

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena S. Kocić

EFEKTI I MEHANIZMI DELOVANJA
INTERLEUKINA-17 NA FUNKCIJE
MEZENHIMSKIH I ENDOTELSKIH ĆELIJA

doktorska disertacija



Beograd, 2012.

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Jelena S. Kocić

**EFEKTI I MEHANIZMI DELOVANJA
INTERLEUKINA-17 NA FUNKCIJE
MEZENHIMSKIH I ENDOTELSKIH ĆELIJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Jelena S. Kocić

**EFFECTS OF INTERLEUKIN-17 ON
MESENCHYMAL AND ENDOTHELIAL CELL
FUNCTIONS AND MECHANISMS INVOLVED**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012.

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

MENTORI:

dr Diana Bugarski, naučni savetnik
Institut za medicinska istraživanja
Univerzitet u Beogradu

dr Aleksandra Korać, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Juan Santibañez, naučni savetnik
Institut za medicinska istraživanja
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: -----

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

ZAHVALNICA

Veliku zahvalnost dugujem dr Diani Bugarski, za pruženu priliku, veliku podršku, za sve korisne i dobronamerne sugestije i smernice koje su učinile da ova disertacija dobije pravi smisao.

Veliko hvala prof. dr Aleksandri Korać, za slikovita predavanja tokom osnovnih i doktorskih studija sa posebno kreativnim pristupom biologiji ćelija, kojima me je usmerila na naučni put.

Najiskrenije hvala dr Juan-u Santibañez-u, mom laboratorijskom učitelju, na velikodušno pruženom znanju i nesebičnoj podršci. Posebno sam zahvalna jer me je naučio da pristupam problemima u nauci, i van nje, sa strpljenjem i pozitivnim stavom, spremna da proširujem svoje vidike.

Veliko hvala dr Aleksandri Krstić, za svu pomoć, savete i pruženo znanje, kako u istraživačkom radu, tako i pri uobličavanju doktorske disertacije, a posebno na prijateljskoj saradnji i iskrenoj podršci.

Hvala dr Vesni Ilić, na velikom strpljenju, pruženom znanju i brojnim korisnim savetima u istraživačkom radu.

Mojim kolegama, Ivani Okić Đorđević, Drenki Trivanović i mr Slavku Mojsiloviću, dugujem veliku zahvalnost za praktičnu pomoć u izradi ove doktorske disertacije, za drugarstvo i kolegijalnost.

Hvala prof. dr Milanu Terziću na zalaganju koje je uložio kako bismo dobili uzorke tkiva pupčanika za istraživanja sprovedena u okviru ovog rada.

Hvala mojoj porodici na beskrajnoj ljubavi i podršci, a posebno na hrabrosti koju su imali kada su mi podarili svoj najveći poklon – samostalnost.

Hvala Milošu i Jelici koji prate moje korake s ljubavlju.

EFEKTI I MEHANIZMI DELOVANJA INTERLEUKINA-17 NA FUNKCIJE MEZENHIMSKIH I ENDOTELSKIH ČELIJA

REZIME

Interleukin (IL) 17 familija citokina se smatra najmanje istraženom citokinskom familijom sa značajnom ulogom u procesu inflamacije. Ubikvitarna rasprostranjenost receptora za IL-17 omogućava ovom citokinu mnogobrojne biološke efekte u organizmu, poput važne uloge u imunskom odgovoru i regulaciji procesa hematopoeze, ali i u progresiji različitih bolesti, uključujući inflamatorna, autoimunska i maligna oboljenja. IL-17 ima ulogu u ćelijskim procesima poput proliferacije i diferencijacije, i to prvenstveno na hematopoetskim matičnim i progenitor ćelijama, pri čemu IL-17 ispoljava različite efekte na proliferaciju i diferencijaciju zavisno od tipa ćelijske loze i stepena diferencijacije ćelija. Takođe, zbog ubikvitarne rasprostranjenosti svog receptora, IL-17 je uključen u interakcije između imunskog sistema i somatskih tkiva. Novija istraživanja su pokazala da IL-17 ima i ulogu finog regulatora diferencijacije mezenhimskih matičnih ćelija (MSC, *Mesenchymal stem cells*), s obzirom na to da stimuliše osteogenu diferencijaciju dok, s druge strane, inhibira adipogenu diferencijaciju humanih MSC.

Savremena istraživanja biologije MSC ukazala su na širok opseg njihove potencijalne terapijske primene, prvenstveno u regenerativnoj medicini, jer ove multipotentne adultne matične ćelije koje predstavljaju nediferencirane ćelije sa sposobnošću samoobnove, imaju sposobnost diferenciranja u ćelije tkiva mezenhimskog porekla, poput osteoblasta, hondroblasta i adipocita, a prema saznanjima koja imamo danas, i u ćelije tkiva ektodermalnog i endodermalnog porekla. Matične ćelije različitog stepena multipotentnosti izolovane su iz raznih adultnih tkiva, kao i perinatalnih tkiva koja se poslednjih godina sve češće pominju kao povoljan izvor MSC. Međutim, i pored velikog napretka u ovoj oblasti, nema konačnih saznanja kako o mehanizmima odgovornim za regulaciju višestrukih funkcija MSC, tako i o njihovom ukupnom terapijskom potencijalu. Kako biološke funkcije MSC umnogome zavise od konteksta

mikrosredine, ispitivanje interakcija MSC i IL-17 u održavanju multipotentnosti, mobilizaciji i usmerenoj diferencijaciji MSC je od posebnog značaja.

Pored mezenhimskih ćelija, IL-17 ostvaruje svoje efekte delovanjem na endotelske ćelije. Jedan od terapijskih ciljeva u regenerativnoj medicini, koji je još uvek nedovoljno objašnjen, je i podsticanje revaskularizacije oštećenog tkiva. Stimulacija postojećih, *in situ* prisutnih endotelskih ćelija na angiogenezu je jedan od mogućih mehanizama. Efekti IL-17 na endotelske ćelije nisu do sada u potpunosti opisani, i poznato je samo da IL-17 u prisustvu drugih poznatih angiogenih faktora stimuliše sposobnost endotelskih ćelija za angiogenezu. Pored toga, poznato je da se funkcije ćelija kao i delovanje citokina značajano razlikuju u zavisnosti od procenta kiseonika prisutnog u mikrosredini ćelija. Efekat delovanja IL-17 na endotelske ćelije u prisustvu različitih koncentracija kiseonika do sada nije istraživan. Takođe je još uvek nepoznato da li IL-17 može uticati na diferencijaciju MSC u endotelske ćelije. Da bi se sprovela istraživanja u ovom pravcu, neophodno je uspostaviti pogodan model za diferencijaciju MSC u endotelske ćelije.

Cilj istraživanja ove disertacije bilo je ispitivanje efekata IL-17 na različite ćelijske funkcije mezenhimskih i endotelskih ćelija u specifičnim uslovima mikrosredine. Analizirano je dejstvo IL-17 na proliferaciju, migraciju, angiogenezu i diferencijaciju ćelija. Istraživani su i molekularni mehanizmi koji omogućavaju finu regulaciju ćelijskih funkcija od strane IL-17, analizom aktivacije signalnih molekula, kao i ekspresije gena i proteina neophodnih za specifične funkcije. Posebna pažnja u istraživanjima bila je posvećena izolaciji, karakterizaciji i endotelskoj diferencijaciji primarnih MSC iz tkiva pupčanika (UC-MSC, *Umbilical cord-mesenchymal stem cells*).

U okviru razjašnjavanja efekata i mehanizama delovanja IL-17 na diferencijaciju mezenhimskih ćelija, primenjena je multipotentna mišja C2C12 ćelijska linija. Uticaj IL-17 na diferencijaciju analiziran je na osnovu ekspresije gena i proteina specifičnih za određeni tip diferencijacije: teškog lanca miozina (MyHC, *Myosin heavy chain*) i miogenina za miogenu, a alkalne fosfataze (ALP, *Alkaline phosphatase*), Runx2/Cbfa1 (*Runt-related transcription factor 2/Core-binding factor subunit alpha-1*) transkripcionog faktora i ciklooksigenaze 2 (Cox-2, *Cyclooxygenase 2*) za osteogenu diferencijaciju. Pored toga, utvrđivano je učešće mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK) i morfogenetskih proteina kosti (BMP, *Bone morphogenic proteins*) u IL-17-

usmerenoj diferencijaciji C2C12 ćelija. Rezultati su pokazali da IL-17 inhibira miogenu i stimuliše osteogenu diferencijaciju C2C12 ćelija, s obzirom na to da je IL-17-zavisna inhibicija miogeneze povezana sa redukcijom ekspresije iRNK za miogenin, redukcijom ekspresije MyHC i izostankom formiranja miotuba, dok je IL-17-zavisna indukcija osteogeneze povezana sa indukcijom ekspresije iRNK za Runx2/Cbfa1, indukcijom ekspresije Cox-2 i povišenom aktivnošću ALP. Rezultati su takođe pokazali da IL-17 ostvaruje ove efekte putem aktivacije ERK1,2 MAPK signalnog puta, nezavisno od BMP-Smad signalnog puta.

U drugom delu ove studije ispitivan je efekat IL-17 na funkcije endotelskih ćelija na modelu humane endotelske ćelijske linije, EA.hy 926, praćenjem njihove proliferacije, migracije i tubulogeneze u uslovima normoksije i hipoksije. Analizirana je i ekspresija gena za endotelsku azot monoksid sintazu (eNOS, *Endothelial nitric oxide synthase*) i Cox-2, kao i njihovih proteinskih produkata, budući da ovi molekuli imaju važnu ulogu u procesu angiogeneze. Dobijeni rezultati su potvrdili da IL-17 stimuliše ključne funkcije uključene u proces angiogeneze EA.hy 926 ćelija, poput ćelijske migracije i tubulogeneze, kao i ekspresiju eNOS i Cox-2 u ovim ćelijama. Pro-angiogeni efekti IL-17 su pokazani u uslovima normoksije (20% O₂). Uslovi hipoksije (3% O₂) pokazali su toksično dejstvo na ovu ćelijsku liniju, dok je IL-17 u ovakvim uslovima umanjio broj apoptotičnih ćelija.

U okviru trećeg dela ove disertacije MSC su izolovane iz vezivnog tkiva pupčanika, tzv. Vartonove sluzi, umnožene i okarakterisane prema važećim preporukama i kriterijumima Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju. Zatim je ispitan i određen optimalni protokol za njihovu efikasnu diferencijaciju u endotelske ćelije, u cilju uspostavljanja novog ćelijskog modela za buduća istraživanja. Princip diferenciranja UC-MSC u endotelske ćelije zasnivao se na inhibiciji signalizacije faktora transformacije rasta (TGF- β , *Transforming growth factor beta*), i to njegovog receptora, aktivinu-nalik kinaze 5 (ALK5, *Activin-like kinase*). Na osnovu dobijenih rezultata, zaključeno je da se UC-MSC odlikuju visokom sposobnošću samoobnove i visokim kapacitetom za diferencijaciju kao i da se mogu diferencirati u endotelske ćelije putem inhibicije ALK5 receptora.

KLJUČNE REČI: Interleukin-17, mezenhimske matične ćelije, endotelske ćelije, diferencijacija, angiogeneza, C2C12, EA.hy 926, tkivo pupčanika, hipoksija

NAUČNA OBLAST: BIOLOGIJA

UŽA NAUČNA OBLAST: BIOLOGIJA ĆELIJA I TKIVA

UDK BROJ: 577.112.85::576.32/.36(043.3)

EFFECTS OF INTERLEUKIN-17 ON MESENCHYMAL AND ENDOTHELIAL CELL FUNCTIONS AND MECHANISMS INVOLVED

ABSTRACT

Interleukin (IL) 17 cytokine family is considered the least explored cytokine family with an important role in inflammation. Due to the ubiquitous expression of its receptor, IL-17 has been implicated in interactions between the immune system and somatic tissues. In this context, recent findings have shown that IL-17 acts as a fine regulator of mesenchymal stem cell (MSC) differentiation. Having in mind that behaviour of MSC depends on the surrounding microenvironment, it is important to analyze the interactions between MSC and IL-17 involved in the maintenance of their multipotency, mobilization and directed differentiation. In addition to mesenchymal cells, IL-17 exerts its roles by acting on endothelial cells as well. Even though IL-17's effects on endothelial cells have not been fully discovered yet, it is well known that IL-17, in the presence of other angiogenic factors, has the ability to stimulate endothelial cells to undergo angiogenesis. Furthermore, it is well known that cellular functions, as well as cytokine effects can be significantly modulated by the percentage of oxygen present in their microenvironment. However, effects of IL-17 on endothelial cells in the context of different O₂ concentrations have not been explored yet. Also, it is still unknown whether IL-17 can affect endothelial differentiation of MSC, but to address this issue, it is necessary to create a valid model of endothelial differentiation of MSC.

The objective of this study was to investigate the effects of IL-17 on different functions of mesenchymal and endothelial cells in specific microenvironmental conditions. The influence of IL-17 on proliferation, migration, angiogenesis and differentiation was analyzed, as well as the molecular mechanisms involved. The activation of various signaling molecules and the expression of genes and proteins involved in specific functions were examined. Yet another objective was to establish an appropriate model for the mesenchymal-endothelial transdifferentiation. For this task primary MSC from umbilical cord tissue (UC-MSC) were isolated and characterized with emphases on their endothelial differentiation.

In order to elucidate the effects and mechanisms involved in IL-17 acting on mesenchymal cell differentiation, a multipotent mouse C2C12 cell line was used. The influence of IL-17 on cell differentiation was analyzed based on the expression of genes and proteins specific for the certain type of differentiation: Myosin heavy chain (MyHC) and Myogenin for myogenic, and Alkaline phosphatase (ALP), Runt-related transcription factor 2/Core-binding factor subunit alpha-1 (Runx2/Cbfa1) and Cyclooxygenase-2 (Cox-2) for osteogenic differentiation. Additionally, the involvement of Mitogen-activated protein kinases (MAPK) and Bone morphogenetic proteins (BMP) in IL-17-directed differentiation of C2C12 cells was investigated. Results obtained demonstrated that IL-17 inhibits myogenic and stimulates osteogenic differentiation of C2C12 cells, by down-regulating the Myogenin mRNA expression, MyHC expression and myotube formation, while up-regulating the Runx2/Cbfa1 mRNA expression, Cox-2 expression and ALP activity. IL-17 exerted these effects by activating ERK1,2 MAPK signaling pathway, which in turn regulated the expression of relevant genes and proteins to inhibit myogenic differentiation and induce osteogenic differentiation. It was also shown that the induction of osteogenic differentiation by IL-17 is independent of the BMP-Smad signaling pathway.

In the second part of this study the effect of IL-17 on endothelial cell functions was investigated using human endothelial cell line EA.hy 926 as a model. The changes in cells' proliferation, migration and tubulogenesis were analyzed, along with the expression of genes for endothelial Nitric oxide synthase (eNOS) and Cox-2, and their corresponding protein products, since these molecules have important roles in angiogenesis. The influence of the environmental stimuli (normoxia vs. hypoxia) was also investigated. Results obtained demonstrated that IL-17 stimulates crucial events involved in angiogenesis of EA.hy 926 cells, such as cell migration and tubulogenesis, along with the expression of eNOS and Cox-2. However, the effects of IL-17 were dependent on the O₂ concentration, since pro-angiogenic effects of IL-17 were noticed in the presence of 20% O₂, while 3% O₂ exerted toxic effect on this cell line, and IL-17 in these conditions decreased the number of apoptotic cells.

In the final task, MSC were isolated from the umbilical cord Wharton's jelly, expanded in culture and characterized according to the recommendations from the International Society for Cell Therapy. Following this, an optimal protocol for the

endothelial differentiation of UC-MSC was established. The endothelial-directed differentiation was based on the inhibition of the Transforming growth factor beta (TGF- β) signaling, specifically its receptor activin-like kinase 5 (ALK5). Based on the results gained, it was concluded that UC-MSC have a high ability to self-renew and high differentiation capacity, as well as that these cells can be differentiated into endothelial cells by inhibiting ALK5 receptor.

KEY WORDS: Interleukin-17, mesenchymal stem cells, endothelial cells, differentiation, angiogenesis, C2C12, EA.hy 926, umbilical cord, hypoxia

SCIENTIFIC FIELD: BIOLOGY

SPECIAL TOPICS: CELL AND TISSUE BIOLOGY

UDC NUMBER: 577.112.85::576.32/.36(043.3)

1. UVOD	1
1.1. INTERLEUKIN-17 FAMILIJA CITOKINA	1
1.1.1. Produkcija interleukina-17	2
1.1.2. Struktura interleukina-17 i njegovog receptora	3
1.1.3. Signalni putevi aktivirani interleukinom-17	6
1.1.4. Biološka uloga interleukina-17	7
1.2. MEZENHIMSKE MATIČNE ĆELIJE	10
1.2.1. Istraživanje matičnih ćelija	10
1.2.2. Pojam i dokazivanje mezenhimskih matičnih ćelija	12
1.2.3. Izvori mezenhimskih matičnih ćelija	15
1.2.4. Poreklo mezenhimskih matičnih ćelija	18
1.2.5. Diferencijacija mezenhimskih matičnih ćelija	20
1.2.5.1. Miogena diferencijacija mezenhimskih ćelija	20
1.2.5.2. Osteogena diferencijacija mezenhimskih ćelija	23
1.2.6. Uloga interleukina-17 u biologiji mezenhimskih matičnih ćelija	25
1.3. ENDOTELSKÉ ĆELIJE	27
1.3.1. Biološki efekti interleukina-17 na endotelske ćelije	28
1.3.2. Značaj stepena oksigenacije za biološke efekte citokina	29
1.3.3. Diferencijacija mezenhimskih matičnih ćelija u endotelske ćelije	30
1.3.3.1 TGF- β superfamilija	31
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	34
3. MATERIJAL I METODE	37
3.1. MATERIJAL	37
3.2. DIZAJN EKSPERIMENTA	38
3.2.1. Utvrđivanje efekata i mehanizama delovanja IL-17 na multipotentne mezenhimske ćelije	38
3.2.2. Utvrđivanje efekata delovanja IL-17 na endotelske ćelije u procesu angiogeneze u uslovima različite koncentracije O ₂	39
3.2.3. Uspostavljanje adekvatnog modela za proučavanje procesa diferencijacije MSC u endotelske ćelije	40
3.3. ĆELIJE I ĆELIJSKE KULTURE	41
3.3.1. Ćelijske linije	41
3.3.2. Izolacija MSC iz tkiva pupčanika	42
3.4. DIFERENCIRANJE ĆELIJA	43
3.4.1. Osteogena diferencijacija	43
3.4.2. Adipogena diferencijacija	43
3.4.3. Hondrogena diferencijacija	44
3.4.4. Miogena diferencijacija	44
3.4.5. Diferenciranje u miofibroblaste	44
3.4.6. Diferenciranje UC-MSK u endotelske ćelije	45

<u>3.5. ANALIZA ĆELIJSKIH FUNKCIJA</u>	<u>45</u>
3.5.1. Analiza proliferacije ćelija	45
3.5.1.1. Analiza proliferacije ćelija primenom MTT testa	45
3.5.1.2. Test ćelijske proliferacije u kratkotrajnim kulturama	46
3.5.1.3. Test ćelijske proliferacije u dugotrajnim kulturama	46
3.5.1.4. CFU-F test	47
3.5.2. Analiza ćelijske migracije Scratch testom	47
3.5.3. Test tubulogenog kapaciteta endotelskih ćelija	47
3.5.4. Test apoptoze ćelija	48
<u>3.6. ANALIZA EKSPRESIJE PROTEINA</u>	<u>48</u>
3.6.1. Analiza ekspresije proteina protočnom citometrijom	48
3.6.2. Imunocitohemijske metode detekcije proteina	49
3.6.3. Western blot analiza ekspresije proteina	50
<u>3.7. ANALIZA EKSPRESIJE GENA</u>	<u>51</u>
3.7.1. Analiza genske ekspresije pomoću reakcije reverzne transkripcije i lančane reakcije polimeraze (RT-PCR, Reverse transcription-polymerase chain reaction)	51
3.7.2. Analiza genske ekspresije pomoću prolazne transfekcije ćelija i merenja transaktivacije genskih reportera	53
3.7.2.1. Umnožavanje i prečišćavanje plazmida	53
3.7.2.2. Plazmidi	54
3.7.2.3. Transfekcija C2C12 ćelija	58
<u>3.8. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA</u>	<u>58</u>
4. REZULTATI	59
<u>4.1. EFEKTI I MEHANIZMI DELOVANJA IL-17 NA MULTIPOTENTNE MEZENHIMSKE ĆELIJE</u>	<u>59</u>
4.1.1. Efekat IL-17 na proliferaciju i migraciju C2C12 mezenhimskih ćelija	59
4.1.2. Efekat IL-17 na miogenu diferencijaciju C2C12 mezenhimskih ćelija	62
4.1.3. Efekat IL-17 na osteogenu diferencijaciju C2C12 mezenhimskih ćelija	64
4.1.4. Unutarćelijska signalizacija IL-17 u C2C12 ćelijama	66
4.1.5. Učešće ERK1,2 signalnog puta u IL-17-indukovanoj inhibiciji miogeneze i u IL-17-indukovanoj stimulaciji osteogeneze	68
4.1.6. Učešće BMP signalizacije u IL-17-indukovanoj osteogenoj diferencijaciji C2C12 ćelija	72
<u>4.2. EFEKTI IL-17 NA FUNKCIJE ENDOTELSKIH ĆELIJA KULTIVISANIH U USLOVIMA RAZLIČITE KONCENTRACIJE KISEONIKA</u>	<u>75</u>
4.2.1. Efekat IL-17 na proliferaciju EA.hy 926 ćelija kultivisanih u prisustvu 20% O ₂ i 3% O ₂	75
4.2.2. Efekat IL-17 na migraciju EA.hy 926 ćelija kultivisanih u prisustvu 20% O ₂ i 3% O ₂	77
4.2.3. Efekat IL-17 na tubulogenezu EA.hy 926 ćelija kultivisanih u prisustvu 20% O ₂ i 3% O ₂	78
4.2.4. Efekat IL-17 na ekspresiju eNOS i Cox-2 u EA.hy 926 ćelijama kultivisanim u prisustvu 20% O ₂ i 3% O ₂	79

