 2014:215471.
116. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*. 2012; 30: 221-241.
117. Evans JG, Chavez-Rueda KA, Eddaoudi A, Meyer-Bahlburg A, Rawlings DJ, Ehrenstein MR, Mauri C. Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. *J Immunol* 2007; 178:7868-7878.
118. DiLillo DJ, Matsushita T, Tedder TF. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1183:38-57.
119. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 2008; 28:639-650.

120. Carter N, Rosser E, Mauri C. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2012; 14:R32
121. Olkhanud PB, Damdinsuren B, Bodogai M, Gress RE, Sen R, Wejksza K, Malchinkhuu E, Wersto RP, Biragyn A. Tumor-Evoked Regulatory B Cells Promote Breast Cancer Metastasis by Converting Resting CD4+ T Cells to T-Regulatory Cells. *Cancer Res* 2011; 71:3505-3515.
122. Zhang Y, Eliav Y, Shin SU, Schreiber TH, Podack ER, Tadmor T, Rosenblatt JD. B lymphocyte inhibition of anti-tumor response depends on expansion of Treg but is independent of B-cell IL-10 secretion. *Cancer Immunol Immunother* 2013; 62:87-99.
123. Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of Arthritis by Interleukin 10-producing B Cells. *J Exp Med* 2003; 197:489-501.
124. Singh A, Carson WF 4th, Secor ER Jr, Guernsey LA, Flavell RA, Clark RB, Thrall RS, Schramm CM. Regulatory Role of B Cells in a Murine Model of Allergic Airway Disease. *J Immunol* 2008; 180:7318-7326.
125. Lee KM, Stott RT, Zhao G, SooHoo J, Xiong W, Lian MM, Fitzgerald L, Shi S, Akrawi E, Lei J, Deng S, Yeh H, Markmann JF, Kim JI. TGF- β -producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur J Immunol* 2014; 44:1728-1736.
126. Lee JH, Noh J, Noh G, Choi WS, Cho S, Lee SS. Allergen-Specific Transforming Growth Factor- β -Producing CD19(+)CD5(+) Regulatory B-Cell (Br3) Responses in Human Late Eczematous Allergic Reactions to Cow's Milk. *J Interferon Cytokine Res* 2011; 31: 441-449.
127. Hussaarts L1, van der Vlugt LE, Yazdanbakhsh M, Smits HH. Regulatory B-cell induction by helminths: Implications for allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128: 733-739.
128. Rosser EC, Blair PA, Mauri C. Cellular targets of regulatory B cell-mediated suppression. *Molecular Immunology* 2014; 62:296-304.
129. Yang M, Rui K, Wang S, Lu L. Regulatory B cells in autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol* 2013 10:122-132.
130. Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN. B Cell Regulation of CD4+CD25+ T Regulatory Cells and IL-10 Via B7 is Essential for Recovery From Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol* 2007; 178:3447-3456.

131. Ray A, Basu S, Williams CB, Salzman NH, Dittel BN. A Novel IL-10–Independent Regulatory Role for B Cells in Suppressing Autoimmunity by Maintenance of Regulatory T Cells via GITR Ligand. *J Immunol* 2012; 188:3188-3198.
132. Minagawa R, Okano S, Tomita Y, Kishihara K, Yamada H, Nomoto K, Shimada M, Maehara Y, Sugimachi K, Yoshikai Y, Nomoto K. The Critical Role of Fas-Fas Ligand Interaction in Donor-Specific Transfusion-Induced Tolerance to H-Y Antigen. *Transplantation* 2004; 78:799-806.
133. Lundy S. Killer B lymphocytes: the evidence and the potential. *Inflammation Research*, 2009; 58:345-357.
134. Zhong X, Tumang JR, Gao W, Bai C, Rothstein TL. PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for VH11/VH12 and phosphatidylcholine binding. *Eur J Immunol* 2007; 37:2405-2410.
135. Singh AK, Stock P, Akbari O. Role of PD-L1 and PD-L2 in allergic diseases and asthma. *Allergy* 2011; 66:155-162.
136. Saze Z, Schuler PJ, Hong CS, Cheng D, Jackson EK, Whiteside TL. Adenosine production by human B cells and B cell–mediated suppression of activated T cells. *Blood* 2013; 122:9-18.
137. Kaku H, Cheng KF, Al-Abed Y, Rothstein TL. A Novel Mechanism of B Cell–Mediated Immune Suppression through CD73 Expression and Adenosine Production. *J Immunol* 2014; 193:5904-5913.
138. Shimomura Y, Mizoguchi E, Sugimoto K, Kibe R, Benno Y, Mizoguchi A, Bhan AK. Regulatory role of B-1 B cells in chronic colitis. *Int Immunol* 2008; 20:729-737.
139. Carter NA, Vasconcellos R, Rosser EC, Tulone C, Muñoz-Suano A, Kamanaka M, Ehrenstein MR, Flavell RA, Mauri C. Mice Lacking Endogenous IL-10–Producing Regulatory B Cells Develop Exacerbated Disease and Present with an Increased Frequency of Th1/Th17 but a Decrease in Regulatory T Cells. *J Immunol* 2011; 186:5569-5579.
140. Yoshizaki A, Miyagaki T, DiLillo DJ, Matsushita T, Horikawa M, Kountikov EI, Spolski R, Poe JC, Leonard WJ, Tedder TF. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* 2012; 491:264-268.
141. Montandon R, Korniotis S, Layseca-Espinosa E, Gras C, Mégret J, Ezine S, Dy M, Zavala F. Innate pro–B-cell progenitors protect against type 1 diabetes by regulating autoimmune effector T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:E2199-208