<u>4.3. USPOSTAVLJANJE ADEKVATNOG MODELA ZA PROUČAVANJE PROCESA DIFERENCIJACIJE MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA U ENDOTELSKE ĆELIJE</u>	80
4.3.1. Izolacija i kultivacija mezenhimskih matičnih ćelija iz tkiva pupčanika	80
4.3.2. Karakterizacija mezenhimskih matičnih ćelija izolovanih iz tkiva pupčanika	82
4.3.3. Diferencijacija UC-MSK u endotelske ćelije	85
5. DISKUSIJA	91
<u>5.1. EFEKTI I MEHANIZMI DELOVANJA IL-17 NA MULTIPOTENTNE MEZENHIMSKE ĆELIJE</u>	91
<u>5.2. EFEKTI IL-17 NA FUNKCIJE ENDOTELSKIH ĆELIJA KULTIVISANIH U USLOVIMA RAZLIČITE KONCENTRACIJE KISEONIKA</u>	98
<u>5.3. USPOSTAVLJANJE MODELA ZA DIFERENCIJACIJU MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA U ENDOTELSKE ĆELIJE</u>	103
6. ZAKLJUČAK	109
7. LITERATURA	111
PRILOG – Spisak skraćenica	I
BIOGRAFIJA AUTORA	VI

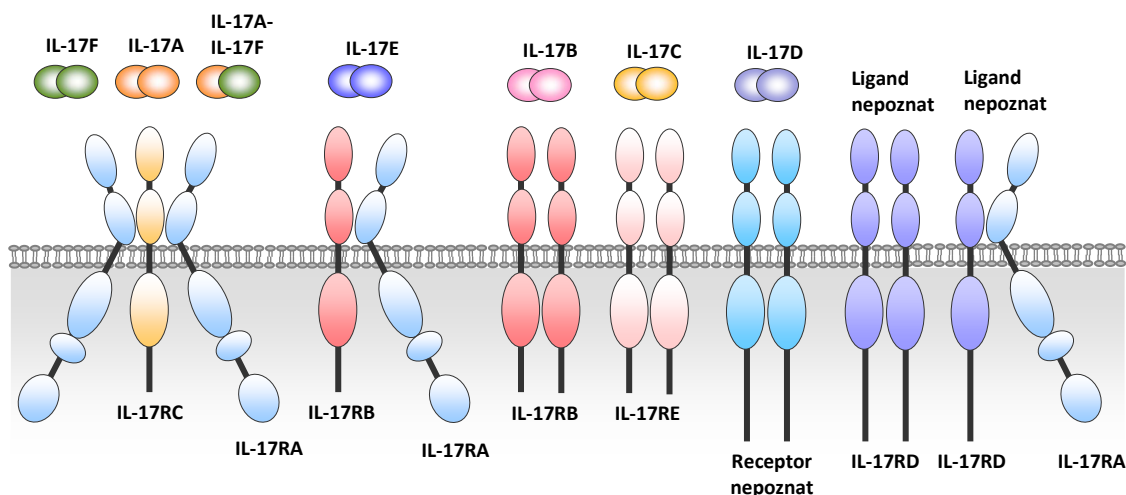
1. UVOD



1.1. INTERLEUKIN-17 FAMILIJA CITOKINA

Interleukin (IL) 17 familija citokina i njihovih receptora je skoro otkrivena i najmanje istražena podklasa citokina. Gen za IL-17 kloniran je 1993. godine iz DNK biblioteke T ćelijskog hibridoma dobijenog fuzijom citotoksične T ćelije miša i T ćelije limfoma pacova (*Rouvier i sar., 1993*). Novootkriveni gen je tom prilikom nazvan CTLA-8 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 8*), budući da se prvenstveno smatralo da je poreklom iz mišjeg T limfocita. Međutim, kasnije je utvrđeno da gen potiče iz T ćelije pacova, a sekvenca njemu komplementarne DNK ukazala je na prisustvo AU-bogatih ponovaka u 3' regionu informacione RNK, karakterističnih za iRNK različitih citokina, faktora rasta i onkogeni. Protein veličine 150 kDa kodiran od strane CTLA-8 gena pokazivao je homologiju sa proteinom koji je kodiran ORF13 genom T-ćelijskog virusa *Herpesvirus saimiri* (*Rouvier i sar., 1993*), međutim, značaj ove homologije gena još uvek nije razjašnjen. Daljom karakterizacijom CTLA-8 molekula i otkrivanjem njegovog specifičnog receptora, novi protein konačno je imenovan kao interleukin 17 od strane Yao i sar., 1995. godine. Na osnovu sekvence komplementarne DNK, postalo je jasno da je IL-17 specifičan u odnosu na druge citokinske porodice. Ovo je prvi Interleukin identifikovan na osnovu homologije sa sekvencama iz ustanovljenih DNK biblioteka, a bez prethodnog poznavanja njegove biološke aktivnosti.

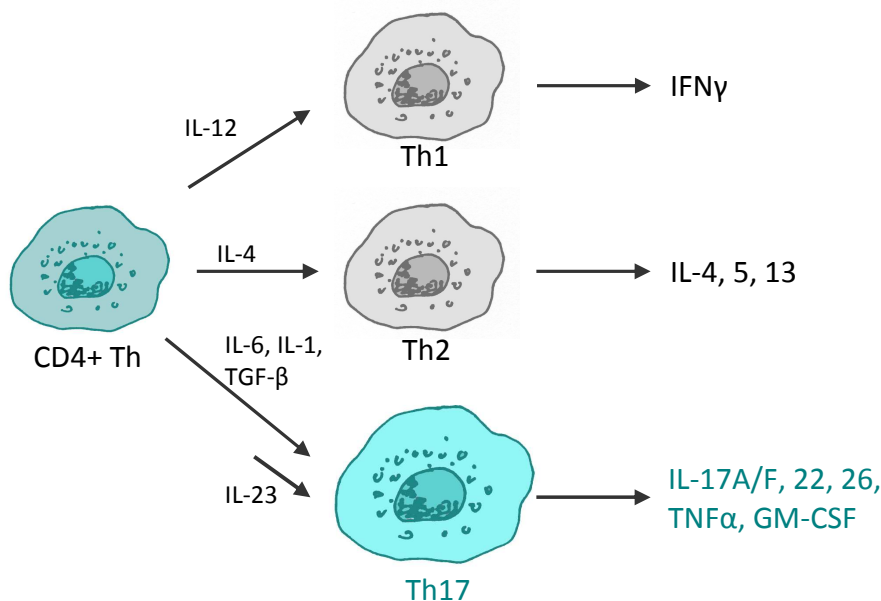
Kada je otkriven, receptor za IL-17 (IL-17R) vezivao se za mišju, humanu i viralnu formu IL-17. Ovaj receptor je, jednako kao njegov ligand, pokazivao jedinstvenost u odnosu na druge poznate porodice citokinskih receptora, s obzirom na to da je to bio jedini transmembranski receptor sa neuobičajeno dugim citoplazmatskim repom. Danas se IL-17A smatra prvootkrivenim članom jedinstvene receptor/ligand porodice IL-17 proteina (**Slika 1**) koja do danas broji 6 srodnih citokina: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E i IL-17F i pet citokinskih receptora: IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD i IL-17RE (*Moseley i sar., 2003*).



SLIKA 1. Shematski prikaz IL-17 familije citokina i njihovih receptora. *IL-17 porodica citokina do danas broji šest srodnih citokina i pet njima odgovarajućih receptora. Izmenjeno iz Gaffen i sar., 2009. Nat Rev Immunol.*

1.1.1. Produkcija interleukina-17

Novija saznanja o ćelijama sa sposobnošću sinteze IL-17 značajno su izmenila prvobitnu sliku o pomoćničkim T ćelijama koje proizvode IL-17 (Th17, *IL-17 producing T helper cells*) kao jedinom izvoru ovog citokina. Na osnovu citokina koje sintetizuju, prvobitno je pretpostavljeno da postoje dva podtipa pomoćničkih T ćelija koje su imenovane Th1 i Th2 ćelije (Mosmann, 1986). Iako je ova podela dominirala gotovo dve decenije, nakon detaljnijih saznanja o funkciji Th ćelija uočena je njena nedoslednost (Gaffen, 2009a). Na osnovu profila oslobođenih citokina, Th ćelije koje stvaraju IL-17 nisu se mogle klasifikovati ni u Th1 niti u Th2 ćeljski podtip (Slika 2), te je ustanovljen poseban tip Th ćelija koje pored IL-17 proizvode i faktor nekroze tumora (TNF- α , *Tumor necrosis factor alpha*) (Infante-Duarte i sar., 2000). Dodatnim istraživanjima utvrđeno je da se zaista radi o jedinstvenoj populaciji T limfocita, nazvanoj Th17, koja pored IL-17 i TNF- α proizvode i IL-21, IL-22 i IL-26 (Harrington i sar., 2005; Park i sar., 2005; Korn i sar., 2007). Najnovija istraživanja pokazuju da Th17 ćelije takođe proizvode faktor stimulacije rasta granulocitno-makrofagnih kolonija (GM-CSF, *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), što doprinosi značaju Th17 ćelija u inflamatornim patološkim procesima (El-Behi i sar., 2011; Codarri i sar., 2011).



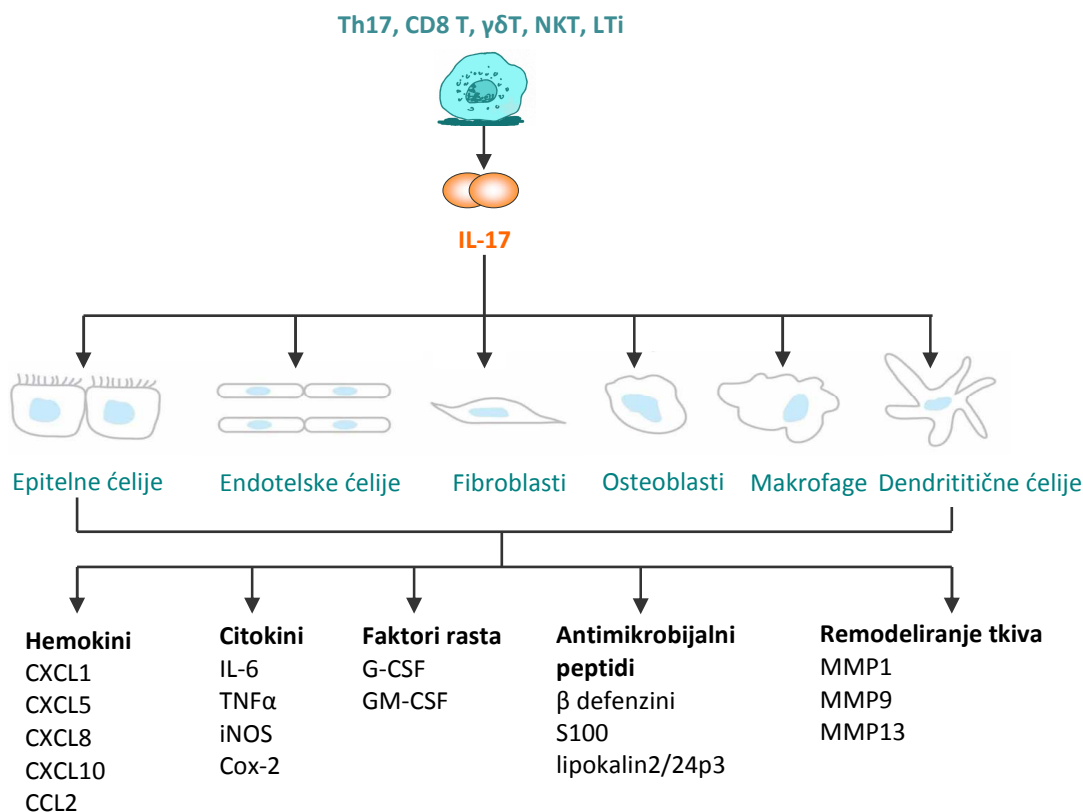
SLIKA 2. Klasifikacija pomoćničkih T ćelija. Diferencijaciju Th17 ćelija iz CD4+ Th ćelija indukuju IL-1, IL-6 i TGF β , dok IL-23 učestvuje u održavanju Th17 ćelija. Pored IL-17A i F, Th17 ćelije proizvode i IL-22, IL-26 (samo kod ljudi), TNF α i GM-CSF. Izmenjeno iz Gaffen, 2011. Curr Opin

Dugo nakon otkrića IL-17, smatralo se da ga proizvode isključivo T limfociti, ali sada je već poznato da ovaj citokin sintetiziraju i različite ćelije urođenog imuniteta (**Slika 3**) (Bird, 2008), a neke članove IL-17 porodice proizvode i neimunske ćelije, poput mišićnih ćelija, adipocita i neurona (Gaffen, 2011). Stoga je veliki broj istraživanja posvećen otkrivanju novih tipova ćelija odgovornih za sintezu IL-17. S druge strane, receptori za IL-17 su ubikvitarno rasprostranjeni, a ključne ćelije koje odgovaraju na stimulaciju IL-17 uglavnom ne pripadaju ćelijama imunskog sistema, već su to najčešće epitelne ćelije, mezenhimske ćelije (mioblasti, fibroblasti, adipociti i osteoblasti) i keratinociti (Gaffen, 2009a, Toy i sar., 2006).

1.1.2. Struktura interleukina-17 i njegovog receptora

Dosadašnja saznanja o strukturi IL-17 zasnivaju se najviše na izučavanju IL-17A i IL-17F. Na osnovu njihove kristalne strukture, pretpostavlja se da IL-17 citokini predstavljaju disulfidnim vezama povezane homodimere (ili heterodimere u slučaju IL-17A/F) glikoproteina. IL-17A i IL-17F pokazuju najveću homologiju u okviru porodice i oba citokina zahtevaju i IL-17RA i IL-17RC za signalizaciju (Ely i sar., 2009; Toy i sar., 2006). Humani gen za IL-17A kodira za polipeptid sastavljen od 155

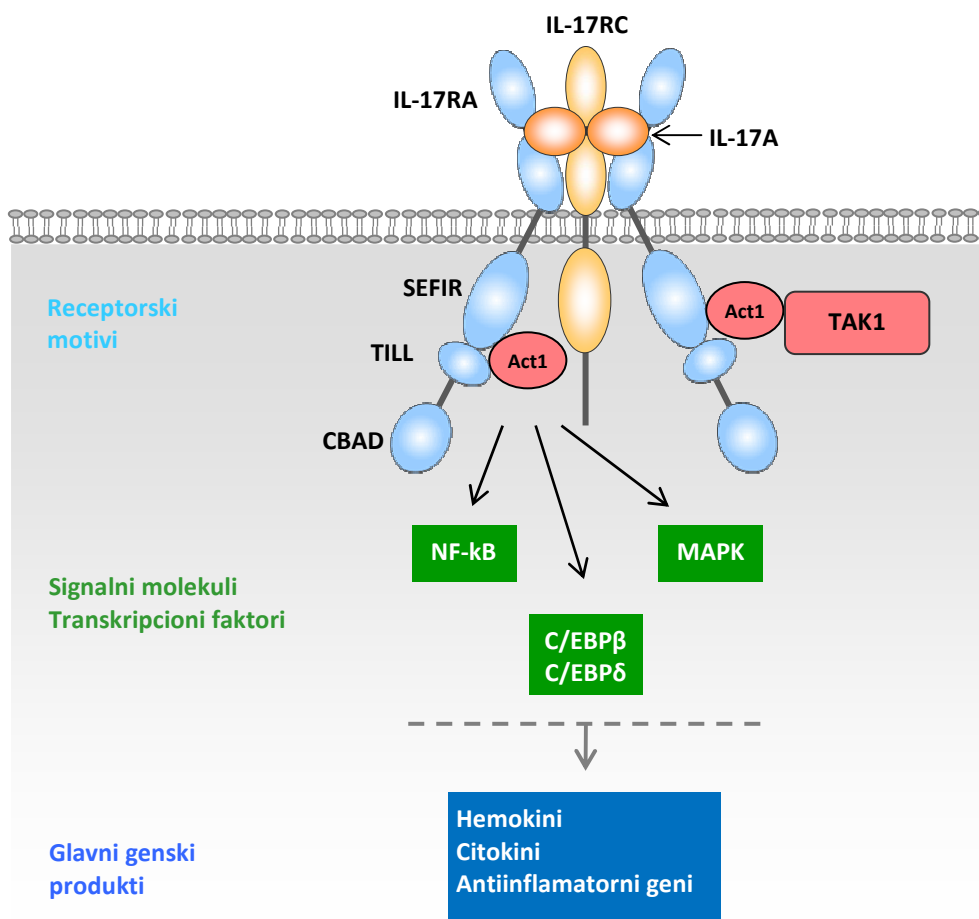
aminokiselina, koji na svom N-kraju sadrži hidrofobnu signalnu sekvencu. Funkcionalna forma IL-17A je homodimer molekulske mase 32 kDa, koja nastaje zahvaljujući formiranju intermolekulskih veza u proteinu (*Fossiez i sar., 1996*).



SLIKA 3. Produkcija i delovanje IL-17. *Th17* ćelije se smatraju primarnim izvorom IL-17. Prema novijim istraživanjima, sposobnost sinteze IL-17 poseduju i CD8 T ćelije, gama delta T ćelije, ćelije prirodne ubice (NKT, Natural killer cells) i ćelije koje učestvuju u razviću limfnih tkiva (Lti, Lymphoid tissue inducer cells). S obzirom na ubikvitarnu ekspresiju receptora, IL-17 ostvaruje svoje dejstvo na razne tipove ćelija, prikazane na slici. IL-17 indukuje sintezu hemokina, citokina, faktora rasta, antimikrobijalnih peptida i enzima uključenih u remodeliranje tkiva. Izmenjeno iz Xu i Cao, 2010. *Cell Mol Immunol*.

Pet receptora za IL-17 ne pokazuje sličnost sa bilo kojim poznatim receptorima, a primetna razlika postoji i u njihovim međusobnim sekvencama (**Slika 1**). Najbolje je istražen receptorski kompleks koji vezuje IL-17A, a sastavljen je od dve IL-17RA i jedne IL-17RC jedinice (**Slika 4**). Kao i kod svih ostalih IL-17 receptora, subjedinice ovog kompleksa sadrže ekstracelularne domene sačinjene od dva fibronektinu tipa III-slična domena (FN1 i FN2) (*Novatchkova i sar., 2003; Kramer i sar., 2007*), a njegova osnovna karakteristika jesu citoplazmatski domeni koji se razlikuju od onih koji postoje kod drugih istraženih receptora. Ključna saznanja vezana za IL-17R dobijena su nakon

bioinformatičkih analiza na osnovu kojih je identifikovan konzervisan motiv u citoplazmatskom domenu IL-17 familije receptora, koji je homolog TIR (*Toll-IL-1 Receptor*) domenu *IL-1/Toll-like* familije receptora (Novatchkova i sar., 2003) i koji je nazvan SEFIR domen (*Similar expression to fibroblast growth factor genes and IL-17 receptors*). C-terminalni region SEFIR domena pokazuje sličnost sa delom TIR domena, zbog čega je ovaj motiv nazvan *TIR-like loop* (TILL). Iako svi IL-17 receptori poseduju SEFIR motiv, TILL domen je jedinstven za IL-17RA. Još jedan motiv karakterističan samo za IL-17RA je C-terminalni C/EBP β -aktivacioni domen (CBAD, *C-terminal C/EBP β -activation domain*). Fosforilacijom ovog domena od strane IL-17 pokreće se nishodna signalizacija u ćelijama (Gaffen i sar., 2009a).



SLIKA 4. Značajni unutarćelijski signalni putevi indukovani IL-17. Receptor za IL-17A predstavlja heterodimer sastavljen od dve IL-17RA i jedne IL-17RC jedinice. Vezivanje IL-17 pokreće signalizaciju posredovanu SEFIR motivom unutarćelijskog domena IL-17R. Do sada poznati adaptorski proteini koji se vezuju za receptorske motive IL-17R uključuju ACT1, TAK1 i TRAF3 i TRAF6, nakon čijeg se vezivanja pokreće aktivacija nishodnih signalnih molekula i transkripcionih faktora (NF- κ B, C/EBP i MAPK) koji zatim aktiviraju transkripciju specifičnih gena. Izmenjeno iz Gaffen i sar., 2009. *Nat Rev Immunol.*

Svi poznati citokinski receptori su multimerni i oligomerizacija njihovih subjedinica neophodna je za aktivaciju signalne transdukcije. Paradigma vezana za signalizaciju citokinskih receptora, koja je postojala dugi niz godina, tvrdila je da pojedinačne receptorske subjedinice postoje kao monomeri u membrani i da ligand uzrokuje njihovu oligomerizaciju, započinjući na taj način signalizaciju putem privlačenja odgovarajućih enzima ili adaptor proteina u blizinu receptora. Međutim, nakon detaljnijeg proučavanja, došlo se do saznanja da ovakav model organizacije ne odgovara većini ispitivanih receptora. Naime, pokazano je da većina citokinskih receptora postoji kao unapred organizovan, neaktivni molekulski kompleks koji nakon interakcije sa ligandom podleže značajnim konformacijskim promenama (*Krause i sar., 2002; Chan, 2007*). Istraživanje strukturne organizacije IL-17 receptora započeto je 2006. godine (*Kramer i sar., 2006*), da bi konačna struktura bila objavljena od strane Ely i sar., 2009. godine. Prema njihovim rezultatima, IL-17R je unapred organizovan receptor jer formira homodimer u membrani bez prethodnog učešća liganda, IL-17.

1.1.3. Signalni putevi aktivirani interleukinom-17

Mehanizmi prenosa signala od IL-17R do ekspresije gena i sinteze određenih molekula u ćelijama nisu u potpunosti ispitani, međutim, postoje podaci koji ukazuju na značaj različitih signalnih molekula koji posreduju u delovanju IL-17 (**Slika 4**).

Istraživanja su pokazala da IL-17 aktivira nuklearni faktor κ B, (NF- κ B, *Nuclear factor-kappaB*), familiju transkripcionih faktora koji se vezuju za CCAAT sekvencu pojačivača gena, C/EBP (*CCAAT enhancer-binding protein*), kao i sve tri klase mitogenom aktiviranih protein kinaza, MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*): ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*), JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) i p38. Nekoliko nalaza takođe ukazuje na učešće JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*) puta signalne transdukcije u ostvarivanju pojedinih bioloških efekata IL-17 (*Subramaniam i sar., 1999; Rahman i sar., 2006*). Koji će signalni put biti aktiviran zavisi od tipa ćelija ali i od mikrosredine u kojoj se one nalaze. Ispitivanje signalnih puteva indukovanih IL-17 započelo je određivanjem gena čija je ekspresija pokrenuta ovim citokinom. IL-17A-indukovani

geni pokazali su da IL-17 aktivira gene čiji su produkti uključeni u proces inflamacije (*Gaffen i sar., 2009a*).

Receptorski kompleks sastavljen od dve IL-17RA i jedne IL-17RC jedinice predstavlja početno mesto unutarćelijske signalizacije koju pokreće IL-17. Budući da se novootkriveni domen receptora za IL-17 strukturno razlikuje od prototipskog TIR domena, razlikuju se i adaptor proteini koji se za njega vezuju. Adaptor protein koji se vezuje za SEFIR i TILL domen IL-17RA/IL-17RC kompleksa jeste aktivator 1 NF- κ B, Act1 (*NF- κ B activator 1*) (*Gaffen i sar., 2009a*). Act1 regrutuje faktor povezan sa TNF receptorom, TRAF6 (*TNF-Receptor-Associated Factor*) i druge signalne posrednike do IL-17RA/IL-17RC kompleksa. Nedostatak Act1 proteina u fibroblastima dovodi do narušavanja NF- κ B aktivacije i nedostatka produkcije proinflamatornih citokina i hemokina nakon tretmana IL-17 (*Chang i sar., 2006*). Međutim, spora aktivacija nishodnih puteva primećena je i u Act1 deficijentnim ćelijama, što ukazuje na postojanje Act1 nezavisnih signalnih puteva koje pokreće IL-17R (*Gaffen i sar., 2009a*). Nishodno od receptora aktiviraju se MAP kinaze, NF- κ B i CEB/P transkripcioni faktori, čija aktivacija subsekventno dovodi do ekspresije gena za raznovrsne citokine, hemokine i inflamatorne faktore.

1.1.4. Biološka uloga interleukina-17

Na osnovu dosadašnjih istraživanja utvrđeno je da IL-17 ima ulogu finog regulatora koji modulira različite biološke odgovore ćelija, uključujući i produkciju drugih regulatornih molekula (*Aggarwal i Gurney, 2002*). Pritom, biološki efekat IL-17, odnosno profil oslobođenih citokina, zavisi od tipa ćelija na koje deluje. Glavni geni koji se aktiviraju nakon delovanja IL-17 kodiraju za proinflamatorne hemokine, hematopoetske citokine, enzime uključene u remodelovanje tkiva (MMP, matriks metaloproteinaze), proteine akutne faze i antimikrobne peptide (**Slika 3**) (*Gaffen i sar., 2008; Xu i Cao, 2010*).

Delovanje na ekspanziju i hemotaksu neutrofila smatra se karakterističnim za IL-17 (*Xu i Cao, 2010*). *In vivo* istraživanja pokazala su da IL-17 snažno aktivira neutrofile (*Schwarzenberger i sar., 1998*), kako putem njihove lozne ekspanzije regulacijom ekspresije faktora stimulacije rasta granulocitnih kolonija (G-CSF,

Granulocyte colony-stimulating factor) i G-CSF receptora, tako i putem regrutovanja neutrofila posredstvom regulacije ekspresije CXC hemokina. Tako su IL-17RA deficijentni miševi jako podložni bolestima usled neadekvatne regulacije aktivnosti neutrofila (*Kolls i Linden, 2004; Linden i sar., 2005*). Takođe, putem indukcije sinteze GM-CSF, IL-17 utiče na ekspanziju granulocita i makrofaga koji učestvuju u inflamaciji tkiva.

Zaštitna uloga IL-17 u odbrani domaćina od patogenih bakterija pokazana je u istraživanjima u kojima je upoređivana osetljivost IL-17R-deficijentnih i kontrolnih miševa na bakteriju *Klebsiella pneumoniae* (*Ye i sar., 2001*). Nakon intranazalne infekcije, miševi deficijentni za IL-17R imali su povećan broj bakterija u plućima, povećanu diseminaciju bakterija u jetru, a ukupni stepen preživljavanja životinja bio je smanjen. Povećana osetljivost na *K. pneumoniae* miševa deficijentnih za IL-17R bila je direktno povezana sa odloženom regrutacijom neutrofila i redukovanom ekspresijom G-CSF i inflamatornog makrofagnog proteina-2 (MIP-2, *Macrophage-inflammatory protein-2*) u plućima nakon infekcije. Pored toga, pokazano je da je nivo nekih antimikrobnih supstanci, npr. beta-defenzina, mucina i nekih S100 proteina, koji se smatraju prirodnim antibioticima u plućima, koži i crevima, značajno povećan delovanjem IL-17 na epitelne ćelije, što obezbeđuje zaštitu od širokog spektra mikroorganizama (*Xu i Cao, 2010*).

Poznato je da IL-17 stimuliše produkciju IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-10, IL-12, prostaglandina E2, antagonista receptora za IL-1 i MMP-3 u humanim makrofagama (*Jovanović i sar., 1998*). Takođe, IL-17 podstiče sazrevanje prethodnika dendritičnih ćelija miša, stimulišući ekspresiju specifičnih CD antigena na ovim ćelijama (*Antonysamy i sar., 1999*). To je ukazalo na značaj IL-17 u inicijaciji, kao i održavanju imunskog odgovora, s obzirom da upravo dendritične ćelije prikazivanjem antigena na svojoj površini započinju imunski odgovor, a da makrofage doprinose održavanju intenziteta imunске reakcije.

S obzirom na to da, pored stimulacije produkcije proinflamatornih citokina, IL-17 indukuje i sekreciju regulatornih molekula koji ispoljavaju hematopoetske efekte, poput GM-CSF, G-CSF i IL-6, ovaj citokin je pridružen složenoj mreži citokina uključenih u regulaciju procesa hematopoeze i to kao citokin koji povezuje imunski odgovor sa hematopoezom (*Jovčić i sar., 2004; Krstić i sar., 2009; Krstić i sar., 2012*).

Prvi rezultati dobijeni u okviru istraživanja uloge IL-17 u procesu hematopoeze pokazali su da IL-17 stimuliše granulocitopoezu (*Fossiez i sar., 1996; Schwarzenberger i sar., 1998*), a kasnije je dokazano da ovaj citokin ostvaruje svoje biološke efekte i u procesu eritrocitopoeze (*Jovčić i sar., 2001; Bugarski i sar., 2004*). Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da IL-17 ne indukuje proliferaciju i diferencijaciju opredeljenih matičnih ćelija hematopoeze samostalno, već na opredeljene matične ćelije hematopoeze deluje u sinergizmu sa drugim regulatornim molekulima i posredstvom sekundarno indukovanih citokina poput IL-6 i eritropoetina (*Jovčić i sar., 2004; Krstić i sar., 2009*). Pored toga, pokazano je da delovanje IL-17 može biti posredovano azot monoksidom (NO) (*Bugarski i sar., 2004*), i to aktivacijom inducibilne NO sintaze (iNOS) i konstitutivne, endotelske NO sintaze (eNOS), kao i aktivacijom p38 MAPK (*Krstić i sar., 2009a*). Pritom, efekti IL-17 zavise od lozne pripadnosti i stepena diferentovanosti ciljnih ćelija. IL-17 stimuliše diferencijaciju odnosno proliferaciju opredeljenih ćelija granulocitno-monocitne loze (CFU-GM, *Colony forming unit – granulocyte - macrophage*) (*Jovčić i sar., 2004*), a na opredeljene matične ćelije eritropoeze deluje dvojako: zavisno od stepena njihove diferencijacije stimuliše rast mladih eritroidnih progenitora (BFU-E, *Burst forming unit - erythroid*) (*Jovčić i sar., 2004; Krstić i sar., 2009*), dok inhibira rast starijih eritroidnih progenitora (CFU-E, *Colony forming unit - erythroid*) (*Bugarski i sar., 2004; Jovčić i sar., 2004*). Ispitivanje reaktivnosti ćelija kostne srži na IL-17 kod infekcija i zračenja pokazalo je da efekat IL-17 na opredeljene matične ćelije hematopoeze zavisi od stepena njihovog razvoja i diferencijacije, ali i od fiziološkog/patološkog stanja organizma. Tako je pokazano je da se efekti IL-17 ispoljeni tokom oporavka ozračene kostne srži, razlikuju od efekata uočenih kod normalnih miševa (*Jovčić i sar., 2001*). Takođe, određivan je i efekat IL-17 tokom infekcije miševa crevnim parazitom *Syphacia obvelata*, koja uzrokuje intenzivnu stimulaciju procesa mijelopoeze i eritrocitopoeze (*Bugarski i sar., 2006*). Međutim, efekat IL-17 na opredeljene matične ćelije hematopoeze kod ovih životinja je bio potpuno izmenjen: IL-17 nije uticao na proliferaciju BFU-E i CFU-E, i pokazivao je tendenciju inhibicije rasta CFU-GM.

Navedeni rezultati doprineli su rasvetljavanju mehanizama putem kojih IL-17 koordinira stimulaciju granulocitopoeze i inhibiciju eritrocitopoeze, jer su ukazali na način kojim IL-17 tokom inflamacije ili infekcije može da preusmerava produkciju

ćelija hematopoeze u pravcu produkcije ćelija važnih za normalno funkcionisanje imunskog sistema, odnosno, da je ovaj citokin odgovoran za fini balans između produkcije ćelija iz ove dve različite ćelijske loze (*Krstić i sar., 2012*).

1.2. MEZENHIMSKE MATIČNE ĆELIJE

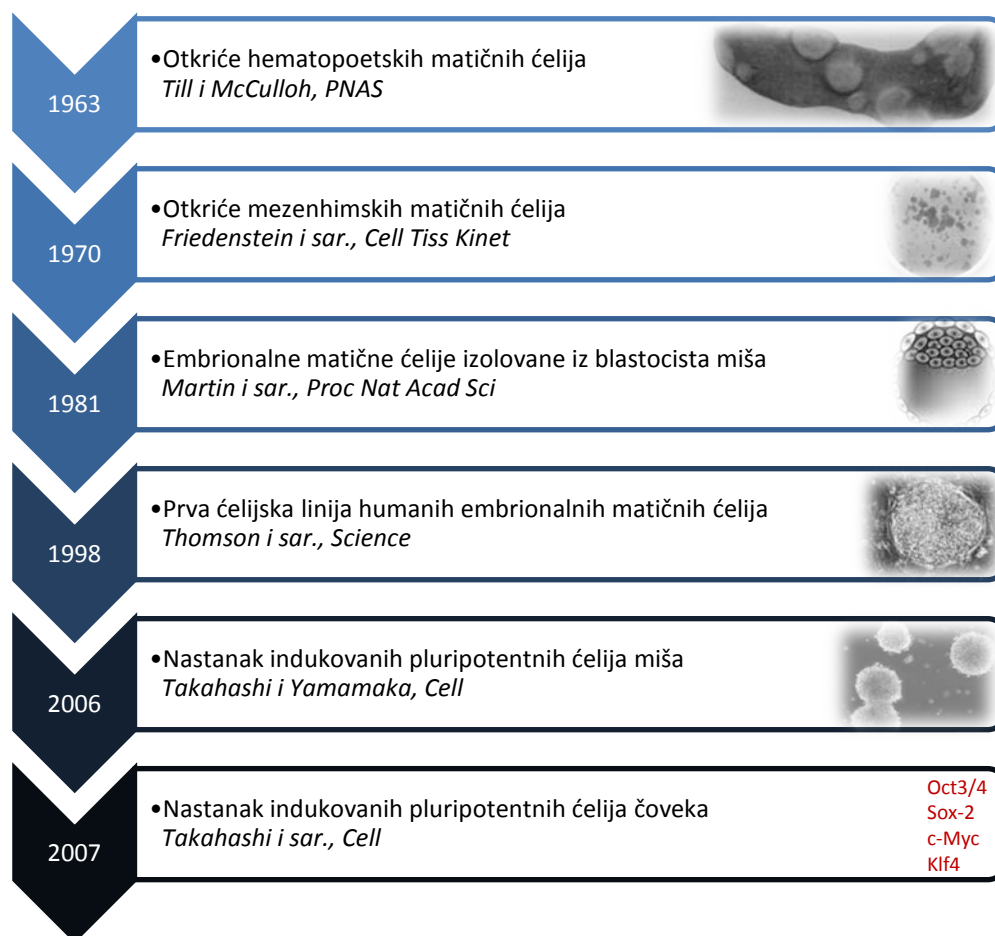
1.2.1. Istraživanje matičnih ćelija

Ispitivanja matičnih ćelija obeležila su tri velika otkrića koja su usmerila dalji tok istraživanja u ovoj oblasti: (1) Otkriće postojanja hematopoetskih matičnih ćelija (HSC, *Hematopoietic stem cells*) u kostnoj srži, (2) Otkriće embrionalnih matičnih ćelija (ESC, *Embryonic stem cells*) i mezenhimskih matičnih ćelija (MSC, *Mesenchymal stem cells*) i (3) Otkriće gena „za matičnost“, odnosno nastanak indukovanih pluripotentnih matičnih ćelija (iPS, *induced Pluripotent stem cells*), (**Slika 5**).

Ernest McCulloch i James Till smatraju se tvorcima nauke o matičnim ćelijama, zahvaljujući otkriću HSC u kostnoj srži. Njihova istraživanja tokom 60-ih godina, bila su posvećena ispitivanju mogućnosti izlječenja letalno ozračenih miševa pomoću ćelija izolovanih iz kostne srži (*Becker i sar., 1963; Till i sar., 1964*). Rezultati ovih istraživanja su pokazali veće preživljavanje ozračenih miševa nakon intravenskog ubrizgavanja ćelija kostne srži. Međutim, jedno drugo saznanje koje je proizašlo iz njihovih eksperimenata bilo je mnogo bitnije: nakon zračenja i ubrizgavanja ćelija kostne srži, u slezinama miševa uočili su novonastale ćelijske kolonije (nodule) vidljive golim okom. Prisustvo novonastalih kolonija u slezini bilo je dokaz da u kostnoj srži postoje ćelije koje imaju sposobnost samoobnove – matične ćelije. Na ovaj način dokazano je postojanje hematopoetskih matičnih ćelija čijom diferencijacijom nastaju sve zrele ćelije krvi.

Zasluge za otkriće stromalnih matičnih ćelija u kostnoj srži pripadaju Friedenstein-u i sar. koji su tokom 60-ih i 70-ih godina prošlog veka pokazali da mala subpopulacija ćelija kostne srži poseduje potencijal za osteogenu diferencijaciju (*Bianco i sar., 2008*). Ove ćelije su se razlikovale od hematopoetskih ćelija izolovanih iz kostne

srži, jer su posedovale sposobnost da brzo adheriraju za plastičnu podlogu sudova za ćelijsku kulturu, a njihove ćelije potomci su imale morfologiju nalik fibroblastima, ukazujući na njihovo poreklo iz stromalnog dela kostne srži. Pored ovih saznanja, Friedenstein i saradnici su zaslužni i za otkriće koje je pokazalo da kada se stromalne ćelije izolovane iz kostne srži kultivišu u malom broju, nastaju diskretne kolonije koje vode poreklo od pojedinačnih ćelija (CFU-F, *Colony-forming unit fibroblastic*, [Friedenstein i sar., 1970]). CFU-F test se danas smatra standardnim testom za određivanje broja i klonogenog potencijala stromalnih matičnih ćelija u kostnoj srži, s obzirom na to da je broj nastalih kolonija linearno zavisian od broja zasejanih ćelija. U daljim istraživanjima, pokazano je da se *in vivo* transplantovane stromalne matične ćelije izolovane iz kostne srži mogu diferencirati u različita skeletna tkiva (kost, hrskavicu, adipozno tkivo) u eksperimentalnim uslovima. Owen i Friedenstein nazvali su ovu ćeliju „osteogena matična ćelija“ (Friedenstein i sar., 1987) ili „stromalna matična ćelija kostne srži“ (Owen i Friedenstein, 1988).



SLIKA 5. Pregled značajnih otkrića u oblasti matičnih ćelija.

Sledeća etapa u istraživanju matičnih ćelija počinje otkrićem embrionalnih matičnih ćelija koje su izolovane iz unutrašnje mase blastocista, 1981. godine od strane Gail Martin i saradnika (*Martin, 1981*). Prva humana embrionalna ćelijska linija postavljena je tek sedamnaest godina kasnije (*Thomson, 1998*). Zbog etičkih kontroverzi koje su izazvala istraživanja na ESC, drugi izvori matičnih ćelija postajali su sve aktuelniji, te su do 2005. godine iz različitih adultnih humanih tkiva uspešno izolovane mezenhimske matične ćelije.

Najnovije veliko otkriće vezano za matične ćelije jeste uspostavljanje metode kojom se fibroblast miša može dediferencirati i vratiti u stanje matičnosti, uvođenjem samo četiri gena za „matičnost“: Oct3/4, Sox2, c-Myc i Klf4 (*Takahashi i Yamamaka, 2006*). Na ovaj način nastaju indukovane pluripotentne matične ćelije. Poslednjih godina, intenzivno se radi na usavršavanju metoda za iPS sa ciljem da se usavrši metodologija koja će biti bezopasna i netoksična za terapijsku primenu. Takođe, mnogo pažnje je posvećeno karakterizaciji i ispitivanju MSC za potencijalnu primenu u ćelijskoj terapiji, kao i u tkivnom inženjerstvu i *ex vivo* diferenciranju organa.

1.2.2. Pojam i dokazivanje mezenhimskih matičnih ćelija

Mezenhim, ili mezenhimsko vezivno tkivo, deo je embrionalnog mezoderma i sastoji se iz nespecijalizovanih ćelija rastresito raspoređenih u želatinoznom vanćelijskom matriksu, iz kojeg se razvijaju hematolimfatički sistem i vezivna tkiva. Naziv „mezenhimske matične ćelije“ prvi put je upotrebio Caplan 1991. godine, da opiše populaciju ćelija u adultnoj kostnoj srži koje se mogu izolovati, umnožiti u kulturi i stimulisati da se diferenciraju u ćelije tkiva mezodermalnog porekla (*Caplan, 1991*). Matične ćelije su one ćelije koje poseduju dve ključne karakteristike koje ih čine posebnim – sposobnost samoobnove i sposobnost diferencijacije. Prema saznanjima koja imamo danas, MSC ne nastanjuju samo tkiva mezenhimskog porekla a njihov potencijal za diferencijaciju prevazilazi tkiva mezodermalnog porekla, jer se, između ostalih, mogu diferencirati i u neurone, ektodermalnog porekla, kao i u ćelije pankreasa, endodermalnog porekla. Prema tome, pojam mezenhimske, iako uveliko prihvaćen, ne odražava pravu prirodu MSC. Zbog toga je ovaj naziv često kritikovan, pa imena koja se koriste za isti tip ćelija još uvek zavise od intepretacije istraživača: u literaturi se

moгу пронаћи и под називом mezenhimske stromalne ćelije, multipotentne stromalne ćelije ili multipotentne mezenhimske matične ćelije (*Prockop, 2009; Bianco i sar., 2008*). Ipak, s obzirom na to da je opšte prihvaćen, u daljem tekstu će se koristiti naziv mezenhimske matične ćelije.

TABELA 1. Pregled antigena koji se prema literaturnim podacima primenjuju za karakterizaciju mezenhimskih matičnih ćelija. (*AT-adipozno tkivo; ZP-zubna pulpa; KS-kostna srž; KP-krv iz pupčanika; TP-tkivo pupčanika; P-placenta*).