- 142.Lundy SK, Boros DL. Fas Ligand-Expressing B-1a Lymphocytes Mediate CD4⁺-T-Cell Apoptosis during Schistosomal Infection: Induction by Interleukin 4 (IL-4) and IL-10. *Infect Immun* 2002; 70:812-819.
- 143.Qin Z, Richter G, Schüler T, Ibe S, Cao X, Blankenstein T. B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med* 1998; 4:627-630.
- 144.Bankoti R, Gupta K, Levchenko A, Stäger S. Marginal Zone B Cells Regulate Antigen-Specific T Cell Responses during Infection. *J Immunol* 2012;188:3961-3971.
- 145.Höllsberg P, Batra V, Dressel A, Hafler DA. Induction of anergy in CD8 T cells by B cell presentation of antigen. *J Immunol* 1996; 157: 5269-5276.
- 146.Schioppa T, Moore R, Thompson RG, Rosser EC, Kulbe H, Nedospasov S, Mauri C, Coussens LM, Balkwill FR. B regulatory cells and the tumor-promoting actions of TNF- α during squamous carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:10662-10667.
- 147.Neves P, Lampropoulou V, Calderon-Gomez E, Roch T, Stervbo U, Shen P, Kühl AA, Loddenkemper C, Haury M, Nedospasov SA, Kaufmann SH, Steinhoff U, Calado DP, Fillatreau S. Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity* 2010; 33:777-790.
- 148.Zhang Y, Eliav Y, Shin SU, Schreiber TH, Podack ER, Tadmor T, Rosenblatt JD. B lymphocyte inhibition of anti-tumor response depends on expansion of Treg but is independent of B-cell IL-10 secretion. *Cancer Immunol Immunother* 2013; 62:87-99.
- 149.Lo-Man R. Regulatory B cells control dendritic cell functions. *Immunotherapy* 2011; 3:19-20.
- 150.Shetty S, Bruns T, Weston CJ, Stamataki Z, Oo YH, Long HM, Reynolds GM, Pratt G, Moss P, Jalkanen S, Hubscher SG, Lalor PF, Adams DH. Recruitment mechanisms of primary and malignant B cells to the human liver. *Hepatology* 2012; 56:1521-1531.
- 151.Moritoki Y, Tsuda M, Tsuneyama K, Zhang W, Yoshida K, Lian ZX, Yang GX, Ridgway WM, Wicker LS, Ansari AA, Gershwin ME. B cells promote hepatic inflammation, biliary cyst formation, and salivary gland inflammation in the NOD.c3c4 model of autoimmune cholangitis. *Cell Immunol* 2011; 268:16-23.
- 152.Novobrantseva TI, Majeau GR, Amatucci A, Kogan S, Brenner I, Casola S, Shlomchik MJ, Kotliansky V, Hochman PS, Ibraghimov A. Attenuated liver fibrosis in the absence of B cells. *J Clin Invest* 2005; 115: 3072-3082.

153. Edwards JC, Cambridge G. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:394-403.
154. Hutchinson E. Receptors and effectors. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:576-576.
155. Dhirapong A, Lleo A, Yang GX, Tsuneyama K, Dunn R, Kehry M, Packard TA, Cambier JC, Liu FT, Lindor K, Coppel RL, Ansari AA, Gershwin ME. B cell depletion therapy exacerbates murine primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2011; 53:527-535.
156. Jankovic D, Cheever AW, Kullberg MC, Wynn TA, Yap G, Caspar P, Lewis FA, Clynes R, Ravetch JV, Sher A. CD4+ T Cell-mediated Granulomatous Pathology in Schistosomiasis Is Downregulated by a B Cell-dependent Mechanism Requiring Fc Receptor Signaling. *J Exp Med* 1998; 187:619-29.
157. Almishri W, Deans J, Swain MG. Rapid activation and hepatic recruitment of innate-like regulatory B cells after invariant NKT cell stimulation in mice. *J Hepatol* 2015; 63:943-51.
158. Zhang X. Regulatory functions of innate-like B cells. *Cell Mol Immunol* 2013; 10:113-121.
159. Shetty S, Bruns T, Weston CJ, Stamataki Z, Oo YH, Long HM, Reynolds GM, Pratt G, Moss P, Jalkanen S, Hubscher SG, Lalor PF, Adams DH. Recruitment mechanisms of primary and malignant B cells to the human liver. *Hepatology* 2012; 56:1521-1531.
160. Subramanian M, Kini R, Madasu M, Ohta A, Nowak M, Exley M, Sitkovsky M, Ohta A. Extracellular adenosine controls NKT-cell-dependent hepatitis induction. *Eur J Immunol* 2014; 44:1119-1129.
161. Srinivas VR, Reddy GB, Ahmad N, Swaminathan CP, Mitra N, Surolia A. Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1527:102-111.
162. Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest* 1992; 90:196-203.
163. Zhu R, Diem S, Araujo LM, Aumeunier A, Denizeau J, Philadelphie E, Damotte D, Samson M, Gourdy P, Dy M, Schneider E, Herbelin A. The Pro-Th1 cytokine IL-12 enhances IL-4 production by invariant NKT cells: relevance for T cell-mediated hepatitis. *J Immunol* 2007; 178:5435-5442.

164. Toyabe S, Seki S, Iiai T, Takeda K, Shirai K, Watanabe H, Hiraide H, Uchiyama M, Abo T. Requirement of IL-4 and liver NK1+ T cells for concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *J Immunol* 1997; 159:1537-1542.
165. Kaneko Y, Harada M, Kawano T, Yamashita M, Shibata Y, Gejyo F, Nakayama T, Taniguchi M. Augmentation of V α 14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J Exp Med* 2000; 191:105-114.
166. Tagawa Y, Kakuta S, Iwakura Y. Involvement of Fas/Fas ligand system-mediated apoptosis in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *Eur J Immunol*. 1998; 28:4105-4113.
167. Tagawa Y, Sekikawa K, Iwakura Y. Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN- γ -/- mice, but not in TNF- α -/- mice: role for IFN- γ in activating apoptosis of hepatocytes. *J Immunol* 1997; 159:1418-1428.
168. Jaruga B, Hong F, Kim WH, Gao B. IFN-gamma/STAT1 acts as a proinflammatory signal in T cell-mediated hepatitis via induction of multiple chemokines and adhesion molecules: a critical role of IRF-1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 287:1044-1052.
169. Grivennikov SI, Tumanov AV, Liepinsh DJ, Kruglov AA, Marakusha BI, Shakhov AN, Murakami T, Drutskaya LN, Förster I, Clausen BE, Tessarollo L, Ryffel B, Kuprash DV, Nedospasov SA. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by T cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. *Immunity* 2005; 22:93-104.
170. Wolf D, Hallmann R, Sass G, Sixt M, Küsters S, Fregien B, Trautwein C, Tiegs G. TNF α - induced expression of adhesion molecules in the liver is under the control of TNFR1--relevance for concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol* 2001; 166:1300-1307.
171. Fushimi S, Ogino T, Hara J, Takahata T, Wakabayashi H, Watanabe H, Arashima Y, Kubo M, Matsukawa A. Forced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in T cells protects the development of concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Clin Immunol* 2009; 133:437-446.
172. Watanabe Y, Morita M, Akaike T. Concanavalin A induces perforin-mediated but not Fas-mediated hepatic injury. *Hepatology* 1996; 24:702-710.
173. Kakumu S, Ishikawa T, Wakita T, Yoshioka K, Takayanagi M, Tahara H, Kusakabe A. Interferon-gamma production specific for hepatitis B virus antigen by intrahepatic

- T lymphocytes in patients with acute and chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol* 1994; 89:92–96.
174. Tiegs G. Experimental hepatitis and role of cytokines. *Acta Gastroenterol Belg* 1997; 60:176-179.
175. Wei HX, Chuang Y, Li B, Wei H, Sun R, Moritoki Y, Gershwin M, Lian ZX, Tian Z. CD4+CD25+ Foxp3+ regulatory T cells protect against T cell-mediated fulminant hepatitis in a TGF- β -dependent manner in mice. *J. Immunol* 2008; 181:7221-7229.
176. Louis H, Le Moine O, Goldman M, Devière J. Modulation of liver injury by interleukin-10. *Acta Gastroenterol Belg* 2003; 66:7-14.
177. Kato M, Ikeda N, Matsushita E, Kaneko S, Kobayashi K. Involvement of IL-10, an antiinflammatory cytokine in murine liver injury induced by Concanavalin A. *Hepatol Res* 2001; 20:232-243.
178. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 2005; 6:338–344.
179. Hung JT, Huang JR, Yu AL. Tailored design of NKT-stimulatory glycolipids for polarization of immune responses. *J Biomed Sci* 2017; 24:22.
180. Simoni Y, Diana J, Ghazarian L, Beaudoin L, Lehuen A. Therapeutic manipulation of natural killer (NK) T cells in autoimmunity: are we close to reality? *Clin Exp Immunol* 2013; 171:8-19.
181. Matsumoto H, Kawamura T, Kobayashi T, Kanda Y, Kawamura H, Abo T. Coincidence of autoantibody production with the activation of natural killer T cells in alpha-galactosylceramide-mediated hepatic injury. *Immunology* 2011; 133:21-28.
182. Wang H, Feng D, Park O, Yin S, Gao B. Invariant NKT cell activation induces neutrophil accumulation and hepatitis: opposite regulation by IL-4 and IFN- γ . *Hepatology* 2013; 58:1474-1485.
183. Milosavljevic N[#], Gazdic M[#], Markovic BS, Arsenijevic A, Nurkovic J, Dolicanin Z, Djonov V, Lukic ML, Volarevic V. Mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury by altering ratio between IL-17 producing and regulatory NKT cells. *Liver Transpl* 2017. doi: 10.1002/lt.24784.
184. Wondimu Z, Santodomingo-Garzon T, Le T, Swain MG. Protective role of interleukin-17 in murine NKT cell-driven acute experimental hepatitis. *Am J Pathol* 2010; 177:2334-2346.

185. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luriá EA, Ruadkow IA. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 1974; 2:83–92.
186. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284:143–147.
187. Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med* 2012; 18:128–134.
188. Battula VL, Evans KW, Hollier BG, Shi Y, Marini FC, Ayyanan A, Wang RY, Brisken C, Guerra R, Andreeff M, Mani SA. Epithelia-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2010; 28:1435–1445.
189. Takashima Y, Era T, Nakao K, Kondo S, Kasuga M, Smith AG, Nishikawa S. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell* 2007; 129:1377–1388.
190. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Jacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008; 3:301–313.
191. Volarevic V, Al-Qahtani A, Arsenijevic N, Pajovic S, Lukic ML. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-1Ra producing mesenchymal stem cells as modulators of diabetogenesis. *Autoimmunity* 2010; 43:255–263.
192. 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; 25:2739-2749.
193. Xie XH, Wang XL, He YX, Liu Z, Sheng H, Zhang G, Qin L. Promotion of bone repair by implantation of cryopreserved bone marrow-derived mononuclear cells in a rabbit model of steroid-associated osteonecrosis. *Arthritis Rheum* 2012; 64:1562-1571.
194. Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, Tanizawa T, Takahashi HE. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab* 1999; 17:17171-17177.
195. Mueller SM, Glowacki J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem* 2001; 82:583-590.

196. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003; 33:919-926.
197. Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, Han ZC. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis supportive function and other potentials. *Haematologica* 2006; 91:1017-1026.
198. 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; 13:4279-4295.
199. Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon SJ, Jeon HB, Choi SJ, Kim SW, Yang YS, Oh W, Chang JW. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci* 2013; 14:17986-18001.
200. 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; 24:1294-1301.
201. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315–317.
202. Barry FP. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res. C. Embryo Today* 2003; 69:250–256.
203. Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 284:411–418.
204. Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:4397–4402.
205. Alhadlaq A, Mao JJ. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells. *J Dent Res* 2003; 82:951–956.
206. Alhadlaq A, Mao JJ. Tissue-engineered osteochondral constructs in the shape of an articular condyle. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87:936–944.

207. Marion NW, Liang W, Reilly G, Day DE, Rahaman MN, Mao JJ. Borate glass supports the in vitro osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Mech Adv Mater Struct* 2005; 3:239–246.
208. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64:278–294.
209. Graves SE, Francis MJO, Gundle R, Beresoford JN. Primary culture of human trabecular bone: Effects of L-ascorbate-2-phosphate. *Bone* 1994a; 15:132–133.
210. Graves SE, Gundle R, Francis MJO, Beresoford JN. Ascorbate increases collagen synthesis and promote differentiation in human bone derived cell cultures. *Bone* 1994b; 15:133.
211. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997; 64:295–312.
212. Frank O, Heim M, Jakob M, Barbero A, Schafer D, Bendik I, Dick W, Heberer M, Martin I. Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *J Cell Biochem*. 2002; 85:737–746
213. Malaval L, Liu F, Roche P, Aubin JE. Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 1999; 74:616–627.
214. Alhadlaq A, Tang M, Mao JJ. Engineered adipose tissue from human mesenchymal stem cells maintains predefined shape and dimension: Implications in soft tissue augmentation and reconstruction. *Tissue Eng* 2005; 11:556–566.
215. Janderova L, McNeil M, Murrell AN, Mynatt RL, Smith SR. Human mesenchymal stem cells as an in vitro model for human adipogenesis. *Obes Res* 2003; 11:65–74.
216. Nakamura T, Shiojima S, Hirai Y, Iwama T, Tsuruzoe N, Hirasawa A, Katsuma S, Tsujimoto G. Temporal gene expression changes during adipogenesis in human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 303:306–312.
217. Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000; 16:145–171.
218. Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: Molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res* 2005; 306:330–335.
219. Khan E, Abu-Amer Y. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits differentiation of preosteoblasts. *J Lab Clin Med* 2003; 142:29–34.