Antigen	Tip markera	Izvor matičnih ćelija
NEGATIVNI		
CD3	Markeri hematopoetskih ćelija	AT, ZP
CD7		AT, ZP
CD10		KS, KP, AT, TP, ZP
CD11b		AT, ZP
CD14		KS, KP, AT, TP, ZP, P
CD16		AT, ZP
CD19		ZP
CD20		AT, ZP
CD22		AT, ZP
CD24		KS, KP, AT, TP
CD25		AT, ZP
CD33		AT, ZP, TP
CD34		KS, KP, AT, TP, ZP, P
CD36		KS, KP, AT, TP, P
CD38		KS, KP, AT, TP
CD45		KS, KP, AT, TP, ZP, P
CD49d		KS, KP, AT, TP, P
CD79		TP
CD133		KS, KP, AT, TP
CD123		P
CD31*	Marker endotelskih ćelija	KS, KP, AT, TP, P
SSEA4	Marker ESC	KS, KP, AT, TP
HLA-DR		KS, KP, AT, TP, P
POZITIVNI		
CD13	Mezenhimski markeri	KS, KP, AT, TP, ZP
CD73*		KS, KP, AT, TP, P
CD90*		KS, KP, AT, TP, ZP, P
CD105*		KS, KP, AT, TP, ZP, P
CD51		TP
CD146		ZP
HLA-ABC		KS, KP, AT, TP, P
SH2		TP
SH3		TP, P
SH4		P
CD56	Markeri za adheziju mezenhimskih ćelija	ZP
CD29		KS, KP, AT, TP
CD44		KS, KP, AT, TP, ZP
CD166		KS, KP, AT, TP, P
CD49e		KS, TP, P

Prva prepreka u primeni i uopšte u poznavanju MSC jeste njihova karakterizacija. Danas ne postoji jedinstven sporazum niti univerzalni fenotipski test kojim se može pokazati da su ćelije izolovane iz različitih tkiva upravo MSC. Broj površinskih markera koji se koristi za dokazivanje identiteta ovih ćelija je veliki i koristi se prilično proizvoljno. U **Tabeli 1** su prikazani nazivi površinskih antigena koji se koriste kao pozitivni i negativni markeri MSC. Pored toga, ćelije izolovane iz tkiva, koje daju primarnu kulturu, nisu uniformne, one uvek predstavljaju heterogenu grupu ćelija u kojoj se nalaze ćelije sa različitim stepenima opredeljenosti, odnosno sa različitim potencijalom za diferencijaciju. Ako uzmemo u obzir princip asimetričnih deoba (*Morrison i Kimble, 2006*) i propagacije matičnih ćelija, kao i koncept niše (*Scadden, 2006*) u kojoj funkcionišu matične ćelije, jasno je da će ćelijska populacija izolovana iz tkiva zapravo predstavljati heterogenu populaciju ćelija različitih fenotipskih i funkcionalnih osobina. Ovaj „problem“ možda i nije tako ozbiljan kada se u laboratorijskim uslovima ispituju osobine MSC, međutim u kliničkim ispitivanjima, „čistoća“, ili bar definisanost uzorka koji bi se koristio za terapiju, od velike je važnosti. Suština funkcionalne biologije ćelija koja se često zapostavlja u *in vitro* istraživanjima, jeste činjenica da MSC nisu izolovane i nezavisne od ostatka organizma. Naime, matične ćelije treba posmatrati u okviru niša koje sačinjavaju i drugi tipovi ćelija, vanćelijski matriks, parakrini molekuli, humoralni signali, fizički stimuli, metabolički stimuli, pa i nervna kontrola (*Scadden, 2006*). S druge strane, izučavanje specifičnih fizioloških osobina, signalnih puteva i raznovrsnih odgovora humanih matičnih ćelija za sada je jedino moguće u kontrolisanim *in vitro* uslovima. Prema tome, pri interpolaciji rezultata na *in vivo* sistem, uvek treba imati na umu kompleksnost bivstvovanja matičnih ćelija u organizmu.

U pokušaju da se uvedu jedinstvena pravila za karakterizaciju MSC, 2006. godine, Internacionalno društvo za ćelijsku terapiju predložilo je minimalne kriterijume za definisanje MSC (*Dominici i sar., 2006*): (1) sposobnost adhezije za plastičnu podlogu koja će trajati tokom standardnih uslova kultivacije ćelija u posudama za ćelijske kulture; (2) specifična ekspresija površinskih antigena: visoka ekspresija markera specifičnih za mezenhimske ćelije: CD105, CD73 i CD90, a minimalna ekspresija markera specifičnih za hematopoetske ćelije: CD45, CD34, CD14 ili CD11b, CD79a ili CD19 i HLA klase II; (3) potencijal za multipotentnu diferencijaciju u pravcu

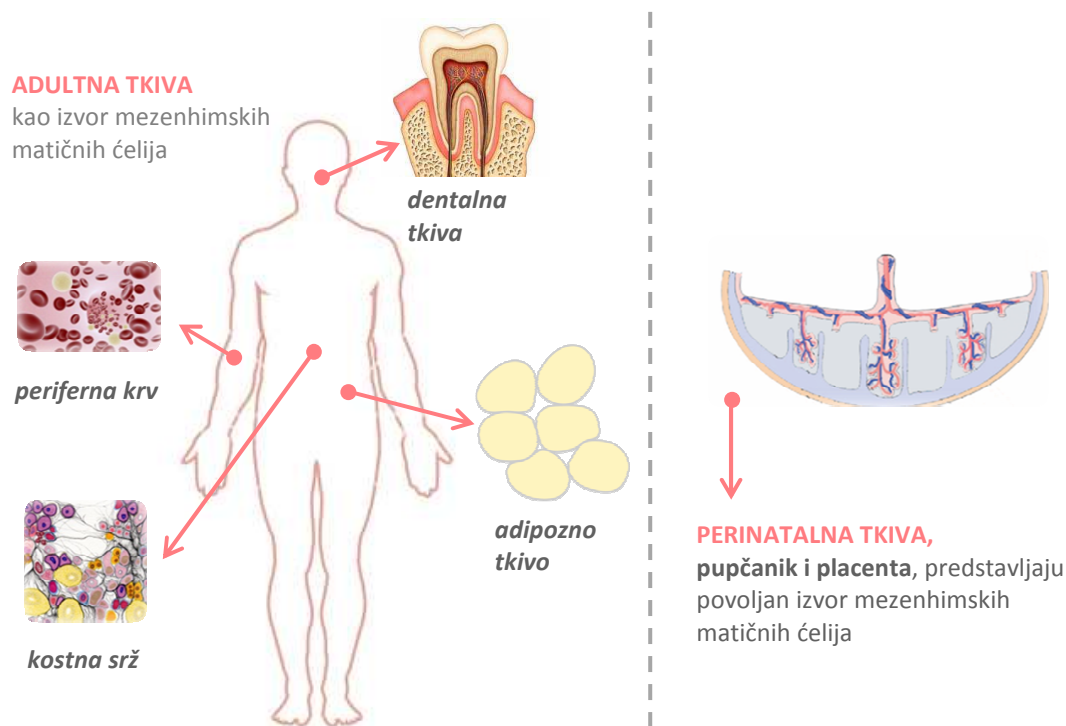
najmanje tri ćelijske loze (osteogene, adipogene i hondrogene loze) pod standardnim uslovima za diferencijaciju *in vitro*.

1.2.3. Izvori mezenhimskih matičnih ćelija

U poslednjih petnaest godina, matične ćelije različitog stepena multipotentnosti izolovane su iz mnogih adultnih tkiva. Izvori MSC razlikuju se kako prema broju ćelija koje se mogu iz njih izolovati, tako i prema invazivnosti metode izolacije i etičke opravdanosti procedure. Zbog etičkih dilema koje je izazvao način njihovog dobijanja, ESC se sve manje pominju kao mogući terapijski modalitet. Kostna srž se, s druge strane, dobija invazivnom metodom, koja je bolna i ne bez rizika za donora. Zbog toga su sve više u centru pažnje tkiva koja se odbacuju nakon medicinskih procedura i do kojih se može doći bez ugrožavanja zdravlja donora. Takva su perinatalna tkiva (placenta i pupčana vrpca) koja predstavljaju medicinski otpad nakon porođaja, adipozno tkivo, koje se takođe odbacuje nakon liposukcije ili maksilofacijalnih operacija, kao i zubna pulpa i periodoncijum, do kojih se može doći tokom rutinskih stomatoloških procedura (**Slika 6**).

Kostna srž. Kostna srž je najistraženiji i najstariji poznati izvor matičnih ćelija. Ona predstavlja kompleksnu mikrosredinu koju možemo smatrati i pravim „domom“ matičnih ćelija. Sačinjavaju je stromalne ćelije mezenhimskog porekla (endotelne ćelije, fibroblasti, adipociti, osteoblasti, miociti, adventicijske ćelije) i nemezenhimskog odnosno hematopoetskog porekla. Transplantacija kostne srži kao i ćelijska terapija hematopoetskih oboljenja pomoću hematopoetskih i stromalnih matičnih ćelija, danas su najčešće primenjivani vidovi ćelijske terapije. Iako su matične ćelije izolovane iz kostne srži dugo smatrane „zlatnim standardom“ stromalnih matičnih ćelija, ovaj izvor je poslednjih godina sve manje aktuelan kada je u pitanju izolacija MSC, dok je njegov terapijski potencijal za dobijanje hematopoetskih matičnih ćelija neprevaziđen, i jedini moguć. Zbog invazivne procedure kojom se dobija kostna srž, kao i zbog slabe ekspanzivne moći ovih ćelija, ovo tkivo su potisnula druga adultna tkiva, čija je izolacija jednostavnija i bezopasnija za pacijenta.

Vartonova sluz. Smatra se da Vartonova sluz sadži veliki broj MSC i da je njihova izolacija veoma pouzdana (*Secco i sar., 2009*). Vartonova sluz predstavlja



SLIKA 6. Izvori mezenhimskih matičnih ćelija. Poslednjih godina se za izolaciju MSC sve više primenjuju tkiva koja se odbacuju nakon medicinskih procedura i do kojih se može doći bez ugrožavanja zdravlja donora, poput dentalnih tkiva, adipoznog tkiva, periferne krvi i perinatalnih tkiva (placente i pupčanika). Kostna srž je najstariji poznati izvor MSC.

primitivno mukozno vezivno tkivo pupčanika koje je pozicionirano između amnijskog epitela i krvnih sudova pupčanika. Ova želatinozna masa sastoji se od proteoglikana i različitih izoformi kolagena. MSC koje se nalaze u Vartonovoj sluzi (UC-MSC, *Umbilical cord mesenchymal stem cells*) smatraju se primitivnim ćelijama, koje su, prema nekim teorijama, zarobljene u matriksu vezivnog tkiva tokom svoje migracije kroz pupčanik u razvoju, tokom embriogeneze (Taghizadeh i sar., 2011). UC-MSC se mogu umnožavati *in vitro* do velikog broja pasaža, što ih čini pouzdanim izvorom za aplikacije koje zahtevaju veliki broj ćelija. Osim toga, pokazano je da genetske mutacije, do kojih često dolazi u ćelijskim linijama ESC umnožavanih *in vitro*, nisu karakteristika UC-MSC, koje, naprotiv, pokazuju visoku hromozomsku stabilnost (La Rocca i sar., 2009; Troyer i Weiss, 2008). Prema nekim saznanjima, UC-MSC se mogu smatrati prelaznim matičnim ćelijama između embrionalnih i adultnih matičnih ćelija, budući da one pokazuju sve osobine adultnih MSC, ali istovremeno eksprimiraju neke embrionalne markere, poput gena Nanog, Oct-1 i Oct-4, odgovornih za sposobnost samoobnove (La Rocca i sar., 2009, Taghizadeh i sar., 2011). Takođe, pokazano je da UC-MSC eksprimiraju HLA-A i HLA-G antigene, dok ne eksprimiraju HLA-DR.

Ovakva ekspresija MHC molekula ukazuje na njihovu nisku imunogenost, ili čak na imunosupresivnu sposobnost. Pored toga, La Rocca i sar. (2009) po prvi put su pokazali postojanje dodatnih mezenhimskih markera u ovim ćelijama, poput Vimentina i alfa-aktina glatkih mišića (α SMA, *alpha-Smooth muscle actin*), takođe neuroektodermalnih markera (Nestin, GFAP), kao i ranih endodermalnih markera (GATA-4,-5,-6, HNF4, cytokeratin-8,-18,-19). Ekspresija navedenih markera ukazuje na visok potencijal za diferencijaciju i to u pravcu tkiva koja potiču od sva tri klicina lista (La Rocca i sar., 2009, Wang i sar., 2004). Sve navedene karakteristike UC-MSK (jednostavna izolacija, dobar prinos, visoka sposobnost ekspanzije, veliki diferencijacioni potencijal, genetska stabilnost i niska imunogenost), kao i njihova laka dostupnost i etička nekompromitovanost čine ove ćelije idealnim kandidatom za ispitivanja u cilju primene u ćelijskoj terapiji i regenerativnoj medicini.

Krv iz pupčanika. Krv iz pupčanika sadrži veliki broj HSC i mali broj MSC (CB-MSK, *Cord blood mesenchymal stem cells*). Ove ćelije poseduju sve osobine MSC, i pokazale su se primitivnije u odnosu na ćelije izolovane iz adultnih tkiva (Kern i sar., 2006). Ono što se može smatrati nedostatkom CB-MSK jeste nepouzdan prinos prilikom izolacije. Naime, da bi se dobio dovoljan broj CB-MSK, neophodno je na porođaju uzeti dovoljnu količinu krvi, što nije uvek moguće, i nije pod kontrolom lekara. Koncentracija MSC u krvi pupčanika manja je od one u Vartonovoj sluzi ili placenti, tako da će ova tkiva u budućnosti verovatno zameniti krv iz pupčanika kao komercijalni izvor MSC.

Adipozno tkivo. Masno tkivo predstavlja atraktivan izvor MSC, jer u ovom slučaju donor može biti i odrasla osoba u bilo kom životnom dobu. Za potrebe istraživanja, ovo je takođe pogodan izvor, s obzirom da se iz tkiva dobijenog liposukcijom ili iz male količine masnog tkiva dobijenog nakon maksilofacijalnih intervencija, može dobiti dovoljan broj ćelija.

Dentalna tkiva. Izolacija MSC iz dentalnih tkiva opisana je prvi put 2000. godine (Gronthos i sar., 2000). MSC su uspešno izolovane iz zubne pulpe mlečnih zuba, kao i iz periodoncijuma odraslih ljudi (Hung i sar., 2011), tkiva koja se kontinualno obnavljaju, tako da je prisustvo matičnih ćelija u njima neophodno. Izvori MSC dentalnog porekla su posebno zanimljivi zbog lake dostupnosti i rutinskih procedura kojima se ćelije mogu dobiti. Ćelije izolovane iz dentalnih tkiva pokazuju

karakteristične površinske markere, kao i multipotentnu sposobnost diferencijacije. Njihova proliferacija je brza i mogu se umnožavati više puta nego MSC iz kostne srži ili adipoznog tkiva (*Alipour i sar., 2010; Hung i sar., 2011, Huang i sar., 2008*).

Periferna krv. MSC u perifernoj krvi čoveka su malobrojne, i smatra se da su to MSC poreklom iz kostne srži koje putem krvi migriraju na mesto regeneracije tkiva (*Valenti i sar., 2008*). Zaista se pokazalo da je ove ćelije teško izolovati, te se njihova primena u terapijske svrhe ne istražuje koliko MSC iz drugih izvora. Međutim, kada se uspešno izoluju, njihova propagacija je duga i stabilna, što ukazuje na njihovu primitivnost i visok stepen „matičnosti“ koji vodi poreklo iz kostne srži (*Valenti i sar., 2008; Cesselli i sar., 2009*).

1.2.4. Poreklo mezenhimskih matičnih ćelija

Veliki broj radova objavljenih u poslednje dve decenije doprineo je brzom napretku u saznavanju biologije MSC, ali i do revizije nekih rezultata. Svedoci smo i velikog broja uporednih studija osobina matičnih ćelija različitog porekla (*Wagner i sar., 2005; Kern i sar., 2006; Ahmadian i sar., 2011*), koje pokušavaju da uporede i da objedine raznovrsne rezultate u jedinstvenu celinu činjenica. Na osnovu dosadašnjih saznanja, MSC, koje se mogu izolovati iz gotovo svih adultnih tkiva, razlikuju se u zavisnosti od svog izvora, a minimalni kriterijum za njihovu karakterizaciju je sposobnost diferencijacije u najmanje tri ćelijske loze.

Velika nepoznanica o matičnim ćelijama jeste njihova nativna distribucija u organizmu. Opsežno istraživanje u koje je bilo uključeno više svetskih laboratorija, objavljeno 2008. godine, ukazalo je na mogućnost perivaskularnog porekla svih MSC (*Crisan i sar., 2008*). Naime, u ovom istraživanju u nekoliko humanih organa (skeletni mišići, pankreas, adipozno tkivo i placenta) identifikovane su perivaskularne ćelije, uglavnom periciti, na osnovu površinskih markera i odsustva hematopoetskih, endotelskih i miogenih markera. Perivaskularne ćelije, nezavisno od izvora, zadržavale su svoju miogenu sposobnost, istovremeno iskazujući i potencijal za osteogenu, adipogenu i hondrogenu diferencijaciju kao i ekspresiju MSC markera. Na osnovu ovih saznanja, zaključeno je da krvni sudovi nose rezervne ćelije-progenitore, ukazujući na moguće poreklo MSC i drugih adultnih matičnih ćelija.

Teorija o postojanju dva tipa matičnih ćelija sa različitim fiziološkim karakteristikama: hematopoetskih od kojih poreklo vode ćelije krvi i mezenhimskih od kojih vode poreklo nehematopoetske ćelije raznih vezivnih tkiva, poslednjih godina je takođe dovedena je u pitanje. Naime, nekoliko laboratorija pokazalo je da se hematopoetske matične ćelije mogu diferencirati u mezenhimska tkiva, tj. u fibroblaste, miofibroblaste, adipocite, osteoblaste i hondrocite (*Sera i sar., 2009; Ogawa i sar., 2010*). Koncept prema kome i vezivna tkiva vode poreklo od HSC kontradiktoran je trenutno prihvaćenom mišljenju da samo od MSC mogu nastati navedeni tipovi mezenhimskih ćelija. Mehanizmi diferencijacije HSC u mezenhimska tkiva, kao i odnos između HSC i MSC u smislu sposobnosti obnove tkiva tek treba da se izuče i razjasne (*Sera i sar., 2009*). Moguće je da postoje dvostruki izvori mezenhimskih ćelija, tj. HSC i MSC. Takođe je moguće da su i HSC i MSC potomci još primitivnije matične ćelije. Prema mišljenju Ogawa (*2010*), MSC nisu prave matične ćelije i vode poreklo od HSC. Bitan praktičan doprinos istraživanja koja se bave otkrivanjem porekla MSC jeste i mogućnost primene HSC u terapiji različitih oštećenja i oboljenja vezivnih tkiva. Očigledan nedostatak *in vivo* eksperimenata u ispitivanju humanih MSC onemogućio je da se sagleda njihovo ponašanje *in situ*, što bi olakšalo pronalaženje odgovora na brojna pitanja o poreklu ovih ćelija.

Otkriće iPS dodatno je zakomplikovalo dogmu o HSC i MSC. Saznanja o transdiferencijaciji opredeljenih ćelija iz jednog u drugi tip, n. pr. miocita u neurone (*Sarig i sar., 2010*) ili ćelija jetre u ćelije pankreasa (*Aviv i sar., 2009*), pa i uveliko poznata epitelno-mezenhimska tranzicija, koja se takođe može odvijati i u suprotnom smeru (*Boyle i sar., 2011*), potvrđuju još jednom neverovatnu sposobnost ćelija da komuniciraju sa svojom okolinom, da se adaptiraju i da usmere svoj potencijal proliferacije i diferencijacije u skladu sa različitim potrebama organizma (*Chua i sar., 2011*).

Nezamenljiv model u istraživanju delovanja citokina na ćelijske funkcije, posebno kada je u pitanju rasvetljavanje signalnih puteva, predstavljaju ćelijske linije. Kada je reč o istraživanju ćelijske diferencijacije mezenhimskih ćelija, jedna od najčešće korišćenih ćelijskih linija jeste linija mišjih mioblasta, nazvana C2C12. Ove ćelije dobijene iz mišića miševa obolelih od mišićne distrofije imaju mezenhimsko poreklo i sposobnost diferencijacije u najmanje tri pravca: u pravcu miogene, osteogene

i adipogene diferencijacije (*Asakura i sar., 2001*). Ovakve osobine C2C12 ćelija, pored onih koje su karakteristične za svaku ćelijsku liniju, poput brze proliferacije, visoke ekspanzivnosti i stabilnosti, čine ovu ćelijsku liniju veoma pogodnom za ispitivanje molekularnih mehanizama uključenih u proces ćelijske diferencijacije.