- 220.Cheng SL, Shao JS, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem* 2003; 278:45969–45977.
- 221.Gazdic M, Volarevic V, Arsenijevic N, Stojkovic M. Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem Cell Rev* 2015; 11:280-287.
- 222.Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 2013; 13:392–402.
- 223.Li W, Ren G, Huang Y, Su J, Han Y, Li J, Chen X, Cao K, Chen Q, Shou P, Zhang L, Yuan ZR, Roberts AI, Shi S, Le AD, Shi Y. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death and Differentiation* 2012; 19:1505–1513.
- 224.Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y. Mesenchymal stem cell mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2008; 2:141–150.
- 225.Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 2010; 5:e10088.
- 226.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; 26:151–162.
- 227.Cassatella MA, Mosna F, Micheletti A, Lisi V, Tamassia N, Cont C, Calzetti F, Pelletier M, Pizzolo G, Krampera M. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells* 2011; 29:1001–1011.
- 228.Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 2010; 1:2.
- 229.Brandau S, Jakob M, Hemeda H, Bruderek K, Janeschik S, Bootz F, Lang S. Tissue-resident mesenchymal stem cells attract peripheral blood neutrophils and enhance their inflammatory activity in response to microbial challenge. *J Leukoc Biol* 2010; 88:1005–1015.

230. Hall SR, Tsoyi K, Ith B, Padera RF Jr, Lederer JA, Wang Z, Liu X, Perrella MA. Mesenchymal stromal cells improve survival during sepsis in the absence of heme oxygenase-1: the importance of neutrophils. *Stem Cells* 2013; 31:397–407.
231. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, Mezey E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009; 15:42–49.
232. 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; 26:562–569.
233. Griffin M, Elliman SJ, Cahill E, English K, Ceredig R, Ritter T. Concise review: adult mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory diseases: how well are we joining the dots? *Stem Cells* 2013; 31:2033–2041.
234. Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B, Ringdén O. Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol* 2007; 65:336–343.
235. Duffy M.M, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther* 2011; 2:34.
236. Keating A. How do mesenchymal stromal cells suppress T cells? *Cell Stem Cell* 2008; 2:106–108.
237. Nauta AJ, Fibbe EW. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007; 110:3499–3506.
238. Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'huillier A, Zhang J, Lu Y, Roberts AI, Ji W, Zhang H, Rabson AB, Shi Y. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 2009; 27:1954–1962.
239. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2007; 109:228–234.
240. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* 2012; 33:136–43.
241. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004; 103:4619–4621.

242. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi, F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105:2821–2827.
243. 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; 99:3838–3843.
244. Nasef A, Chapel A, Mazurier C, Bouchet S, Lopez M, Mathieu N, Sensebé L, Zhang Y, Gorin NC, Thierry D, Fouillard L. Identification of IL- 10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expr* 2007; 13:217–226.
245. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105:1815–1822.
246. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 2010; 1:2.
247. Chabannes D, Hill M, Merieau E, Rossignol J, Brion R, Souillou JP, Anegón I, Cuturi MC. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood* 2007; 110:3691–3694.
248. Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Kim YM, Chung KR, Chung HT. Carbon monoxide produced by Heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation by inhibition of IL2 production. *J Immunol* 2004; 172:4744–4751.
249. Bright JJ, Kerr LD, Sriram S. TGF-beta inhibits IL-2- induced tyrosine phosphorylation and activation of Jak-1 and Stat 5 in T lymphocytes. *J Immunol* 1997; 159:175–183.
250. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol* 2012; 188:21–28.
251. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Ex Cell Res* 2005; 305:33–41.
252. Nasef A, Mazurier C, Bouchet S, François S, Chapel A, Thierry D, Gorin NC, Fouillard L. Leukemia inhibitory factor: role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunol* 2008; 253:16–22.

253. Sioud M, Mobergslien A, Boudabous A, Floisand Y. Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation. *Scand J Immunol* 2010; 71:267–274.
254. Lepelletier Y, Lecourt S, Renand A, Arnulf B, Vanneaux V, Ferman JP, Menasché P, Domet T, Marolleau JP, Hermine O, Larghero J. Galectin-1 and semaphorin-3A are two soluble factors conferring T-cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. *Stem Cells Dev* 2010; 19:1075–1079.
255. Sivanathan KN, Gronthos S, Rojas-Canales D, Thierry B, Coates PT. Interferon-gamma modification of mesenchymal stem cells: implications of autologous and allogeneic mesenchymal stem cell therapy in allotransplantation. *Stem Cell Rev* 2014; 10:351–375.
256. Bassi ÊJ, de Almeida DC, Moraes-Vieira PM, Câmara NO. Exploring the role of soluble factors associated with immune regulatory properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* 2012; 8:329–342.
257. Duffy MM, Pindjakova J, Hanley SA, McCarthy C, Weidhofer GA, Sweeney EM, English K, Shaw G, Murphy JM, Barry FP, Mahon BP, Belton O, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor. *Eur J Immunol* 2011; 41:2840–2851.
258. Nauta A, Kruisselbrink A, Lurvink E, Willemze R, Fibbe W. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34⁺-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2006; 177:2080–2087.
259. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam E, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 2007; 83:71–76.
260. Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, Deng W, Zhao RC. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev* 2004; 13:263–271.
261. 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; 105:4120–4126.
262. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Pence 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; 25:2025–2032.
263. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 2009; 113:6576–6583.
264. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005; 105:2214–2219.
265. Liu WH, Liu JJ, Wu J, Zhang LL, Liu F, Yin L, Zhang MM, Yu B. Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. *PLoS One* 2013; 8:e55487.
266. Ghannam S, Pène J, Moquet-Torcy G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol* 2010; 185:302–312.
267. Del Papa B, Sportoletti P, Cecchini D, Rosati E, Balucani C, Baldoni S, Fettucciari K, Marconi P, Martelli MF, Falzetti F, Di Ianni M. Notch1 modulates mesenchymal stem cells mediated regulatory T-cell induction. *Eur J Immunol* 2013; 43:182–187.
268. 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; 90:516–525.
269. 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; 82:887–893.
270. Li M, Sun X, Kuang X, Liao Y, Li H, Luo D. Mesenchymal stem cells suppress CD8(+) T cell-mediated activation by suppressing natural killer group 2, member D protein receptor expression and secretion of prostaglandin E2, indoleamine 2, 3-dioxygenase and transforming growth factor- β . *Clin Exp Immunol* 2014; 178:516–524.
271. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis A D, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 2006; 24:74–85.

272. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24:386–398.
273. Spaggiari G, 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; 111:1327–1333.
274. 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; 27:693–702.
275. Prockop DJ. Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. *Stem Cells* 2013; 31:2042–2046.
276. Eggenhofer E, Hoogduijn MJ. Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transplant Res* 2012; 1:12.
277. Melief SM, Schrama E, Brugman MH, Tiemessen MM, Hoogduijn MJ, Fibbe WE, Roelofs H. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* 2013; 31:1980–1991.
278. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, Mezey E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009; 15: 42–49.
279. Choi H, Lee RH, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- κ B signaling in resident macrophages. *Blood* 2011; 118:330–338.
280. Melief S, Geutskens S, Fibbe W, Roelofs H. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica* 2013; 98:888–895.

281. François M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther* 2012; 20:187–195.
282. Selmani Z, Najj A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. Human leukocyte antigen- G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺regulatory T cells. *Stem Cells* 2008; 26:212–222.
283. Tabera S, Pérez-Simón JA, Díez-Campelo M, Sánchez-Abarca LI, Blanco B, López A, Benito A, Ocio E, Sánchez-Guijo FM, Cañizo C, San Miguel JF. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica* 2008; 93:1301–1309.
284. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 2006; 107:367–372.
285. Rafei M, Hsieh J, Fortier S, Li M, Yuan S, Birman E, Forner K, Boivin MN, Doody K, Tremblay M, Annabi B, Galipeau J. Mesenchymal stromal cell-derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. *Blood* 2008; 112:4991–4998.
286. Wu Z, Han M, Chen T, Yan W, Ning Q. Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Liver Int* 2010; 30:782-794.
287. 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; 55:1954–1964.
288. Volarevic V, Mitrovic M, Milovanovic M, Zelen I, Nikolic I, Mitrovic S, Pejnovic N, Arsenijevic N, Lukic ML. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. *J Hepatol* 2012; 56:26–33.
289. Volarevic V, Misirkic M, Vucicevic L, Paunovic V, Simovic Markovic B, Stojanovic M, Milovanovic M, Jakovljevic V, Micic D, Arsenijevic N, Trajkovic V, Lukic ML. *Arch Toxicol* 2015; 89:437-450.
290. Volarevic V, Paunovic V, Markovic Z, Simovic Markovic B, Misirkic-Marjanovic M, Todorovic-Markovic B, Bojic S, Vucicevic L, Jovanovic S, Arsenijevic N, Holclajtner-Antunovic I, Milosavljevic M, Dramicanin M, Kravic-Stevovic T, Ciric D,

- Lukic ML, Trajkovic V. Large Graphene Quantum Dots Alleviate Immune-Mediated Liver Damage. *ACS Nano* 2014; 8:12098-12109.
291. Kubo N, Narumi S, Kijima H, Mizukami H, Yagihashi S, Hakamada K, Nakane A. Efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for fulminant hepatitis in mice induced by concanavalin A. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27:165-172.
292. Zhu X, He B, Zhou X, Ren J. Effects of transplanted bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in animal models of acute hepatitis. *Cell Tissue Res* 2013; 351:477-486.
293. Heymann F, Hamesch K, Weiskirchen R, Tacke F. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. *Lab Anim* 2015; 49:12-20.
294. Tagawa Y, Sekikawa K, Iwakura Y. Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN-gamma(-/-) mice, but not in TNF-alpha(-/-) mice: role for IFN-gamma in activating apoptosis of hepatocytes. *J Immunol* 1997; 159:1418-1428.
295. Sun K, Xie X, Xie J, Jiao S, Chen X, Zhao X, Wang X, Wei L. Cell-based therapy for acute and chronic liver failures: distinct diseases, different choices. *Sci Rep* 2014; 4:6494.
296. Ryu KH, Kim SY, Kim YR, Woo SY, Sung SH, Kim HS, Jung SC, Jo I, Park JW. Tonsil-derived mesenchymal stem cells alleviate concanavalin A-induced acute liver injury. *Exp Cell Res* 2014; 326:143-154.
297. Volarevic V, Markovic BS, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, Besra GS, Arsenijevic N, Paunovic V, Trajkovic V, Lukic ML. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol* 2015; 45:531-543.
298. Higashimoto M, Sakai Y, Takamura M, Usui S, Nasti A, Yoshida K, Seki A, Komura T, Honda M, Wada T, Furuichi K, Ochiya T, Kaneko S. Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4+ T-cell suppression. *Eur J Immunol* 2013; 43:2956-2968.
299. Zhang Y, Cai W, Huang Q, Gu Y, Shi Y, Huang J, Zhao F, Liu Q, Wei X, Jin M, Wu C, Xie Q, Zhang Y, Wan B, Zhang Y. Mesenchymal stem cells alleviate bacteria-induced liver injury in mice by inducing regulatory dendritic cells. *Hepatology* 2014; 59:671-682.
300. Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2007; e941:1-6.

301. van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology* 2008; 47:1634–1643.
302. Xagorari A, Siotou E, Yiangou M, Tsolaki E, Bougiouklis D, Sakkas L, Fassas A, Anagnostopoulos A. Protective effect of mesenchymal stem cell conditioned medium on hepatic cell apoptosis after acute liver injury. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6:831–840.
303. Huang B, Cheng X, Wang H, Huang W, la Ga Hu Z, Wang D, Zhang K, Zhang H, Xue Z, Da Y, Zhang N, Hu Y, Yao Z, Qiao L, Gao F, Zhang R. Mesenchymal stem cells and their secreted molecules predominantly ameliorate fulminant hepatic failure and chronic liver fibrosis in mice respectively. *J Transl Med* 2016; 14:45.
304. Nurković J, Dolićanin Z, Tutić I et al. 2013, Adipose tissue mesenchymal stem cells-isolation, cultivation and induced differentiation, *Praxis Medica*, 42: 45-50.
305. 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; 41:315-324.
306. Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One* 2014; 9: e107001.
307. Huang JR, Tsai YC, Chang YJ, Wu JC, Hung JT, Lin KH, Wong CH, Yu AL. α -Galactosylceramide but not phenyl-glycolipids induced NKT cell anergy and IL-33-mediated myeloid-derived suppressor cell accumulation via upregulation of *egr2/3*. *J Immunol* 2014; 192:1972-1981.
308. 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; 108:3938-3944.
309. Strick-Marchand H, Masse G, Weiss M, Di Santo J. Lymphocytes support oval cell-dependent liver regeneration. *J of Immunol* 2008; 181:2764 -2771.
310. Apte R, Niederkorn J, Mayhew E, Alizadeh H. Angiostatin produced by certain primary uveal melanoma cell lines impedes the development of liver metastases. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:1805-1809.
311. Pala P, Hussel T, Openshaw PJM. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Meth* 2000; 243: 107-124.
312. Krampera M, Galipeau J, Shi Y, Tarte K, Sensebe L; MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Immunological characterization of

- multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy* 2013; 15:1054-1061.
313. Wang S, Zhang X, Ju Y, Zhao B, Yan X, Hu J, Shi L, Yang L, Ma Z, Chen L, Liu Y, Duan Z, Chen X, Meng S. MicroRNA-146a feedback suppresses T cell immune function by targeting Stat1 in patients with chronic hepatitis B. *J Immunol* 2013; 191:293-301.
314. Ling W, Zhang J, Yuan Z, Ren G, Zhang L, Chen X, Rabson AB, Roberts AI, Wang Y, Shi Y. Mesenchymal stem cells use IDO to regulate immunity in tumor microenvironment. *Cancer Res* 2014; 74:1576-1587.
315. Hua J, Liang S, Ma X, Webb TJ, Potter JP, Li Z. The interaction between regulatory T cells and NKT cells in the liver: a CD1d bridge links innate and adaptive immunity. *PLoS One* 2011; 6:e27038.
316. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol* 2014; 15:1009-1016.
317. Volarevic V, Nurkovic J, Arsenijevic N, Stojkovic M. Concise review: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis. *Stem Cells* 2014; 32:2818-2823.
318. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 2004; 4:231-237.
319. Molano A, Illarionov PA, Besra GS, Putterman C, Porcelli SA. Modulation of invariant natural killer T cell cytokine responses by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunol Lett* 2008; 117:81-90.
320. Johnston B, Kim CH, Soler D, Emoto M, Butcher EC. Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR alpha beta NKT cell subsets. *J Immunol* 2003; 171:2960-2969.
321. Subramanian M, Kini R, Madasu M, Ohta A, Nowak M, Exley M, Sitkovsky M, Ohta A. Extracellular adenosine controls NKT-cell-dependent hepatitis induction. *Eur J Immunol* 2014; 44:1119-1129.
322. Nagy L. Would eating carrots protect your liver? A new role involving NKT cells for retinoic acid in hepatitis. *Eur J Immunol* 2012; 42:1677-1680.
323. Luk F, Carreras-Planella L, Korevaar SS, de Witte SFH, Borràs FE, Betjes MGH, Baan CC, Hoogduijn MJ, Franquesa M. Inflammatory Conditions Dictate the Effect of

- Mesenchymal Stem or Stromal Cells on B Cell Function. *Front Immunol.* 2017 Aug 28;8:1042.
324. Cai Y, Zou Z, Liu L, Chen S, Chen Y, Lin Z, Shi K, Xu L, Chen Y. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits hepatocyte apoptosis after acute liver injury. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8:107-116.
325. Sun Y, Leaman DW. Involvement of Noxa in cellular apoptotic responses to interferon, double-stranded RNA, and virus infection, *J Biol Chem* 2005; 280:15561-15568.
326. Yu J, Zhang L. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene* 2008; 27 Suppl 1:S71-83.
327. Biswas S. Context Dependent Role of P53 Up-Regulated Modulator of Apoptosis (Puma) During Liver Degeneration and Regeneration. *J Liver Res Disord Ther* 2016; 2:00027.
328. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281:1191-1193.
329. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3 dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol.* 2013 Mar;34(3):137-43.
330. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3- dioxygenase. *Immunity* 2005; 22:633-642.
331. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC, Puccetti P. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 2006; 176:6752-6761.
332. Stamler JS, Singel DJ, and Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 258:1898–1902.
333. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012; 33:829-837.
334. Niedbala W, Cai B, Liew FY. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:iii37–iii40.

335. Hoffman RA, Mahidhara RS, Wolf-Johnston AS, Lu L, Thomson AW, Simmons RL. Differential modulation of CD4 and CD8 T-cell proliferation by induction of nitric oxide synthesis in antigen presenting cells. *Transplantation* 2002; 74:836–845.
336. Edwards TM, Rickard NS. New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. *Neurosci Biobehav Rev* 2007; 31:413–425.
337. Murad F. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med*. 2006; 355:2003–2011.
338. López AS, Alegre E, Díaz A, Mugueta C, González A. Bimodal effect of nitric oxide in the enzymatic activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in human monocytic cells. *Immunol Lett* 2006; 106:163-171.
339. Jeffery HC, Braitch MK, Brown S, Oo YH. Clinical Potential of Regulatory T Cell Therapy in Liver Diseases: An Overview and Current Perspectives. *Front Immunol* 2016; 7:334.
340. Choi YS, Lee J, Lee HW, Chang DY, Sung PS, Jung MK, Park JY, Kim JK, Lee JI, Park H, Cheong JY, Suh KS, Kim HJ, Lee JS, Kim KA, Shin EC. Liver injury in acute hepatitis A is associated with decreased frequency of regulatory T cells caused by Fas-mediated apoptosis. *Gut* 2015; 64:1303-1313.
341. Lu L, Feng M, Gu J, Xia Z, Zhang H, Zheng S, Duan Z, Hu R, Wang J, Shi W, Ji C, Shen Y, Chen G, Zheng SG, Han YP. Restoration of intrahepatic regulatory T cells through MMP-9/13-dependent activation of TGF- β is critical for immune homeostasis following acute liver injury. *J Mol Cell Biol* 2013; 5:369-379.
342. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R, Servillo G, Brunacci C, Calvitti M, Biccato S, Mazza EM, Boon L, Grassi F, Fioretti MC, Fallarino F, Puccetti P, Grohmann U. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol*. 2011; 12:870-878.

ПРИЛОГ

8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број:

РБ

Идентификациони број:

ИБР

Тип документације:

ТД

Монографска публикација

Тип записа:

ТЗ

Текстуални штампани материјал

Врста рада:

ВР

Докторска дисертација

Аутор:

АУ

Марина М. Газдић

Ментор/коментор

МН

др сци.мед. Владислав Б. Воларевић,
ванредни професор

Наслов рада:

НР

Ефекат мезенхималних матичних
ћелија на оштећење јетре узроковано
активацијом NKT ћелија

Језик публикације:

ЈП

Српски (ћирилица)

Језик извода:

ЈИ

Српски/енглески

Земља публикавања:

Србија

ЗП	
Уже географско подручје:	Србија
УГП	
Година:	2017.
ГО	
Издавач:	Ауторски репринт
ИЗ	
Место и адреса:	34000 Крагујевац, Србија, Светозара
МС	Марковића 69
Физички опис рада:	Дисертација има 169 страна, садржи 8
ФО	поглавља, 17 фигура, 18 графикона, 2
	табеле, 22 слике и 342 референце
Научна област:	Медицина
Научна дисциплина:	Матичне ћелије у биомедицинским
ДИ	наукама
Предметна одредница/кључне речи:	Мезенхималне матичне ћелије, НКТ
ПО	ћелије, акутно оштећење јетре
УДК	
Чува се:	У Библиотеци Факултета медицинских
ЧУ	наука у Крагујевцу, 34000 Крагујевац, Србија, Светозара Марковића 69
Важна напомена:	
МН	
Извод:	
ИД	

Мезенхималне матичне ћелије (енгл. *mesenchymal stem cells*, MSCs) се због својих имуномодулаторних карактеристика сматрају потенцијалним терапијским средством за лечење фулминантног хепатитиса. Међутим, ефекат MSCs на фенотип и функције урођеноубилачких Т лимфоцита (енгл. *natural killer T cells*, НКТ), главних ефекторских ћелија у овој болести још увек није познат.