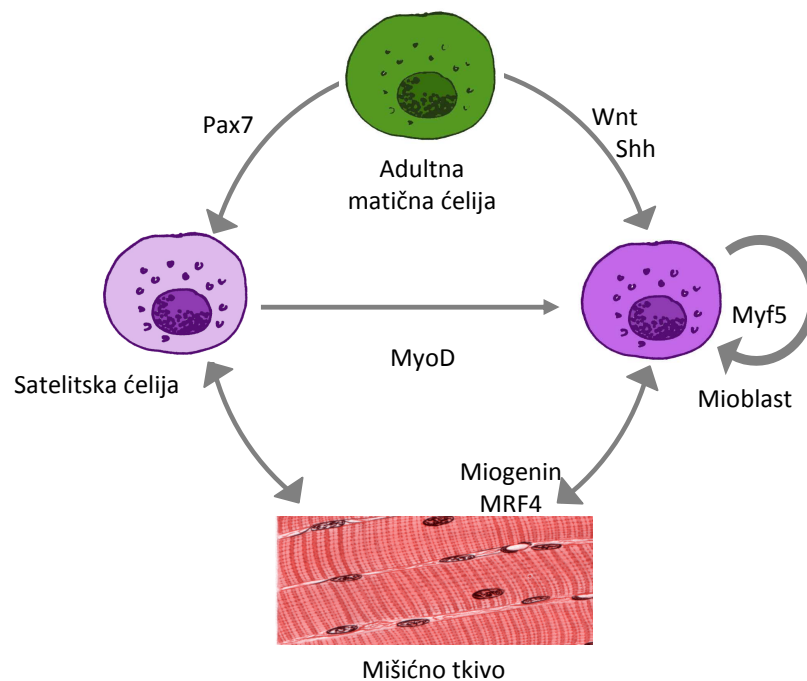
1.2.5. Diferencijacija mezenhimskih matičnih ćelija

1.2.5.1. Miogena diferencijacija mezenhimskih ćelija

Proces ćelijske diferencijacije nije ograničen na embrionalne ćelije i tkiva tokom razvića, što potvrđuje i samo postojanje matičnih ćelija u adultnom organizmu. Adultna tkiva imaju sposobnost reparacije i remodeliranja, a jedno od najintenzivnije izučavanih tkiva u oblasti regenerativne biologije jeste skeletno mišićno tkivo. Embrionalne skeletne miogene ćelije nastaju od progenitorskih ćelija smeštenih u somitima kao odgovor na signalne molekule iz susednih embrionalnih struktura. Adultne miogene ćelije, koje su aktivne tokom postnatalnog razvoja i regeneracije mišića, potiču uglavnom od specijalizovanih miogenih ćelija koje se pojavljuju tokom kasnog fetalnog razvića - satelitskih ćelija, lokalizovanih između bazalne lamine i sarkoleme mišićnog vlakna (*Parker i sar., 2003*). Satelitske ćelije su najznačajnije za regeneraciju oštećenog mišićnog tkiva (*Bryson-Richardson i Currie, 2008*), a novija istraživanja su ukazala na to da i druge populacije adultnih matičnih ćelija mogu učestvovati u regenerativnoj miogenezi (*Parker i sar., 2003*).

Miogena diferencijacija ćelija određena je aktivnošću specifičnih transkripcionih faktora sa zajedničkim imenom miogeni regulatorni faktori (MRF, *Myogenic regulatory factors*), koji u sadejstvu sa plejotropnim transkripcionim faktorima i epigenetskim regulatornim mehanizmima kontrolišu razviće mišića i njihovo postnatalno remodeliranje (**Slika 7**) (*Braun i Gautel, 2011, Bryson-Richardson i Currie, 2008*). Opređenost i terminalnu diferencijaciju u mišićne ćelije regulišu četiri miogena regulatorna faktora: Miogeni faktor 5 (*Myf5, Myogenic factor 5*), regulatorni faktor 4 specifičan za mišiće (*Mrf4, Muscle-specific regulatory factor 4*), protein za determinaciju mioblasta (*MyoD, Myoblast determination protein*) i miogenin. Ovi transkripcioni faktori aktiviraju brojne gene koji su odgovorni za iniciranje miogene

diferencijacije (Braun i Gautel, 2011, Bryson-Richardson i Currie, 2008). Aktivacija gena indukovana pomenutim regulatornim faktorima odvija se paralelno ili nishodno od transkripcionih faktora Pax3 (*Paired box gene 3*) i Pax7, u zavisnosti od faze miogeneze u embrionu ili adultnom organizmu (Bryson-Richardson i Currie, 2008). MyoD i Myf5 su transkripcioni faktori specifični za mišiće, koji sačinjavaju regulatornu transkripcionu mrežu koja se nalazi u osnovi opredeljenosti i diferencijacije mišićnih ćelija. Nepravilno funkcionisanje ove transkripcione mreže onemogućava formiranje skeletnih mišića. Dok se Myf5 i MyoD uglavnom smatraju značajnim za opredeljenost, miogenin je esencijalan za terminalnu diferencijaciju opredeljenih mioblasta. Mrf4 ima dvostruku ulogu: gena odgovornog za diferencijaciju ćelija koje sazrevaju, ali je takođe eksprimiran u nediferenciranim proliferišućim ćelijama u kojima može imati ulogu gena za opredeljenost. Signali koji prethode aktivaciji MRF (transkripcioni faktori i ekstracelularni signali) značajno se razlikuju prema anatomskoj lokaciji, mada se neki molekularni mehanizmi prepliću (Braun i Gautel, 2011).



SLIKA 7. Miogeneza u regeneraciji adultnog mišićnog tkiva. Pax7 protein je neophodan za sazrevanje satelitskih ćelija. U slučaju oštećenja mišićnog tkiva dolazi do aktiviranja regulatornog faktora MyoD u satelitskim ćelijama i njihove usmerene diferencijacije u miogene prekursor ćelije. Potom u ovim ćelijama dolazi do povišene ekspresije faktora za opredeljenost Myf5 i MyoD. Pritom, Myf5 ima ulogu u proliferaciji mioblasta, dok MyoD ima ulogu u diferencijaciji mioblasta. Adultne MSC takođe mogu da se diferenciraju u mioblaste u odgovor na različite signalne molekule, poput Wnt i Shh (sonic hedgehog), koji su značajni za embrionalnu miogenezu. Terminalna diferencijacija u miocite zahteva ekspresiju transkripcionog faktora Miogenina i MRF4. Izmenjeno iz Parker i sar., 2003; Nat Rev Genet.

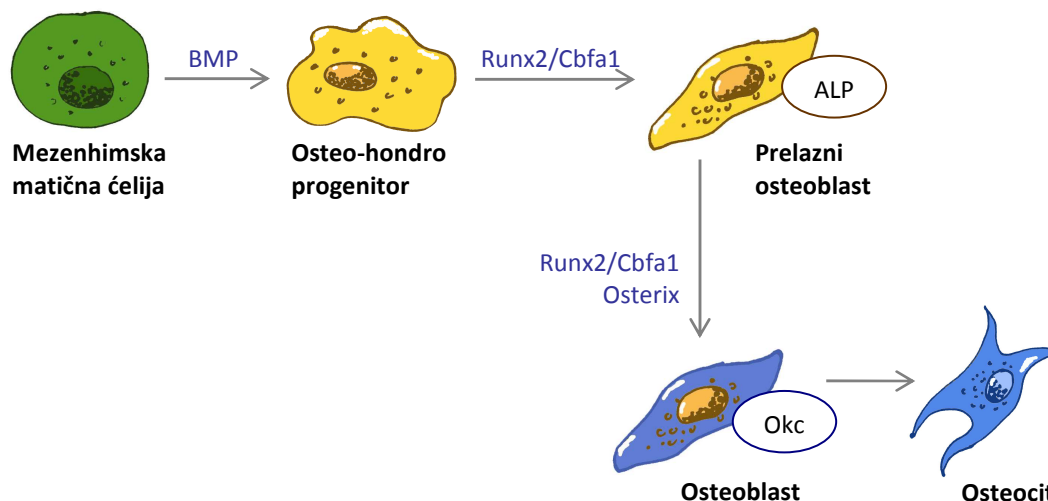
Tokom embrionalnog razvića, mišićna masa se povećava prevashodno zahvaljujući proliferaciji mioblasta. Postnatalno, proliferativna sposobnost ćelija opada, te se dalji rast mišićnog tkiva zasniva na rastu i remodeliranju već postojećih mišićnih vlakana, dok satelitske ćelije preuzimaju ulogu u regeneraciji tkiva. Tokom regeneracije mišićnog tkiva, satelitske ćelije eksprimiraju miogene regulatorne faktore na sličan način kao i mioblasti tokom razvića mišića. Ove ćelije proliferišu, zatim migriraju da bi njihovom međusobnom fuzijom nastale miotube koje dalje sazrevaju u miofibrile, ili se fuzionišu sa oštećenim segmentima mišićnih vlakana (*Morgan i Partridge, 2003*). Pored toga, pokazano je da satelitske ćelije imaju sposobnost samoobnavljanja, kao i sposobnost diferenciranja u mišićne ćelije *in vivo* (*Blaveri i sar., 1999*).

Inflamatorna oboljenja mišića. Razumevanje uloge citokina u procesu miogene diferencijacije od posebne je važnosti za razumevanje inflamatornih oboljenja mišića. Visoka ekspresija IL-17 primećena je u raznim autoimunskim i inflamatornim oboljenjima, poput astme, reumatoidnog artritisa, eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa, kolagenom indukovano artritisa i drugih. Polimiozitis (PM) i dermatomiozitis (DM) su hronična oboljenja mišića, za koja se pretpostavlja da imaju autoimunsko poreklo, a čiji je finalni ishod destrukcija mišićnog tkiva (*Hak i sar., 2011*). Za oba oboljenja karakteristična je infiltracija inflamatornih ćelija i proinflamatornih citokina u mišićno tkivo (*Tournadre i Miossec, 2012*). Iako mehanizmi razvoja bolesti nisu razjašnjeni, dosadašnja ispitivanja navode na zaključak da se radi o autoimunskim oboljenjima, s obzirom na to da su u mišićnim ćelijama detektovana autoantitela, povišena ekspresija MHC I molekula i T ćelijama posredovana citotoksičnost. U infiltratima limfocita u PD/DM mišićnom tkivu, prisustvo dva ključna citokina, interferon γ (IFN- γ) koga sintetišu Th1 ćelije i IL-17 koga sintetišu Th17 ćelije, ukazuje na povezanost aktiviranih T ćelija sa patologijom oboljenja. Pored toga, Th1 i Th17 proinflamatorni citokini prisutni u obolelom mišićnom tkivu povezuju se i sa migracijom, diferencijacijom i sazrevanjem inflamatornih ćelija, uključujući dendritične ćelije (*Tournadre i sar., 2010*).

1.2.5.2. Osteogena diferencijacija mezenhimskih ćelija

Koštano tkivo je sastavljeno od specijalizovanih ćelija i vanćelijskog matriksa koji nakon deponovanja kalcijum hidroksiapatita postaje mineralizovan. Koštano tkivo se nalazi u stalnom procesu remodeliranja koji uključuje tri tipa ćelija: osteoblaste - ćelije koje sintetisu koštani matriks, osteoklaste - ćelije uključene u resorpciju koštanog tkiva i osteocyte - terminalno diferencirane ćelije koje su zapravo osteoblasti zarobljeni u lakunama koštanog matriksa (*Caetano-Lopes i sar., 2007*). Ravnotežu između formiranja i resorpcije koštanog tkiva održava odnos između ova tri tipa ćelija koštanog tkiva. Naime, osteoblasti sintetisu faktore koji regulišu diferencijaciju osteoklasta, dok osteociti sintetisu faktore koji regulišu aktivnost i osteoblasta i osteoklasta. Na ovaj način omogućeno je da kost konstantno biva resorbovana od strane osteoklasta, a potom zamenjena aktivnošću osteoblasta u procesu remodeliranja.

Osteoblasti potiču od mezenhimskih prekursora zajedničkih i za hondrocyte, mioblaste i adipocite. Diferencijacija osteoblasta je kompleksan proces tokom kojeg dolazi do vremenski organizovane aktivacije specifičnih transkripcionih faktora koji regulišu ekspresiju određenih gena i na taj način definišu fenotip osteoblasta (**Slika 8**). Aktivacija gena za dva transkripciona faktora, Runx2/Cbfa1 (*Runt-related transcription factor 2/Core-binding factor subunit alpha-1*) i Osterix (Osx) smatra se ključnom za diferencijaciju osteoblasta, a odsustvo bilo kojeg od ova dva gena rezultuje potpunim odsustvom mineralizovanog skeleta (*Stains i Civitelli, 2003*). Mnogi drugi transkripcioni faktori identifikovani su u regulaciji funkcije osteoblasta, poput *homeobox* proteina: MSX1, MSX2, DLX3 i DLX5; članova AP1 familije; C/EBP beta, C/EBP delta, C/EBP gamma, C/EBP epsilon, C/EBP zeta, C/EBP eta, C/EBP theta, C/EBP iota, C/EBP kappa, C/EBP lambda, C/EBP mu, C/EBP nu, C/EBP xi, C/EBP omicron, C/EBP pi, C/EBP rho, C/EBP sigma, C/EBP tau, C/EBP upsilon, C/EBP phi, C/EBP chi, C/EBP psi, C/EBP omega, kao i efektor beta-catenin/Wnt signalnog puta (*Stains i Civitelli, 2003, Harada, 2003*). Takođe, familija faktora rasta pod nazivom morfogenetski proteini kosti (BMP, *Bone morphogenetic proteins*) medijatori su signala esencijalnih za potpunu diferencijaciju osteoblasta. Rani marker-protein osteogeneze, eksprimiran u nepotpuno diferenciranim osteoblastima jeste alkalna fosfataza (ALP, *Alkaline phosphatase*), dok diferencirani osteoblasti eksprimiraju samo dva specifična transkripta, Runx2/Cbfa1 i Osteokalcin, inhibitor funkcije osteoklasta koji je eksprimiran samo u potpuno diferenciranim ćelijama (*Caetano-Lopes i sar., 2007*).



SLIKA 8. Osteogena diferencijacija mezenhimskih matičnih ćelija. Osteoblasti potiču od mezenhimskih prekursora zajedničkih i za hondroците, mioblaste i adipocite. BMP familija faktora rasta od značaja je za potpunu diferencijaciju osteoblasta. Aktivacija gena za transkripcione faktore, *Runx2/Cbfa1* i *Osterix* smatra se ključnom za diferencijaciju osteoblasta. Alkalna fosfataza (ALP) predstavlja rani marker protein osteogeneze i eksprimirana je u nepotpuno diferenciranim osteoblastima, dok diferencirani osteoblasti eksprimiraju samo dva specifična transkripta, *Runx2/Cbfa1* i *Osteokalcin (Okc)*. Izmenjeno prema Wagner i Aspenberg, 2011; *Acta Orthopaedica*.

Runx2/Cbfa1 je ključni transkripcioni faktor za diferencijaciju osteoblasta. Tokom embrionalnog razvića, *Runx2/Cbfa1* je eksprimiran neposredno pre diferencijacije osteoblasta, i to samo u mezenhimskim ćelijama predodređenim da postanu hondroцитi ili osteoblasti. Nakon toga, ekspresija ovog transkripcionog faktora ograničena je na osteoblaste i neophodna je za ekspresiju proteina specifičnih za osteoblaste, poput Osteokalcina (*Caetano-Lopes i sar., 2007*). *Runx2/Cbfa1*-deficijentni miševi nemaju osteoblaste ali imaju sposobnost razvijanja hrskavice (*Ducy i sar., 2000*). Putem regulacije ekspresije Osteokalcina u osteoblastima, *Runx2/Cbfa1* kontroliše formiranje koštanog tkiva. Mesta za vezivanje *Runx2/Cbfa1* takođe su prisutna u regulatornim sekvencama većine gena koji su neophodni za sintezu vanćelijskog matriksa. Transkripcioni faktor *Osx* deluje nishodno od *Runx2/Cbfa1* u indukciji diferencijacije osteoblasta. *Osx*-deficijentni miševi razvijaju skelet normalnog oblika koji se sastoji samo od hrskavice, bez osteoblasta i mineralizovanog matriksa.

Inflamatorna oboljenja koštanog tkiva. Uloga i mehanizam delovanja IL-17 na destrukciju koštanog tkiva u reumatoidnom artritisu potvrđena je brojnim istraživanjima. Th17 ćelije imaju stimulatorni efekat na osteoklastogenezu i igraju važnu ulogu u patogenezi RA posredstvom IL-17, dok Th1 i Th2 ćelije imaju

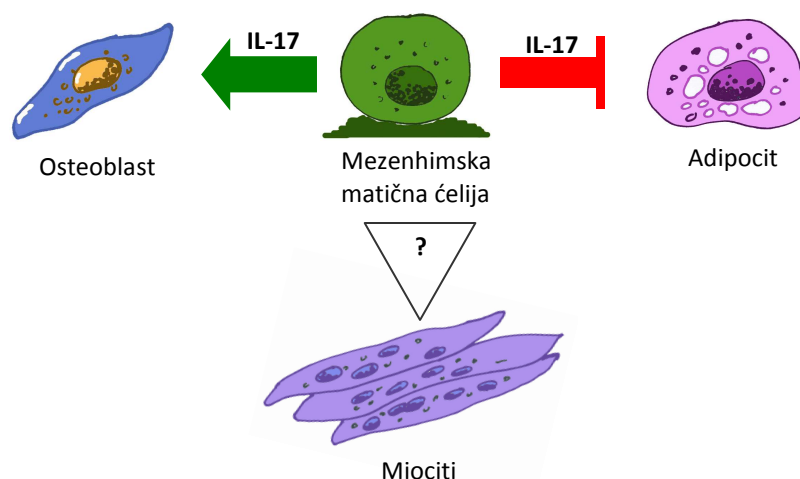
inhibitorni efekat na osteoklastogenezu posredstvom IFN- γ i IL-4. IL-17 indukuje ekspresiju liganda za receptor aktivator NF-kB (RANKL, *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*) na sinovijalnim fibroblastima mezenhinskog porekla, ali takođe aktivira lokalnu inflamaciju koja dovodi do povišene sinteze proinflamatornih citokina poput TNF α , IL-1 i IL-6 u sinovijalnim makrofagama. Ovi citokini aktiviraju osteoklastogenezu ili direktnim delovanjem na prekursore osteoklasta ili indukcijom ekspresije RANKL-a na sinovijalnim fibroblastima. Th17 ćelije takođe eksprimiraju RANKL na svojim ćelijskim membranama, na taj način dodatno doprinoseći povećanju osteoklastogeneze (Gaffen, 2009; Okamoto i sar., 2011). Manje je poznato da li IL-17 učestvuje u patogenezi ektopične osifikacije u skeletnim mišićima, karakteristične za određena oboljenja kod ljudi (Hashimoto i sar., 2007; McCarthy i Sundaram, 2005; Yamashiro i sar., 2004) do koje dolazi zbog neadekvatne diferencijacije multipotentnih ćelija.

1.2.6. Uloga interleukina-17 u biologiji mezenhinskih matičnih ćelija

Ubikvitarna ekspresija receptora za IL-17 proširuje oblast delovanja ovog citokina izvan dobro poznatih imunskih funkcija, otkrivajući njegovu ulogu u ćelijskim procesima poput ćelijske proliferacije i diferencijacije. Poslednjih godina, istraživanja efekata IL-17 na mezenhimske ćelije dovela su do rezultata koji potvrđuju da biološki odgovor ćelija na dejstvo IL-17 zavisi od njihovog tipa. Iako je IL-17R eksprimiran na gotovo svim ćelijama u organizmu, njegova ekspresija je posebno visoka na fibroblastima i ćelijama nalik fibroblastima koje se nalaze u kostnoj srži (Yao i sar., 1995; Fossiez i sar., 1996). Pokazano je da je IL-17 faktor rasta za mišje i humane MSC (Huang i sar., 2006; Huang i sar., 2009, Mojsilović i sar., 2011). Uočeno je da u *in vitro* uslovima MSC izolovane iz kostne srži miša i čoveka kultivisane u prisustvu IL-17 pokazuju povećanu sposobnost za formiranje CFU-F. Takođe, u prisustvu ovog citokina, primećene su gigantske kolonije, nastale zahvaljujući sposobnosti IL-17 da indukuje proliferaciju MSC (Huang i sar., 2006). S obzirom na to da IL-17 nije eksprimiran ili je nisko eksprimiran u T ćelijama u normalnim fiziološkim uslovima, on se smatra citokinom koji učestvuje u brzom ćelijskom odgovoru, te da se eksprimira u odgovoru na infekcije, kada ima ulogu da pospeši imunski odgovor organizma (Ye i

sar., 2001; Huang i sar., 2004). Iako je IL-17 stimulisao proliferaciju humanih MSC *in vitro* u eksperimentima Huang i sar. (2006), da bi ostvario isti efekat na ekspanziju CFU-F *in vivo* bilo je neophodno prethodno oštećenje hematopoetskog sistema, koje je ostvareno mijeloablativnim dozama zračenja. Stoga je zaključeno da je narušavanje homeostaze u hematopoetskoj mikrosredini neophodan preduslov koji pokreće stimulatorni efekat IL-17 na ekspanziju MSC *in vivo*. Pored toga, moguće je da za ispoljavanje svojih efekata IL-17 zahteva prisustvo dodatnih kofaktora, n. pr. Faktora rasta fibroblasta (FGF, *Fibroblast growth factor*) i drugih citokina. Zračenje koje dovodi do oštećenja tkiva takođe stimuliše različite mehanizme za reparaciju tkiva putem indukcije oslobađanja raznovrsnih proinflamatornih citokina (TNF, IL-1, IL-6 i SCF, *Stem cell factor*) (Huang i sar. 2006).

IL-17 takođe ima ulogu finog regulatora diferencijacije MSC (**Slika 9**), budući da je pokazano da stimuliše osteogenu diferencijaciju humanih MSC (Huang i sar., 2009) kao i da je uključen u proces remodeliranja kostiju (Shen i sar., 2008). S druge strane, IL-17 je inhibirao adipogenezu humanih MSC poreklom iz kostne srži, istovremeno stimulišući lipolizu u diferenciranim adipocitima (Shin i sar., 2009). Ipak, mehanizmi i značaj delovanja IL-17 na diferencijaciju mezenhimskih ćelija još uvek su nedovoljno istraženi, posebno njegova uloga u miogenoj diferencijaciji.



SLIKA 9. Efekti IL-17 na diferencijaciju multipotentnih mezenhimskih ćelija. *Dosadašnja istraživanja ukazala su na značaj IL-17 u diferencijaciji mezenhimskih ćelija. IL-17 stimuliše osteogenu diferencijaciju i inhibira adipogenu diferencijaciju mezenhimskih ćelija, dok njegovo učešće u miogenoj diferencijaciji mezenhimskih ćelija još uvek nije istraženo.*

1.3. ENDOTELSKE ČELIJE

Prvi funkcionalni organski sistem koji se razvija kod kičmenjaka jeste cirkulatorni sistem, neophodan za adekvatno snabdevanje tkiva kiseonikom. Vaskulatura nastaje tokom tri glavna ćelijska procesa: vaskulogeneze, angiogeneze i arteriogeneze. Vaskulogeneza, proces *de novo* formiranja krvnih sudova, omogućava nastanak prvih krvnih sudova u primarnoj vaskularnoj mreži. Angiogeneza, formiranje krvnih sudova iz prethodno postojećih, omogućava snažnu ekspanziju vaskularne mreže, dok u procesu arteriogeneze dolazi do povećanja dijametra arterijalnih sudova kao odgovor na povećan protok krvi. Cirkulatorni sistem nastaje i remodelira se tokom ova tri procesa putem kojih nastaje kompleksan sistem krvnih sudova koji posreduje u mnogobrojnim vitalnim fiziološkim procesima poput snabdevanja tkiva kiseonikom i nutrijentima, odstranjivanja otpadnih materija, imunskom odgovoru, regulaciji temperature i održavanju krvnog pritiska.

Pored toga što predstavlja glavni mehanizam vaskularizacije tkiva tokom embrionalnog razvoja, angiogeneza je neophodna i tokom regeneracije i reparacije tkiva, a takođe može biti uključena i u patološke procese. Angiogeneza je kompleksan proces koji zahteva koordinaciju ćelijske proliferacije, diferencijacije, migracije, adhezije ćelija za vanćelijski matriks, kao i signalizaciju između ćelija tokom morfogeneze tkiva (*Adams i Alitalo, 2007*). Unutrašnjost lumena krvnih sudova obložena je slojem endotelskih ćelija koje učestvuju u regulaciji protoka hranljivih materija, raznovrsnih biološki aktivnih molekula i samih ćelija krvi. Uloga selektivne barijere endotela ostvaruje se zahvaljujući prisustvu membranskih receptora za brojne molekule, poput proteina (n.pr. faktora rasta, prokoagulantnih i antikoagulantnih proteina), molekula koji učestvuju u transportu lipida, metabolita (n.pr. NO i serotonin) i hormona, kao i putem specifičnih proteina i receptora preko kojih se ostvaruju veze između ćelija i između ćelija i vanćelijskog matriksa (*Cines i sar., 1998*). Endotelske ćelije reaguju na fizičke i hemijske stimuluse unutar cirkulacije i regulišu hemostazu, tonus krvnih sudova, imunski i inflamatorni odgovor. Pored toga, ovo su ključne ćelije u procesu angiogeneze i vaskulogeneze (*Sumpio i sar., 2002*). Endotelske ćelije su najčešće u stanju mirovanja (*Fong, 2009; Muñoz-Chápuli i sar., 2004*), međutim, brojni stimuli koji potiču iz njihove mikrosredine mogu ih navesti da postepeno formiraju

nove krvne sudove, i da u tom procesu prođu kroz stadijum ćelijske proliferacije, povećane otpornosti ka apoptozi, migraciju i, konačno, diferencijaciju i formiranje nove vaskulature (*Muñoz-Chápuli i sar., 2004*). Najznačajniji molekul koji kontroliše morfogenezu krvnih sudova jeste vaskularni endotelski faktor rasta (VEGF, *Vascular endothelial growth factor*) koji je neophodan za hemotaksu i diferencijaciju prekursora endotelskih ćelija, proliferaciju endotelskih ćelija, njihovu organizaciju u krvnim sudovima, kao i za angiogenezu uključenu u remodeliranje tkiva. Neke od ovih uloga jednako su važne za rast krvnih sudova u adultnom organizmu kao i u tkivu tumora (*Adams i Alitalo, 2007*). Pored VEGF familije, regulacija procesa angiogeneze ostvaruje se i posredstvom FGF-a, *hedgehog* familije signalnih molekula, neutrofilina i faktora transformacije rasta (TGF- β , *Transforming growth factor beta*) (*Adams i Alitalo, 2007; Patel-Hett i D'Amore, 2011, ten Dijke i Arthur, 2007*).

Danas se za istraživanje različitih funkcija endotelskih ćelija, a posebno u svrhu rasvetljavanja molekularnih mehanizama uključenih u biološke odgovore ćelija koriste endotelske ćelijske linije, različitog porekla. EA.hy 926, je često primenjivana ćelijska linija koja je nastala fuzijom endotelskih ćelija iz humane umbikalne vene (HUVEC, *Human umbilical vein endothelial cells*) sa humanom ćelijskom linijom karcinoma (*Emeis i Edgell, 1988*). Ove ćelije ostvaruju funkcije karakteristične za diferencirane endotelske ćelije, što ih čini pogodnim za ispitivanje uticaja različitih citokina na proces angiogeneze, kao i molekularnih mehanizama uključenih u ovaj proces.

1.3.1. Biološki efekti interleukina-17 na endotelske ćelije

Uloga IL-17 u procesu angiogeneze ispitivana je najčešće u kontekstu raznih oboljenja poput reumatoidnog artritisa (*Moran i sar., 2011; Pickens i sar., 2010*), tumora (*Liu i sar., 2011; Murugaiyan i Saha, 2009*) i akutnog koronarnog sindroma (*Zhu i sar., 2011*). Prema dosadašnjim saznanjima, IL-17 stimuliše angiogenezu, migraciju i invazivnost humanih dermalnih endotelskih ćelija, kao i migraciju i reorganizaciju citoskeleta sinovijalnih fibroblasta u reumatoidnom artritisu (*Moran i sar., 2011*). S obzirom na to da IL-17 indukuje angiogenezu u zglobovima obolelim od reumatoidnog artritisa, ovaj citokin se smatra potencijalnom farmakološkom metom za terapiju ovog oboljenja (*Pickens i sar., 2010*). S druge strane, smatra se da IL-17 može

biti odgovoran za apoptozu i disfunkciju vaskularnih endotelskih ćelija, koja u finalnom ishodu može dovesti do patogeneze ateroskleroze (Zhu i sar., 2011). Pored toga, IL-17 stimuliše angiogenezu i predstavlja marker loše prognoze za tumor debelog creva (Liu i sar., 2011). Međutim, pokazani su i drugačiji efekti IL-17, koji ispoljava dvostruku ulogu u razvoju tumora, jer s jedne strane, indukuje odgovor citotoksičnih T ćelija što rezultuje smanjenjem tumora, dok s druge strane indukuje angiogenezu povezanu sa rastom tumora. U studiji o ulozi IL-17 na proces angiogeneze Numasaki i sar. (2003) su ukazali na značajne efekte ovog citokina jer je IL-17 je stimulisao rast tumora i to putem indukcije angiogeneze. U eksperimentu u kome su tumorske ćelijske linije koje su prethodno retroviralnom transdukcijom modifikovane tako da sintetišu visoke koncentracije IL-17, transplantovane u miševu u kojima je praćen rast tumora, IL-17 je stimulisao neovaskularizaciju mrežnjače pacova, stimulisao tubulogenezu i migraciju humanih endotelskih ćelija kao i produkciju proangiogenih faktora, poput VEGF i NO od strane fibroblasta i tumorskih ćelija. Pomenuti rezultati ukazali su na to da je IL-17 snažan proangiogeni citokin.

1.3.2. Značaj stepena oksigenacije za biološke efekte citokina

Pored uticaja parakrinih faktora (Muñoz-Chápuli i sar., 2004), na funkcije endotelskih ćelija utiče i adekvatna oksigenacija tkiva, koja varira između 0.5% i 14%, zavisno od specifičnog tipa tkiva (Ivanović, 2009a; Fong, 2009). Za većinu ćelijskih tipova optimalna koncentracija kiseonika kreće se u rasponu između 3% i 6% (Ivanović, 2009). S obzirom na to da su ove vrednosti značajno ispod nivoa kiseonika u atmosferi, ove koncentracije kiseonika se mogu smatrati i fiziološkom hipoksijom (Fong, 2009) ili *in situ* normoksijom (Ivanović, 2009a). Međutim, gotovo sva *in vitro* istraživanja danas obavljaju se u prisustvu 20% O₂, koncentraciji koja uveliko premašuje *in vivo* uslove. Takođe, poznato je da se efekti koje različiti citokini ostvaruju na ćelijske funkcije razlikuju u zavisnosti od koncentracije kiseonika na kojoj su vršeni eksperimenti, posebno kada su u pitanju matične ćelije hematopoeze (Ivanović, 2009; Krstić i sar., 2009; Kovačević-Filipović i sar., 2007). Stoga ispitivanje delovanja citokina u tzv. uslovima hipoksije može biti od značaja za razumevanje njihove uloge *in vivo* (Ivanović, 2009). Ukoliko uzmemo u obzir stimulatívni efekat IL-17 i hipoksije na

angiogenezu, logično bi bilo očekivati da će zajedničko delovanje ovakvih uslova pojačano stimulisati angiogenezu endotelskih ćelija. Međutim, do sada nisu poznata istraživanja koja analiziraju istovremeni uticaj niske koncentracije kiseonika i IL-17 na ponašanje endotelskih ćelija. Značaj ovakvih istraživanja leži i u činjenici da neka hronična inflamatorna oboljenja koja uključuju prisustvo IL-17 nastaju u hipoksičnim uslovima, poput reumatoidnog artritisa i psorijaze, a u okviru kojih dolazi do patološke angiogeneze (*Heidenreich i sar., 2009*). Takođe, poznato je da u slučaju ishemijske povrede (hipoksični uslovi) citokini i hemokini aktiviraju lokalni endotel u oštećenom tkivu i privlače endotelske prekursore koji adheriraju za aktivirani endotel, proliferišu i stvaraju nove krvne sudove (*Tepper i sar., 2005*).

1.3.3. Diferencijacija mezenhimskih matičnih ćelija u endotelske ćelije

Vaskularizacija je neophodna za regeneraciju tkiva i predstavlja jedno od centralnih pitanja u regenerativnoj medicini, bilo da je u pitanju revaskularizacija oštećenog tkiva ili neovaskularizacija sintetičkih transplanata dobijenih bioinženjeringom. Za uspostavljanje vaskularizacije u oba navedena slučaja, ključni su slični procesi. Dok je proces angiogeneze u ishemičnom tkivu jako dobro istražen, razvoj novih krvnih sudova u *ex vivo* proizvedenom tkivu još uvek nailazi na velike prepreke, iako je cilj isti i odnosi se na primenu osnovnih principa neoangiogeneze u *in vitro* uslovima. Trenutno postoji nekoliko strategija u pristupu ovom problemu koje se testiraju u svrhu vaskularizacije tkiva stimulacijom angiogeneze i one obuhvataju: *in vivo* i *in vitro* pre-vaskularizaciju tkiva, *in vitro* delovanje citokina i hemokina i drugih molekula koji indukuju angiogenezu, ili primenu specifičnih ćelijskih ko-kultura koje simuliraju *in vivo* uslove za vaskularizaciju tkiva (*Novosel i sar., 2011*). Pored toga, rasvetljavanje mehanizama uključenih u endotelnu diferencijaciju ćelija može takođe dovesti do saznanja koja bi se mogla primeniti za vaskularizaciju oštećenih ili bioinženjeringom dobijenih tkiva.

Pored otkrivanja adekvatne stimulacije endotelskih ćelija da deluju proangiogeno, posebna pažnja se posvećuje i dobijanju potrebnog broja endotelskih ćelija koje se mogu klinički primeniti. Populacija mononuklearnih ćelija u perifernoj krvi sadrži i endotelske progenitor ćelije koje imaju sposobnost diferencijacije u

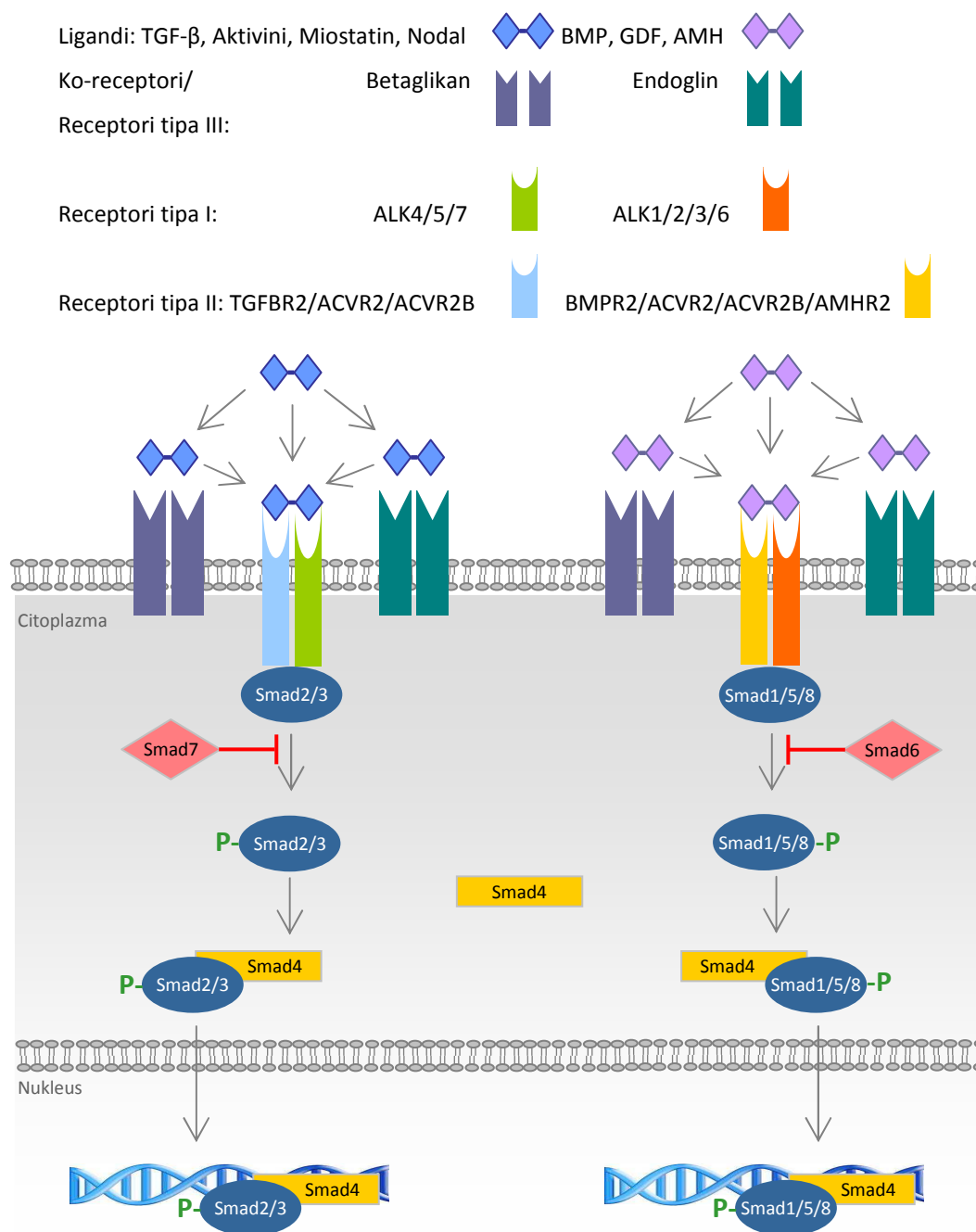
endotelske ćelije krvnih sudova i koje su neophodne za postnatalnu vaskulogenezu (Asahara i sar., 1997; Asahara i sar., 1999). Međutim, broj cirkulišućih endotelskih progenitora je mali, a njihova mobilizacija iz kostne srži se dešava u uslovima stresa, poput ishemije miokardijuma ili udova. Za potrebe tkivnog inženjerstva takođe je važno obezbediti povoljan izvor endotelskih ćelija koje neće izazvati imunsku reakciju i odbacivanje transplanta (Joensuu i sar., 2011). Stoga se, imajući u vidu dostupnost i povoljne karakteristike MSC, ove ćelije poslednjih godina ove sve češće spominju kao povoljan izvor za dobijanje diferenciranih endotelskih ćelija. MSC bi mogle, u terapijskom smislu, omogućiti primenu autolognih ćelija, dok niska imunogenost MSC izolovanih iz pupčanika može omogućiti i njihovu alogenu primenu. Metode koje se najčešće koriste za *in vitro* endotelnu diferencijaciju zahtevaju primenu brojnih faktora za indukciju endotelne diferencijacije, što ih čini skupim i dugotrajnim, dok neki od njih ne zadovoljavaju kriterijume za potencijalnu implantaciju u humane pacijente. Stoga bi bilo od značaja razviti jednostavan protokol bez ksenogenih faktora koji bi omogućio rešenje za primenu ovih ćelija u rekonstruktivnim intervencijama (Joensuu i sar., 2011).

1.3.3.1 TGF- β superfamilija

TGF- β superfamilija uključuje veliki broj faktora sličnih po strukturi i funkciji sa ulogom multifunkcionalnih regulatora u raznovrsnim biološkim procesima. Članovi TGF- β superfamilije učestvuju u morfogenezi, embrionalnom razvoju, regulaciji imunskog odgovora, regeneraciji tkiva, inflamaciji i razvoju kancera (Gordon i Blobel, 2008; Santibañez i sar., 2011). U poslednjoj deceniji TGF- β superfamilija opisana je kao glavna komponenta regulatorne mreže koja orkestrira opredeljenost i diferencijaciju matičnih ćelija. Plejotropni efekti TGF- β superfamilije deo su fino organizovane signalne aktivnosti liganada, receptora i unutarćelijskih signalnih molekula, blisko povezanih tokom diferencijacije embrionalnih i adultnih matičnih ćelija.

Članovi TGF- β superfamilije vezuju se za svoje receptore na ćelijama pri čemu formiraju heteromerne komplekse. Dimeri serin/treonin kinaznih receptora tipa I i II vezuju dimere liganada iz TGF- β superfamilije. Poznato je sedam receptora tipa I: kinaze slične aktivinu 1-7 (*ALK1 – 7, Activin-like kinase*) i pet receptora tipa II: TGF- β

receptor (TGFBR2), receptor za BMP2 (BMP2R), aktivin receptor 2 (ACVR2), ACVR2B i AMHR2 (**Slika 10**). Osim toga, poznati su i ko-receptori, tj. receptori tipa III, endoglin i betaglikan, koji učestvuju u vezivanju TGF- β liganda i u modulaciji kinazne aktivnosti receptora. Aktivirani kompleksi receptora signaliziraju unutar ćelije putem Smad signalnih molekula. Opisano je osam različitih tipova konzerviranih Smad molekula (Smad1-8) (*Santibañez i sar., 2011*). Kada su u pitanju endotelne ćelije, Goumans i sar. (2002) su pokazali da određeni signalni putevi TGF- β mogu imati suprotne efekte na endotelne ćelije, i da promene u njihovoj ravnoteži doprinose pro- i anti-angiogenoj ulozi TGF- β . Pritom, ALK-5–Smad2/3 signalni put učestvuje u inhibiciji ćelijske proliferacije i migracije, dok ALK-1–Smad1/5 signalni put učestvuje u njihovoj indukciji. Skorija istraživanja ukazala su na mogućnost modifikacije TGF- β signalizacije u svrhu usmeravanja ćelijske diferencijacije u željenom pravcu. Za dobijanje broja endotelne ćelije koji bi bio dovoljan za terapijsku primenu, najčešće su korišćene embrionalne matične ćelije. Međutim, malobrojne su studije koje su identifikovale specifične stimulse koji bi bili dovoljni da podrže diferencijaciju i održanje velikog broja funkcionalnih endotelne ćelije iz ESC, poput VEGF-a (*Nourse i sar., 2010*) ili BMP4 (*Goldman i sar., 2009*). Takođe, diferencijacijom humanih ESC u pomenutim eksperimentima dobijen je mali broj endotelne ćelije u kratkotrajnim kulturama, dok njihova dugotrajna ekspanzija nije postignuta (*James i sar., 2010*). U potrazi za jednostavnim i dugotrajnim rešenjem za endotelnu diferencijaciju ESC došlo se do saznanja da blokiranje signalizacije TGF- β omogućava sintezu većeg broja endotelne ćelije i njihovo dugotrajno održavanje. Primena specifičnog farmakološkog inhibitora SB-431542, koji inhibira kinaznu aktivnost receptora ALK5, stimulisala je proliferaciju, diferencijaciju i funkcionalnost endotelne ćelije dobijenih diferenciranjem ESC (*Watabe i sar., 2003*). Pored dobijanja većeg broja endotelne ćelije, ova metoda omogućila je i usmerenu diferencijaciju ESC u endotelne ćelije, budući da se one u standardnim uslovima mogu diferencirati i u glatkomišićne ćelije i pericite (*James i sar., 2010*). Na osnovu toga pretpostavilo se da inhibitori kinazne aktivnosti TGF- β receptora mogu postati nezamenljivi u protokolima za dobijanje velikog broja zrelih endotelne ćelije *ex vivo*. Iako se pokazala uspešnom, inhibicija TGF- β signalizacije još uvek nije primenjena u cilju diferencijacije MSC u endotelne ćelije.