Како би се испитао утицај MSCs на хепатотоксичност NKT ћелија, у овом истраживању су коришћени модели акутног оштећења јетре који су C57Bl/6 мишевима индуковани апликацијом конканавалина А (енгл. *concanavalin A*, ConA) односно α -галактоцерамида (енгл. *α -galactosylceramide*, α -GalCer). Биохемијски тестови и квантитативна хистологија су указали да MSCs значајно редукују акутно оштећење хепатоцита изазвано применом Con A или α -GalCer-а, што је у корелацији са смањеном заступљеношћу инфламацијских NKT ћелија (TNF- α -, IFN- γ -, T-bet⁺ CD4⁺ и CD1d tetramer⁺ као и GATA3⁺, IL-4⁺ NKT ћелија) у јетри и смањеном концентрацијом TNF- α , IFN- γ и IL-4 у серуму мишева са хепатитисом. MSCs су супримирале продукцију TNF- α , IFN- γ и IL-4, а повећавале продукцију имуносупресивног IL-10 у α -GalCer-ом стимулираним NKT ћелијама јетре, *ex vivo*. Апликација MSCs смањила је експресију FASL, CD107 и TRAIL на NKT ћелијама јетре, и следствено, смањила цитотоксичку активност NKT ћелија према хепатоцитима *in vitro*. Примена 1-метил триптофана, фармаколошког инхибитора индоламин 2, 3-диоксигеназе (енгл. *indolamine 2,3-dioxygenase*, IDO) и L-монометил аргинин цитрата, специфичног инхибитора индуцибилне азот оксид синтазе (енгл. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) укинула је хепатопротективни ефекат кондиционираног медијума генерисаног од MSCs, као и имуномодулаторно дејство MSCs на NKT ћелије *in vitro*. IDO и iNOS су главни медијатори којим су хумане MSCs супримирале ефекторске функције α -GalCer-ом стимулираних хуманих мононуклеарних ћелија периферне крви.

Најважнији закључак ове дисертације је да MSCs каталитичком активношћу ензима IDO и iNOS, супримирају цитотоксичност и продукцију инфламацијских цитокина у NKT ћелијама у јетри и редукују оштећење хепатоцита.

Кључне речи

Мезенхималне матичне ћелије; NKT ћелије; имуносупресија; акутно оштећење јетре

Датум прихватања теме од 30.09.2015. године

стране ННВ:

ДП

Датум одбране:

ДО

Чланови комисије:

КО

- Председник: Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор – емеритус Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија
- Члан: Проф. др Небојша Арсенијевић, редовни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за ужу научне области Микробиологија и имунологија и Онкологија
- Члан: Проф. др Миодраг Стојковић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика
- Члан: Академик проф. др Владимир Бумбаширевић, редовни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Хистологија и ембриологија
- Члан: Проф. др Владимир Трајковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду за ужу научну област Имунологија

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: Marina Gazdic
AU

Menthor/co-mentor: Prof Vladislav Volarevic
MN

Title: Mesenchymal stem cells-mediated modulation of NKT cell-dependent liver injury
TI

Language of text: Serbian (Cyrillic)
LT

Language of abstract: Serbian/English

Country of publication: Serbia
CP

Locality of publication: Serbia
LP

Publication year: 2017.
PY

Publisher: Author reprint
PU

Publication place: 34000 Kragujevac, Serbia, Svetozara
PP Markovica 69

Physical description: Thesis contains 169 pages, 8 chapters, 17
PD figures, 18 graphs, 2 tables, 22 pictures,
and 342 citations

Scientific field: Medicine
SF

Scientific discipline: Stem cells in biomedical research
SD

Subject/key words: Mesenchymal stem cells, NKT cells, acute
SKW liver injury

UDC

Holding data: Library of Faculty of Medical Sciences,
Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia,
Svetozara Markovica 69

Note:

N

Abstract:

AB

Mesenchymal stem cells (MSCs) are, due to immunomodulatory characteristics, considered as novel agents in the treatment of immune-mediated acute liver failure. However, the effects of MSCs on phenotype and function of natural killer T (NKT) cells, major effector cells in fulminant hepatitis, is not understood.

We used concanavalin A (ConA) - and α -galactosylceramide (α -GalCer)-induced liver injury to evaluate effects of MSCs on NKT-dependent hepatotoxicity. Mouse MSCs (mMSCs) significantly reduced Con A- and α -GalCer-mediated hepatitis in C57Bl/6 mice, as demonstrated by histopathological and biochemical analysis, attenuated influx of inflammatory (T-bet⁺ TNF- α , IFN- γ producing and GATA3⁺, IL-4-producing) liver NKT cells and down-regulated TNF- α , IFN- γ and IL-4 levels in the sera. The liver NKT cells cultured *in vitro* with mMSCs produced lower amounts of inflammatory cytokines (TNF- α , IFN- γ , IL-4) and higher amounts of immunosuppressive IL-10 upon α -GalCer stimulation. mMSC treatment attenuated expression of apoptosis-inducing ligands (FASL, CD107 and

TRAIL) on liver NKT cells and suppressed the expression of pro-apoptotic genes in the livers of α -GalCer-treated mice. mMSCs reduced cytotoxicity of liver NKT cells against hepatocytes *in vitro*. The presence of 1-methyl-DL-tryptophan, a specific inhibitor of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) or L-NG-monomethyl Arginine citrate, specific inhibitor of inducible nitric oxide synthase (iNOS), in mMSC-conditioned medium injected to α -GalCer-treated mice, counteracted the hepatoprotective effect of mMSCs *in vivo*, and restored pro-inflammatory cytokine production and cytotoxicity of NKT cells *in vitro*. Human MSCs in iNOS and IDO-dependent manner, attenuated the production of inflammatory cytokines in α -GalCer-stimulated human peripheral blood mononuclear cells and reduced their cytotoxicity against HepG2 cells. In conclusion, MSCs protect from acute liver injury by attenuating cytotoxicity and capacity of liver NKT cells to produce inflammatory cytokines in iNOS and IDO dependent manner.