SLIKA 10. TGF- β superfamilija liganada i receptora i signalni molekuli uključeni u unutarćelijski prenos signala. Receptori tipa I deluju nishodno od receptora tipa II fosforilacijom regulatornih Smad molekula (R-Smad). Aktivacija ALK1/2/3/6 dovodi do fosforilacije Smad1/5/8, dok se aktivacijom ALK4/5/7 fosforilišu Smad2/3. Fosforilisani (-P) R-Smad molekuli formiraju heteromerne komplekse pomoćnim (Co-Smad, Co-operating) Smad4. Ovaj kompleks nakon translokacije u nukleus učestvuje u regulisanju ekspresije specifičnih gena vezujući se za promotere gena zajedno sa drugim DNK-vezujućim transkripcionim faktorima. Smad6 i Smad7 pripadaju grupi inhibitornih Smad molekula (I-Smad). Izmenjeno iz Santibañez i sar., 2011. Clin Sci.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA



Najnovija saznanja o efektima IL-17, kao i posebnom tipu Th ćelija koje ga proizvode, ukazuju da biološki efekti koje ovaj citokin ostvaruje u organizmu prevazilaze okvire dosadašnjih istraživanja, koja su IL-17 posmatrala uglavnom u kontekstu inflamacije i hematopoeze, kao i u progresiji različitih bolesti, uključujući inflamatorna, autoimunska i maligna oboljenja. Pored istraživanja drugih autora i naša dosadašnja istraživanja pokazala su da IL-17 ima ulogu i u ćelijskim procesima poput ćelijske proliferacije i diferencijacije, i to prvenstveno na hematopoetskim matičnim i progenitor ćelijama, pri čemu je ukazano da IL-17 ispoljava različite efekte zavisno od od tipa ćelijske loze i stepena diferencijacije ćelija. Novija istraživanja pokazala su da IL-17 utiče i na proliferaciju i diferencijaciju drugih tipova ćelija, ukazujući na njegovu ulogu finog regulatora diferencijacije mezenhimskih matičnih ćelija, kao i da u prisustvu drugih poznatih angiogenih faktora stimuliše sposobnost endotelskih ćelija za angiogenezu. Ipak, efekti, mehanizmi i značaj delovanja IL-17 na diferencijaciju mezenhimskih i endotelskih ćelija još uvek su nedovoljno istraženi.

Stoga su istraživanja obuhvaćena ovom disertacijom imala za cilj ispitivanje efekata IL-17 na različite ćelijske funkcije kako mezenhimskih, tako i endotelskih ćelija, određivanjem dejstva IL-17 na proliferaciju, migraciju, angiogenezu i diferencijaciju ovih ćelija u specifičnim uslovima mikrosredine. S obzirom na to da je za razumevanje delovanja citokina od velike važnosti poznavanje molekularnih mehanizama koji leže u osnovi različitih efekata, u okviru ovog rada istraživani su i molekularni mehanizmi koji omogućavaju regulaciju ispitivanih funkcija od strane IL-17, određivanjem aktivacije signalnih molekula, kao i ekspresije specifičnih gena i proteina neophodnih za određene ćelijske funkcije.

Danas je opšte prihvaćeno da MSC poseduju mnoge osobine koje podržavaju njihovu primenu u ćelijskoj terapiji. Ove ćelije, koje odlikuje sposobnost samoobnove i multipotentni potencijal diferencijacije, je relativno lako izolovati, poseduju veliki potencijal za ekspanziju u kulturi i sposobne su da migriraju na mesto oštećenja tkiva. Do sada su MSC uspešno diferencirane najčešće u tri ćelijske loze mezenhimskog porekla: adipocite, osteoblaste i hondroblaste, dok je diferencijacija MSC u endotelske ćelije ostvarena u kratkotrajnim kulturama uz nizak prinos. Stoga je u okviru ovog rada postavljen cilj uspostavljanja adekvatnog modela za proučavanje procesa diferencijacije MSC u endotelske ćelije, i to na modelu primarnih MSC.

Da bi se postigli navedeni ciljevi, istraživanja obuhvaćena ovim radom su se odvijala u sledećim pravcima:

1. Utvrđivanje efekata i mehanizama delovanja IL-17 na multipotentne mezenhimske ćelije, primenom modela mišje ćelijske linije C2C12:

- analizom delovanja IL-17 na proliferaciju i migraciju C2C12 ćelija
- analizom delovanja IL-17 na ekspresiju gena i proteina specifičnih za usmerenu diferencijaciju u pravcu mioblasta (miogenin, MyHC)
- analizom delovanja IL-17 na ekspresiju gena i proteina specifičnih za usmerenu diferencijaciju u pravcu osteoblasta (Runx2/Cbfa1, Cox-2, ALP)
- analizom učešća specifičnih signalnih puteva uključenih u IL-17-izmenjenu opredeljenost C2C12 ćelija, preko aktivacije MAPK i BMP signalnih kaskada.

2. Utvrđivanje efekata delovanja IL-17 na funkcije endotelskih ćelija u uslovima različite koncentracije O₂: 3% O₂ i 20% O₂ korišćenjem modela humane endotelske ćelijske linije EA.hy 926:

- analizom delovanja IL-17 na proliferaciju EA.hy 926 ćelija
- analizom delovanja IL-17 na apoptozu EA.hy 926 ćelija
- analizom delovanja IL-17 na migraciju EA.hy 926 ćelija
- analizom delovanja IL-17 na tubulogenezu EA.hy 926 ćelija
- analizom delovanja IL-17 na ekspresiju gena za eNOS i Cox-2 kao i njihovih proteinskih produkata u EA.hy 926 ćelijama

3. Uspostavljanje adekvatnog modela za proučavanje procesa diferencijacije MSC u endotelske ćelije:

- * izolacija i karakterizacija UC-MSCC
 - izolacija MSC iz tkiva pupčanika metodom eksplanta i njihova dugotrajna kultivacija
 - karakterizacija UC-MSCC analizom ekspresije hematopoetskih i mezenhimskih marker proteina
 - karakterizacija UC-MSCC određivanjem multipotentnog potencijala za diferencijaciju

- * analiza diferencijacije UC-MSCC u endotelske ćelije
 - primenom različitih medijuma za diferencijaciju
 - analizom ekspresije proteina karakterističnih za endotelske ćelije
 - analizom sposobnosti diferenciranih UC-MSCC za tubulogenezu

3. MATERIЈAL I METODE



3.1. MATERIJAL

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

TABELA 2. Primarna antitela primenjena u eksperimentima (*PE*-fikoeritrin, *phycoerythrin*; *FITC*-*fluorescein izotiocijan*at; *Fsc*-*fluorescein*; *WB*-*Western blot*; *IF*-*imunofluorescentno obeležavanje*; *ICH*-*imunocitohemijsko obeležavanje*; *FlowCy*-*protočna citometrija*).

PRIMARNA ANTITELA			
Antigen	Poreklo	Metoda	Proizvođač
pERK1,2	zečije	WB	R&D Systems, SAD
ERK1,2	zečije	WB	R&D Systems, SAD
pp38	zečije	WB	R&D Systems, SAD
p38	zečije	WB	R&D Systems, SAD
pJNK	zečije	WB	R&D Systems, SAD
JNK	zečije	WB	R&D Systems, SAD
eNOS	zečije	WB	R&D Systems, SAD
IL-17R	zečije	WB, IF	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Cox-2	zečije	WB	Santa Cruz Biotechnology, SAD
pSmad1	zečije	WB	Santa Cruz Biotechnology, SAD
Smad1	zečije	WB	Santa Cruz Biotechnology, SAD
anti HA	mišje	WB	ljubaznošću Dr Carmelo Bernabeu, Španija
alpha Tubulin	mišje	WB	Sigma-Aldrich, SAD
MyHC, α -MF-20	mišje	WB, ICH	Developmental Studies Hybridoma Bank, SAD
aSMA	mišje	IF	Developmental Studies Hybridoma Bank, SAD
vWf	zečije	IF	Santa Cruz Biotechnology, SAD
CD31	mišje	IF	ljubaznošću Dr Carmelo Bernabeu, Španija
CD34, PE konjugovano	mišje	FlowCy	Dako Cytomation, Danska
CD11b (Mac-1 α), FITC konjugovano	mišje	FlowCy	Biosource, SAD
CD105 (Endoglin), PE konjugovano	mišje	FlowCy	Invitrogen, SAD
CD45, FITC konjugovano	mišje	FlowCy	R&D Systems, SAD
CD33, Fsc konjugovano	mišje	FlowCy	R&D Systems, SAD
CD235a (GlycophorinA), PE konjugovano	mišje	FlowCy	R&D Systems, SAD
CD90 (Thy-1/Thy-1.1), PE konjugovano	mišje	FlowCy	R&D Systems, SAD
CD44H, PE konjugovano	mišje	FlowCy	R&D Systems, SAD
Nanog	mišje	FlowCy	Cell Signaling Technology, SAD
Sox-2	mišje	FlowCy	Cell Signaling Technology, SAD
SSEA4	mišje	FlowCy	Cell Signaling Technology, SAD

TABELA 3. Sekundarna antitela i izotipske kontrole primenjene u eksperimentima (*HRP-peroksidaza rena, horse radish peroxidase; TRITC-tetrametilrodamin-5-(6)-izotiocijanat; FITC-fluorescein izotiocijanat; WB-Western blot; IF-imunofluorescentno obeležavanje; ICH-imunocitohemijsko obeležavanje; FlowCy-protočna citometrija*).

SEKUNDARNA ANTITELA			
Antitelo	Poreklo	Metoda	Proizvođač
HRP konjugovano anti-mišje	kozje	WB, ICH	Pierce, SAD
HRP konjugovano anti-zečije	kozje	WB	R&D Systems, SAD
TRITC konjugovano anti zečije	kozje	IF	Sigma-Aldrich, SAD
FITC konjugovano anti-mišje	kozje	IF	Sigma-Aldrich, SAD
FITC konjugovano anti-zečije	kozje	IF	Sigma-Aldrich, SAD
FITC konjugovano anti-mišje	kozje	FlowCy	BD Biosciences, SAD
IZOTIPSKE KONTROLE			
Izotip	Poreklo	Metoda	Proizvođač
IgG2A-PE	mišje	FlowCy	R&D Systems, SAD
IgG1-PE	mišje	FlowCy	Invitrogen, SAD
IgG1-FITC	mišje	FlowCy	Invitrogen, SAD

TABELA 4. Citokini i inhibitori signalne transdukcije primenjeni u eksperimentima.

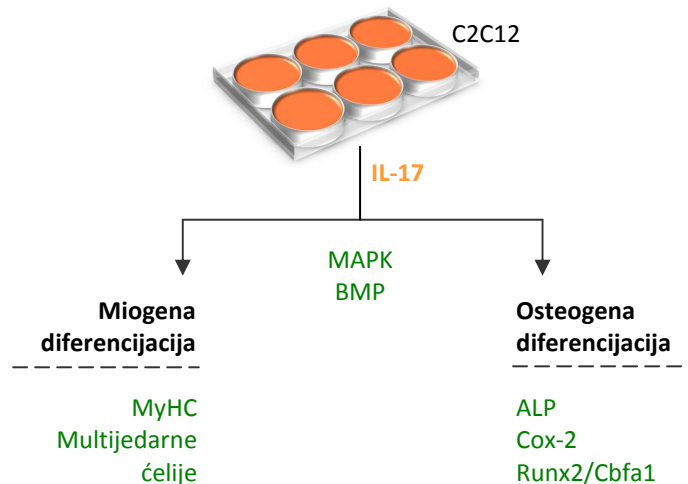
CITOKINI I INHIBITORI SIGNALNE TRANSDUKCIJE		
Naziv	Opis	Proizvođač
mišji rekombinantni IL-17	/	R&D Systems, SAD
humani rekombinantni IL-17	/	R&D Systems, SAD
humani rekombinantni VEGF	/	R&D Systems, SAD
PD98059	inhibitor MEK1,2/ERK1,2	Calbiochem, Nemačka
SB203580	inhibitor p38	Calbiochem, Nemačka
SB505124	inhibitor ALK5 receptora za TGF- β	Sigma Aldrich, SAD

3.2. DIZAJN EKSPERIMENTA

3.2.1. Utvrđivanje efekata i mehanizama delovanja IL-17 na multipotentne mezenhimske ćelije

Kao model za istraživanje efekata IL-17 na diferencijaciju multipotentnih mezenhimskih ćelija primenjena je C2C12 mišja ćelijska linija (**Slika 11**). C2C12 ćelije su kultivisane u specifičnim diferencijacionim medijumima za miogenu i osteogenu diferencijaciju u odsustvu ili prisustvu različitih koncentracija IL-17 (25, 50 ili 100 ng/ml). Nakon šest dana kultivacije ćelija analizirana je ekspresija proteina i gena karakterističnih za miogenu i osteogenu diferencijaciju. Za praćenje miogene diferencijacije, pored utvrđivanja prisustva višejedarnih ćelija, na proteinskom nivou analizirana je ekspresija teškog lanca miozina (MyHC, *Myosin heavy chain*), dok je na

genskom nivou analizirana ekspresija gena za miogenin. Osteogena diferencijacija praćena je na osnovu ekspresije ALP u ćelijama i Cox-2 u ćelijskim lizatima, dok je na nivou gena analizirana transaktivacija reporter plazmida za Runx2/Cbfa1 transkripcioni faktor. U cilju rasvetljavanja molekularnih mehanizama delovanja IL-17, ispitivana je aktivacija p38, JNK i ERK1,2 MAPK kao i BMP-Smad signalnog puta. U tu svrhu primenjeni su inhibitori za p38 (SB203580) i ERK1,2 (PD98059), a za detaljnija ispitivanja učešća ERK1,2 MAPK korišćen je reporter plazmid SRE-luc i plazmid sa konstitutivno aktivnom ekspresijom MEK1 (caMEK1). Za detaljnija ispitivanja učešća BMP-Smad signalnog puta, primenjen je Gal4-Smad1 sistem kao i dva plazmida sa dominantno negativnim (dn) ALK2 i konstitutivno aktivnim (ca) ALK2 mutantnim konstruktima.

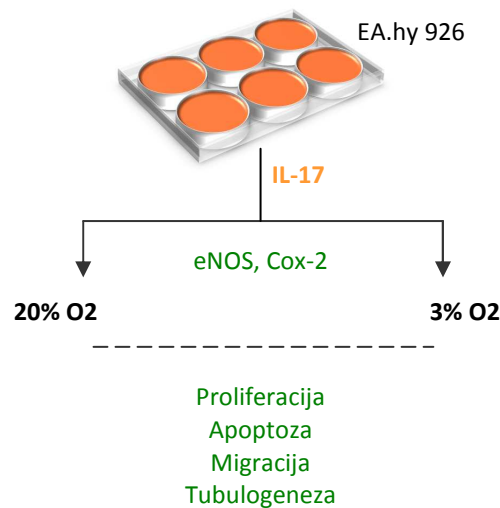


SLIKA 11. Shematski prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje delovanja IL-17 na diferencijaciju C2C12 multipotentnih mezenhimskih ćelija.

3.2.2. Utvrđivanje efekata delovanja IL-17 na endotelske ćelije u uslovima različite koncentracije O₂

Kao model za istraživanje efekata IL-17 na funkcije endotelskih ćelija primenjena je EA.hy 926 humana endotelska ćelijska linija (**Slika 12**). Kako se proces angiogeneze *in vivo* odvija u hipoksičnoj sredini, ispitivan je i uticaj hipoksije kao faktora mikrosredine, kao i međusobna povezanost hipoksije i IL-17, na različite funkcije endotelskih ćelija. U tu svrhu EA.hy 926 ćelije su kultivisane u odsustvu ili prisustvu različitih koncentracija IL-17 (50 i 100 ng/ml) na 20% O₂ i 3% O₂. Nakon

inkubacije (24h-72h) analizirana je proliferacija, apoptoza, migracija i tubulogena sposobnost EA.hy 926 ćelija. U cilju ispitivanja molekularnih mehanizama delovanja IL-17 analizirana je ekspresija gena za eNOS i Cox-2, kao i njihovih proteinskih produkata, s obzirom na to da ovi molekuli imaju važnu ulogu u procesu angiogeneze.

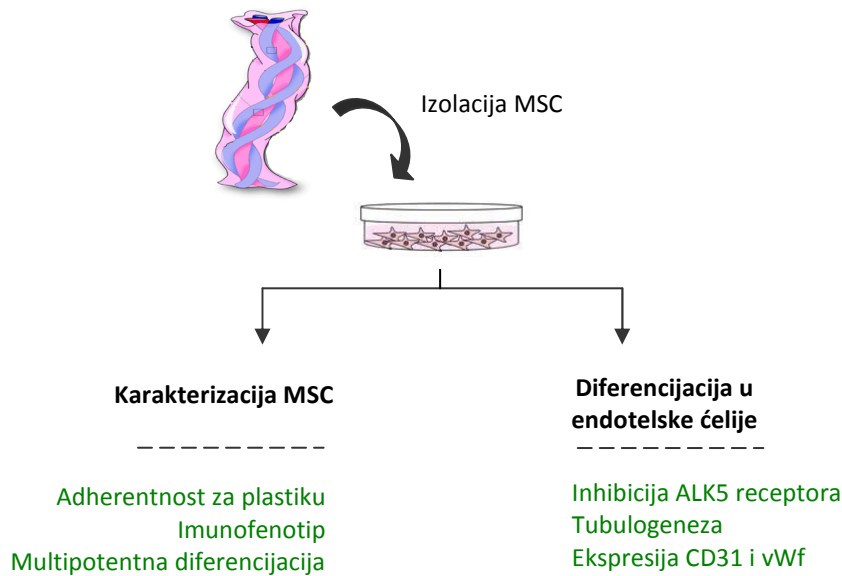


SLIKA 12. Shematski prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje delovanja IL-17 na angiogenezu EA.hy 926 ćelija.

3.2.3. Uspostavljanje adekvatnog modela za proučavanje procesa diferencijacije MSC u endotelske ćelije

MSC su izolovane iz pihtijastog vezivnog tkiva pupčanika - Vartonove sluzi, metodom eksplanta, umnožene i okarakterisane prema važećim preporukama i kriterijumima Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju (*Dominici i sar., 2006*) (**Slika 13**). Ćelije su okarakterisane imunofenotipskom analizom ekspresije površinskih antigena karakterističnih za MSC i određivanjem multipotentne sposobnost diferencijacije u pravcu osteogenih, adipogenih, hondrogenih i miogenih ćelija.

Da bi se uspostavio uspešan protokol za diferencijaciju MSC u endotelske ćelije, UC-MSK su kultivisane u različitim medijumima za diferencijaciju koji su sadržali različite kombinacije inhibitora za TGF- β receptor, SB505124 i VEGF-a. Proces diferencijacije je praćen u periodu od 14 dana, a nakon sedmog i četrnaestog dana, analizirana je morfologija ćelija, njihova sposobnost za tubulogenezu i ekspresija proteinskih markera za endotelske ćelije, CD31 i von Willebrandt faktora (vWf).



SLIKA 13. Shematski prikaz eksperimentalnog protokola za izolaciju, karakterizaciju i endotelnu diferencijaciju mezenhimskih matičnih ćelija iz tkiva pupčanika.

3.3. ĆELIJE I ĆELIJSKE KULTURE

3.3.1. Ćelijske linije

C2C12 i EA.hy 926 ćelijske linije nabavljene su preko American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, SAD), dok su UC-MSC izolovane iz tkiva pupčanika prema novo-uspostavljenom protokolu opisanom u daljem tekstu. Navedene ćelijske linije kao i primarne MSC gajene su u standardnom medijumu za kultivaciju - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) sa dodatkom 10% fetalnog goveđeg seruma (FBS, *Fetal Bovine Serum*, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austrija) i 100 jedinica/ml penicilin/streptomicina (PAA Laboratories) na temperaturi od 37°C, u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti. Za potrebe eksperimenata sa EA.hy 926 ćelijskom linijom, koncentracija kiseonika u atmosferi podešavana je na 20% i 3%.

3.3.2. Izolacija MSC iz tkiva pupčanika

UC-MSC su izolovane metodom eksplanta. Šest pupčanika prosečne dužine 20 cm dobijeno je nakon normalnih porođaja uz prethodno pribavljenu saglasnost donora. Pupčanici su aseptički čuvani u hladnom fosfatnom puferu (PBS, *Phosphate Buffer Saline*) sa 100 µg/ml penicilin/streptomicina i 2.5 µg/ml amfotericina B (PAA Laboratories) do izolacije ćelija, u periodu od 6h do 24h od dobijanja uzoraka. Pupčanici su isprani nekoliko puta u PBS-u i umbilikalna vena i arterije su odstranjene iz vezivnog tkiva pupčanika. Na ovaj način je ogoljeno pihtijasto vezivno tkivo pupčanika – Vartonova sluz koje je potom usitnjeno na delove približne zapremine od 2-3 mm³. Nekoliko komadića tkiva stavljeno je u petrijevu posudu sa malom količinom standardnog medijuma kako bi se tkivo zalepilo za plastiku a nakon 3h komadići tkiva su potpuno prekriveni medijumom. S obzirom na to da je izolacija UC-MSC bila zasnovana na njihovoj sposobnosti adhezije za plastiku, bez primene proteaza koje bi odvojile ćelije od matriksa u koji su uronjene, komadići pupčanika inkubirani su u standardnom medijumu do pojave dovoljnog broja ćelija na plastičnoj podlozi, uz dodavanje svežeg medijuma svakog drugog dana. U proseku sedam dana nakon postavljanja eksplanta, značajan broj ćelija iz tkiva adherirao je za plastiku. Ostaci tkiva su uklonjeni, a ćelije su inkubirane do postizanja subkonfluentnosti (80-90% prekrivenosti površine na kojoj se kultivišu) ili brojnosti dovoljne za pasažu. UC-MSC su uspešno izolovane iz dva od ukupno šest uzoraka tkiva pupčanika.

Za postupak pasažiranja, adherentne ćelije su ispirane dva puta PBS-om i odlepljivane od podloge inkubiranjem sa rastvorom 0,25% tripsina/1mM EDTA (PAA Laboratories) na 37°C. U cilju prekidanja ove reakcije i inaktivacije tripsina, ćelijama je dodavan standardni medijum za kultivaciju, a nakon određivanja broja vijabilnih ćelija, UC-MSC su ponovo zasejavane za sledeći postupak pasažiranja.