Keywords

Mesenchymal stem cells; NKT cells; Immunosuppression; Acute liver injury

Accepted by the Scientific Board on: 30.09.2015. године

ASB

Defended on:

DE

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty)

DB

President: Prof. dr Miodrag L. Lukić, Professor Emeritus of University of Kragujevac

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

Member: Prof. dr Miodrag Stojkovic, Professor of Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac

Member: Prof. dr Vladimir Bumbasirevic, Professor of Histology and embryology, Medical Faculty, University of Belgrade

Member: Prof. dr Vladimir Trajkovic, Associate Professor of Microbiology and Immunology, Medical Faculty, University of Belgrade

БИОГРАФИЈА

Др. мед. Марина Газдић рођена је 17.12.1987. године у Крагујевцу. Основну школу и Прву крагујевачку гимназију, завршила је као носилац дипломе „Вук Караџић“. Интегрисане академске студије Медицинског факултета Универзитета у Крагујевцу уписала је 2006/2007. године, а дипломирала 2012. године, са просечном оценом 9,42. Након дипломирања обавила је приправнички лекарски стаж и положила стручни испит за доктора медицине. У току студирања, школске 2007/2008. и 2008/2009. године учествовала је у настави као демонстратор на предмету Хистологија и ембриологија. Школске 2012/2013. године уписала је Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Матичне ћелије у биомедицинским наукама. Усмени докторски испит је положила у јулу 2013. године са оценом 10 (десет).

Две године је обављала посао сарадника у настави на предмету Генетика. У децембру 2014. године изабрана је у звање асистента на предмету Генетика на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Укључена је у научно-истраживачки рад у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија на Факултету медицинских наука у Крагујевцу. Др. мед. Марина Газдић је аутор и коаутор у десет радова у часописима од међународног значаја и 2 рада у часописима националног значаја. Остварила је 81 бод по основу радова објављених у целини у међународним или домаћим часописима, бодованих према члану 177. Статута факултета.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Gazdic M**, Simovic Markovic B, Vucicevic L, Nikolic T, Djonov V, Arsenijevic N, Trajkovic V, Lukic ML, Volarevic V. Mesenchymal stem cells protect from acute liver injury by attenuating hepatotoxicity of liver NKT cells in iNOS and IDO dependent manner. *J Tissue Eng Regen Med*. 2017. doi: 10.1002/term.2452.
2. Milosavljevic N[#], **Gazdic M[#]**, Markovic BS, Arsenijevic A, Nurkovic J, Dolicanin Z, Djonov V, Lukic ML, Volarevic V. Mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury by altering ratio between IL-17 producing and regulatory NKT cells. *Liver Transpl*. 2017. doi: 10.1002/lt.24784.
3. **Gazdic M**, Arsenijevic A, Simovic Markovic B, Volarevic A, Dimova I, Djonov V, Arsenijevic N, Stojkovic M, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cell-Dependent Modulation Of Liver Diseases. *Int J Biol Sci*. 2017. doi:10.7150/ijbs.20240.
4. Volarevic V, **Gazdic M**, Simovic Markovic B, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N. Mesenchymal stem cell-derived factors: immuno-modulatory effects and therapeutic potential. *BioFactors*. 2017 doi: 10.1002/biof.1374.
5. **Gazdic M**, Simovic Markovic B, Jovicic N, Misirkic-Marjanovic M, Djonov V, Jakovljevic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Mesenchymal Stem Cells Promote Metastasis of Lung Cancer Cells by Downregulating Systemic Antitumor Immune Response. *Stem Cells Int*. 2017;2017:6294717. doi: 10.1155/2017/6294717.
6. Arsenijevic M, Milovanovic M, Jovanovic S, Arsenijevic N, Markovic BS, **Gazdic M**, Volarevic V. In vitro and in vivo anti-tumor effects of selected platinum(IV) and dinuclear platinum(II) complexes against lung cancer cells. *J Biol Inorg Chem*. 2017 Apr 18. doi: 10.1007/s00775-017-1459-y.
7. **Gazdic M**, Volarevic V, Arsenijevic A, Erceg S, Moreno-Manzano V, Arsenijevic N, Stojkovic M. Stem Cells and Labeling for Spinal Cord Injury. *Int J Mol Sci*. 2016;18(1). pii: E6. doi: 10.3390/ijms18010006.
8. Simovic Markovic B, Nikolic A, **Gazdic M**, Nurkovic J, Djordjevic I, Arsenijevic N, Stojkovic M, Lukic M, Volarevic V. Pharmacological inhibition of Gal-3 in mesenchymal stem cells enhances their capacity to promote alternative activation of macrophages in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Stem Cells Int*. 2016;2016:2640746. doi: 10.1155/2016/2640746.
9. Simovic Markovic B, Nikolic A, **Gazdic M**, Bojic S, Vucicevic L, Kosic M, Mitrovic S, Milosavljevic M, Besra G, Trajkovic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V.

Gal-3 plays an important pro-inflammatory role in the induction phase of acute colitis by promoting activation of NLRP3 inflammasome and production of IL- β in macrophages. *J Crohns Colitis* 2016; 10(5):593-606.

10. **Gazdic M**, Volarevic V, Arsenijevic N, Stojkovic M. Mesenchymal Stem Cells: A Friend or Foe in Immune-Mediated Diseases. *Stem Cell Rev* 2015; 11(2): 280-287.
11. **Gazdic M**, Volarevic V, Stojkovic M. Stem cells: new hope for spinal cord injury. *Ser J Exp Clin Res* 2015; 16(1): 3-8.
12. Simovic Markovic B[#], Milosavljevic N[#], Arsenijevic A, **Gazdic M**, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Bacterial flora plays important role in acute dextran sulphate sodium-induced colitis but is not involved in Gal-3 dependent modulation of colon inflammation. *Ser J Exp Clin Res* 2017, doi: 10.1515/sjerc-2017-0022.

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

која је одбрањена на _____
Универзитета у Крагујевцу представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну одбрањеној докторској дисертацији.

У _____, _____ године,

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРНИМ ЊАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, _____,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

која је одбрањена на _____

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем преузимања.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам¹

¹ Уколико аутор избере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадnicima јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих *Creative Commons* лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада²

У _____, _____ године,

потпис аутора

² Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадnicima јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од *Creative Commons* лиценци да заокруже једну од поменутих лиценци. Детаљан садржај наведених лиценци доступан је на: <http://creativecommons.org/rs/>