UC-MSC su zamrzavane nakon svake pasaže u medijumu za zamrzavanje koji se sastojao od 10% dimetil sulfoksida (DMSO, Sigma-Aldrich) u FBS-u. Zamrzavano je 1x10⁶ ćelija/ml medijuma za zamrzavanje. Ćelije su u navedenom medijumu skladištene na -70°C i u tečnom azotu (-196°C).

3.4. DIFERENCIRANJE ČELIJA

3.4.1. Osteogena diferencijacija

Ćelije su kultivisane u pločama sa šest otvora i inkubirane u standardnom medijumu na temperaturi od 37°C, u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti do postizanja 80% konfluentnosti. Da bi se usmerile ka osteogenoj diferencijaciji, ćelije su inkubirane u medijumu za indukciju osteogene diferencijacije, tzv. osteogenom diferencijacionom medijumu (ODM) koji se sastojao od: 50 µM askorbinske kiseline (Sigma-Aldrich), 10 nM deksametazona, 10 mM beta-glicerofosfata, oba od Applichem (Darmstadt, Nemačka) i 10% FBS u DMEM-u. Inkubacija ćelija u ODM-u trajala je šest dana uz zamenu medijuma na svaka dva dana. Nakon toga, u cilju potvrde osteogene diferencijacije, rađen je test aktivnosti alkalne fosfataze. Ćelije su fiksirane formalin/etanolom (1:9) u trajanju od 30 sekundi na sobnoj temperaturi, a potom im je dodavan hromogen za alkalnu fosfatazu, BCIP/NBT (*5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/p-nitroblue tetrazolium chloride*, Sigma-Aldrich). Reakcija je zaustavljena sa 10 mM NaF u PBS-u. Aktivnost alkalne fosfataze u ćelijama analizirana je i dokumentovana na svetlosnom mikroskopu (Carl Zeiss, Nemačka).

3.4.2. Adipogena diferencijacija

Ćelije su kultivisane u pločama sa šest otvora i inkubirane na temperaturi od 37°C, u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti do postizanja 80% konfluentnosti. U cilju adipogene diferencijacije korišćen je adipogeni diferencijacioni medijum (ADM) koji se sastojao od 100 µg/ml IBMX-a (*isobutyl-methylxanthine*, Sigma-Aldrich), 1 µM deksametazona, 10 µg/ml insulina (Actrapid, Novonordisc, Bagsvaerd, Danska) i 10% FBS u DMEM-u. Ćelije su kultivisane u ADM-u 21 dan uz zamenu medijuma tri puta nedeljno. Prisustvo unutarćelijskih lipidnih kapi, koje su dokaz adipogene diferencijacije, potvrđivano je analizom na svetlosnom mikroskopu nakon bojenja ćelija *Oil Red O* bojom (Merck, Darmstadt, Nemačka).

3.4.3. Hondrogena diferencijacija

Ćelije su kultivisane u pločama sa šest otvora i inkubirane na temperaturi od 37°C, u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti do postizanja 80% konfluentnosti. Kako bi se indukovala hondrogena diferencijacija ćelije su inkubirane 21 dan u hondrogenom diferencijacionom medijumu (HDM) koji se sastojao od: 5 ng/ml TGF-β1 (R&D Systems), 200 μM askorbinske kiseline, 10 nM deksametazona i 10% FBS u DMEM-u. Svež medijum je dodavan tri puta nedeljno. Nakon inkubacije, ćelije su obojene Safranin O bojom (Merck), a hondrogena diferencijacija ćelija analizirana je na svetlosnom mikroskopu.

3.4.4. Miogena diferencijacija

Ćelije su kultivisane u pločama sa šest otvora na temperaturi od 37°C, u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti do postizanja 80% konfluentnosti, a zatim je standardni medijum zamenjivan miogenim diferencijacionim medijumom (MDM) koji se sastojao od: 50 μM hidrokortizona (Galenika, Beograd, Srbija), 0.1 μM deksametazona, 5% konjskog seruma (PAA Laboratories) i 2% FBS u DMEM-u prilikom kultivacije UC-MSc, odnosno 2% konjskog seruma u DMEM-u, za kultivaciju C2C12 ćelijske linije. UC-MSc su inkubirane u MDM-u šesnaest dana, uz zamenu medijuma svaka dva-tri dana, dok su C2C12 ćelije u MDM-u gajene šest dana, uz zamenu medijuma svaka dva dana. Da bi se potvrdila diferencijacija ćelija u miotube, ćelije su ispirane PBS-om, fiksirane ledenim metanolom i bojene 0.3% *Crystal violet* bojom. Potom je na svetlosnom mikroskopu ispitivano prisustvo tri ili više nukleusa u nizu u pojedinačnim ćelijama.

3.4.5. Diferenciranje u miofibroblaste

UC-MSc su zasejavane na okrugle staklene ljustice (50 000 ćelija po ljustici) i inkubirane u standardnom medijumu na temperaturi od 37°C, u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti preko noći. Potom je u kulture dodavano 2.5 ng/ml TGF-β1 i ćelije su inkubirane još dva dana. Da bi se potvrdila diferencijacija ćelija u miofibroblaste, ćelije su obeležavane antitelom za α-SMA, prema protokolu opisanom u nastavku. Prisustvo

α -SMA analizirano je na fluorescentnom mikroskopu Axioskop2 plus (Carl Zeiss, Nemačka).

3.4.6. Diferenciranje UC-MSK u endotelske ćelije

UC-MSK su zasejavane u ploče sa šest otvora i to 200 000 ćelija po otvoru. Ćelije su preko noći inkubirane u standardnom medijumu na temperaturi od 37°C, u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti. Potom su UC-MSK podeljene u četiri grupe prema medijumima u kojima su kultivisane:

1. Ćelije kultivisane u standardnom medijumu, kao negativna kontrola
2. Ćelije kultivisane u standardnom medijumu sa 50 ng/ml VEGF-a, endotelski diferencijacioni medijum 1 (EDM1), kao pozitivna kontrola
3. Ćelije kultivisane u standardnom medijumu sa 0.1 μ M SB505124, endotelski diferencijacioni medijum 2 (EDM2)
4. Ćelije kultivisane u standardnom medijumu sa 0.1 μ M SB505124 i 50 ng/ml VEGF, endotelski diferencijacioni medijum 3 (EDM3)

Ćelije su potom inkubirane četrnaest dana, uz zamenu medijuma na svaka tri dana. Nakon sedmog i četrnaestog dana diferencijacije analizirana su svojstva ćelija karakteristična za endotelske ćelije.

3.5. ANALIZA ĆELIJSKIH FUNKCIJA

3.5.1. Analiza proliferacije ćelija

3.5.1.1. Analiza proliferacije ćelija primenom MTT testa

Stepen proliferacije ćelija analiziran je MTT testom. U standardnom medijumu zasejavano je 5×10^3 ćelija/otvoru ploče sa 96 otvora. Narednog dana, ćelije su tretirane prema tekućem eksperimentalnom dizajnu. Nakon odgovarajućih inkubacija ćelijama je dodavan MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5 difenil-tetrazolijum bromid, Sigma-Aldrich) u koncentraciji 0.5 mg/ml i ćelije su inkubirane na temperaturi od 37°C, u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti. Nakon dva sata inkubacije, nastali kristali formazana rastvarani su u 0.1 N HCl u izopropanolu. Optička gustina merena je na

automatskom čitaču za mikrotitarske ploče na 540 nm (Labsystems Multiskan PLUS, Finska).

3.5.1.2. Test ćelijske proliferacije u kratkotrajnim kulturama

UC-MSK (od druge do pete pasaže) zasejavane su u duplikatu u ploče sa šest otvora, u koncentraciji 4×10^4 ćelija/otvoru, i inkubirane u standardnom medijumu u trajanju od sedam dana na temperaturi od 37°C , u atmosferi sa 5% CO_2 i 100% vlažnosti. Drugog, četvrtog i sedmog dana inkubacije, ćelije su prikupljane nakon postupka odlepljivanja pomoću Trypsin-EDTA, i u svakom uzorku određivani su broj i vijabilnost ćelija bojenjem sa 0,4 % rastvorom Tripan plavog (Invitrogen).

3.5.1.3. Test ćelijske proliferacije u dugotrajnim kulturama

Za određivanje proliferativnog kapaciteta UC-MSK u dugotrajnim kulturama i utvrđivanja vremena potrebnog za dupliranje broja ćelija (*population doubling time*, PDT), ćelije su zasejavane u ploče sa šest otvora u sledećim koncentracijama: 1×10^4 , 5×10^4 ili 1×10^5 ćelija/otvoru i inkubirane na temperaturi od 37°C , u atmosferi sa 5% CO_2 i 100% vlažnosti. Kada bi ćelije dostigle konfluentnost, odlepljivane su, brojane i ponovo zasejavane u početnom broju. Ovaj postupak je ponavljan nakon svake pasaže u trajanju od 24 dana. Vreme dupliranja ćelijske populacije (PDT, *population doubling time*) izračunavano je prema **Formuli 1**.

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

FORMULA 1. Vreme dupliranja ćelijske populacije (PDT). T je vreme završetka ćelijske kulture izraženo u satima, T_0 je početno vreme ćelijske kulture izraženo u satima, N_0 i N_t predstavljaju broj ćelija na početku i na kraju svake kulture.

3.5.1.4. CFU-F test

CFU-F test korišćen je za određivanje klonogenog potencijala UC-MSK. Čelije (od treće do šeste pasaže) su zasejavane u ploče sa šest otvora, i to u broju od 10, 50 i 100 ćelija po otvoru u standardnom medijumu, u duplikatu. Nakon četrnaest dana inkubacije na temperaturi od 37°C, u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% vlažnosti ćelije su ispirane PBS-om, fiksirane ledenim metanolom u trajanju od 5 minuta i bojene 0.3% *Crystal violet*-om u trajanju od 15 minuta. Čelije su potom ispirane destilovanom vodom i brojane su vidljive kolonije pod inverznim mikroskopom, pri čemu je kao jedna kolonija podrazumevana grupacija ćelija koja sadrži više od pedeset ćelija.

3.5.2. Analiza ćelijske migracije *Scratch* testom

Migratorni potencijal ćelija analiziran je putem *in vitro Scratch* testa. Čelije su zasejavane u ploče sa 24 otvora u standardnom medijumu. Kada bi ćelije dostigle konfluentnost, vrhom nastavka za pipetu pravljena je ogrebotina u ćelijskom monosloju po dijametru svakog otvora, nakon čega su ćelijske kulture inkubirane tokom dodatna 24h u specifičnom medijumu prema eksperimentalnom dizajnu. Čelije su potom fiksirane ledenim metanolom i obojene 0.1% *Crystal violet* bojom. Migracija ćelija u polje ogrebotine dokumentovana je na svetlosnom mikroskopu i kvantifikovana korišćenjem Tscratch programa (Computational Science and Engineering Laboratory, Swiss Federal Institute of Technology, ETH Zurich, Švajcarska).

3.5.3. Test tubulogenog kapaciteta endotelskih ćelija

Da bi se analizirala sposobnost ćelija da formiraju tubule korišćen je test tubulogenog kapaciteta: 500 µl kolagenog gela razlivano je po otvoru u ploči sa 24 otvora i ostavljano da polimerizuje na 37°C u trajanju od 1h. Čelije su potom zasejavane preko kolagenog gela u koncentraciji od 4×10^4 u 100 µl medijuma i inkubirane 24h na 20% O₂ ili 3% O₂, 5% CO₂ i 100% vlažnosti, na temperaturi 37°C, u odsustvu ili prisustvu 100 ng/ml IL-17. Formiranje tubula je analizirano i dokumentovano na svetlosnom mikroskopu.

3.5.4. Test apoptoze ćelija

Za određivanje apoptoze ćelija, EA.hy 926 ćelije su nakon obeležavanja sa Annexin V (Ann V)-FITC-om i Propidijum-jodidom (PI) (Beckman Coulter International SA, Nyon, Švajcarska) analizirane pomoću protočne citometrije. Za ovaj test, 10^5 ćelija je zasejavano po otvoru u ploče sa šest otvora i ostavljeno da adherira za plastiku preko noći. Narednog dana, ćelijama je dodavano 100 ng/ml IL-17. Nakon 48h inkubacije u prisustvu 20% O₂ ili 3% O₂ ćelije su odlepljivane pomoću 1mM EDTA, ispirane hladnim PBS-om sa dodatkom 0.5% BSA, i alikvotirane u jednake delove od 2×10^5 ćelija, a potom obeležavane Ann V-FITC-om i PI-om prema preporuci proizvođača. Analiza je vršena na protočnom citometru CyFlow CL (Partec, Münster, Nemačka).

3.6. ANALIZA EKSPRESIJE PROTEINA

3.6.1. Analiza ekspresije proteina protočnom citometrijom

UC-MSK između treće i šeste pasaže analizirane su metodom protočne citometrije kako bi se utvrdila ekspresija specifičnih pozitivnih i negativnih proteinskih markera karakterističnih za MSC. Ćelije su odlepljivane 1mM EDTA u PBS-u i ispirane dva puta u PBS-u centrifugiranjem. Potom su ćelije fiksirane 4% formaldehidom u PBS-u u trajanju od 10 minuta na 37°C, i hlađenjem na ledu tokom 1 minuta. Sledilo je ispiranje ćelija PBS-om kako bi se odstranio formaldehid. Za obeležavanje endogenih proteinskih markera ćelije su permeabilizovane inkubacijom u 90% metanolu, na ledu u trajanju od 30 minuta. Za obeležavanje antitelima korišćen je isti protokol za permeabilizovane i nepermeabilizovane ćelije. Alikvoti ćelija (oko 200 000 ćelija po antitelu) ispirani su dva puta u puferu za inkubaciju (IP) koji se sastojao od 0.5% govedeg serum albumina (BSA, *Bovine serum albumine*) u PBS-u, nakon čega je svaki ćelijski alikvot resuspendovan u 100 µl inkubacionog pufera u kome je izvršeno i blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela u trajanju od 10 minuta na sobnoj temperaturi. Potom su ćelijskim suspenzijama dodavana primarna antitela, konjugovana ili nekonjugovana sa specifičnim fluorescentnim markerima (**Tabela 3**). Da bi se

utvrdilo nespecifično vezivanje, ćelije su obeležene i izotipskim kontrolnim antitelima (**Tabela 3**). Ćelije su inkubirane sa antitelima 1h na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, višak antitela ispiran je dva puta inkubacionim puferom. Ćelijama koje su obeležene primarnim nekonjugovanim antitelima, dodavana su sekundarna antitela obeležena fluorohromama. Usledila je inkubacija u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga, ćelije su još dva puta ispirane inkubacionim puferom i na kraju resuspendovane u 1 ml PBS-a i analizirane na protočnom citometru CyFlow CL (Partec, Münster, Nemačka).

3.6.2. Imunocitohemijske metode detekcije proteina

Za detekciju IL-17R, α SMA, vWf i CD31 proteina, prema eksperimentalnom dizajnu, primenjeno je imunofluorescentno obeležavanje. Ćelije su kultivisane na okruglim staklenim ljusticama (50 000 ćelija po ljustici) u odgovarajućem medijumu preko noći, kako bi adherirale za podlogu. Nakon ispiranja u PBS-u, ćelije su fiksirane pomoću 4% formaldehida u PBS-u. Potom je nespecifično vezivanje proteina blokirano inkubacijom ćelija u 3% BSA u PBS-u, u trajanju od 30 minuta. Ćelije su zatim inkubirane sa odgovarajućim antitelom (**Tabela 1**) 1h na sobnoj temperaturi, a potom i sa komplementarnim sekundarnim antitelom (**Tabela 2**) i 1 μ g/ml DAPI (Sigma-Aldrich), takođe u trajanju od 1h. Ćelije su na kraju ispirane PBS-om i vodom i montirane u DPX medijumu na mikroskopske pločice. Ovako pripremljeni uzorci analizirani su na fluorescentnom mikroskopu.

U cilju potvrde miogene diferencijacije, analizirano je prisustvo MyHC u ćelijama. Nakon kultivisanja u specifičnom indukcionom medijumu, ćelije su fiksirane ledenim rastvorom metanola, a nespecifično vezivanje proteina blokirano je inkubacijom ćelija u 3% BSA u PBS-u u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Ćelije su zatim inkubirane 1h na sobnoj temperaturi sa primarnim antitelom na MyHC, α -MF-20. Nakon toga usledila je inkubacija ćelija sa sekundarnim anti-mišjim antitelom konjugovanim sa peroksidazom rena u trajanju od 1h na sobnoj temperaturi, a zatim inkubacija sa razvijanjem, 0.6 mg/ml di-amino-benzidinom (DAB, Sigma-Aldrich) i

0.1% H₂O₂ u PBS-u. Prisustvo vezane peroksidaze analizirano je na svetlosnom mikroskopu.

3.6.3. Western blot analiza ekspresije proteina

Izolacija proteina. Nakon odgovarajućih eksperimentalnih inkubacija ukupni ćelijski proteini izolovani su primenom pufera za liziranje ćelija koji se sastojao od: 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% TritonX-100, 2 mM EDTA i 50 mM NaF u PBS-u. Neposredno pre početka liziranja ćelija, puferu za liziranje dodavani su inhibitori proteaza: 1 mM PMSF, 1 mM Na-ortovanadat, 10 mM EACA i 10 µl koktela inhibitora (Fermentas, Glen Burnie, MD, SAD) po ml pufera. Ćelije su lizirane sa 200 µl pufera za liziranje po otvoru ploče sa šest otvora, inkubacijom na ledu, na rotacionoj mešalici u trajanju od 30 minuta. Lizati su čuvani na -20°C do upotrebe. Koncentracija proteina u svakom uzorku određivana je upotrebom komercijalnog BCA testa (Pierce, Rockford, IL, SAD).

Elektroforeza i elektrotransfer. Uzorcima proteina iz ćelijskih lizata dodavan je redukcionu pufer za uzorke sledećeg sastava: 0,2 M Tris, pH 6,8, 4% SDS, 40% glicerol, 400 mM 2-merkaptetanol i 0,02% bromfenol plavo sa kojim su uzorci kuvani u ključaloj vodi 5 minuta. Ovako pripremljeni uzorci proteina nanošeni su na 10% akrilamidni gel debljine 1.5 mm i razdvajani SDS-PAGE elektroforezom, pri konstantnoj struji od 150 mA tokom 2h. Nakon toga, razdvojeni proteini su elektrotransferom na 110 mA tokom 1h i 30 minuta prenošeni na nitroceluloznu membranu (Applichem).

Imunoblot. Nespecifično vezivanje proteina za membranu blokirano je inkubacijom sa 4% BSA u 0.5% Tween-20 u TBS-u (TTBS) tokom 1h. Zatim je membrana inkubirana sa primarnim antitelom u 1% BSA u TTBS-u na sobnoj temperaturi, na rotacionom šejkeru u trajanju od 1h. Membrane su potom ispirane u TTBS-u, a zatim inkubirane sa sekundarnim antitelom konjugovanim sa HRP sat vremena na sobnoj temperaturi ili preko noći na 4°C. Membrane su ponovo ispirane u TTBS-u tri puta po 10 minuta. Na kraju, membrane su ispirane u TBS-u u trajanju od 5 minuta.

Detekcija proteina. Proteini obeleženi antitelima vizuelizovani su na autoradiografskom filmu (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska) nakon inkubacije membrane sa sistemom reagenasa za pojačanu hemiluminiscencu (ECL, *Enhanced chemiluminescence reagent system*, Applichem). Intenzitet proteinskih traka kvantifikovan je denzitometrijski, primenom ImageJ programa (National Institute for Health, SAD).

3.7. ANALIZA EKSPRESIJE GENA

3.7.1. Analiza genske ekspresije pomoću reakcije reverzne transkripcije i lančane reakcije polimeraze (RT-PCR, *Reverse transcription-polymerase chain reaction*)

Izolacija RNK. U svrhu određivanja ćelijski specifične genske ekspresije i mehanizama koji regulišu gensku ekspresiju iz ćelija je izolovana intaktna RNK, na osnovu koje je potom dobijena komplementarna DNK (cDNK).

Ćelije su kultivisane u pločama sa šest otvora i tretirane prema eksperimentalnom dizajnu. Nakon inkubacije tokom koje su ćelije dostigle konfluentnost, odstranjivan je medijum iz svakog otvora. Po 1 ml TRIZOL reagensa (Invitrogen) dodavan je u svaki otvor, gde su ćelije direktno lizirane propuštanjem kroz pipetu. Homogenizovani uzorci prebacivani su u epruvete od 1.5 ml i inkubirani 5 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se omogućila potpuna disocijacija nukleoproteinskog kompleksa. Potom je svakom uzorku dodavano 0.2 ml hloroforma. Epruvete su snažno mućkane 15 sekundi a potom inkubirane 2-3 minuta na sobnoj temperaturi. Uzorci su potom centrifugirani na 12000 g, na temperaturi od 4°C u trajanju od 15 minuta. Homogenat se nakon centrifugiranja razdvajao u tri faze: donju, crvenu fenol-hloroform fazu koja sadrži proteine, belu interfazu u kojoj se nalazi DNK i gornju vodenu fazu koja sadrži RNK. Vodena faza je pažljivo prebacivana u novu epruvetu. Svakom uzorku RNK dodavano je po 0.5 ml 100% izopropanola a potom su inkubirani na sobnoj temperaturi i centrifugirani na 12000 g, na temperaturi od 4°C u trajanju od 10 minuta. Nakon centrifugiranja, RNK se mogla videti u vidu belog taloga na dnu epruvete. Supernatant je odlivan, a RNK talog je ispiran sa 1 ml 75% etanola.

Uzorak je kratko promešan a potom centrifugiran na 7500 g na temperaturi od 4°C u trajanju od 5 minuta. Nakon odlivanja supernatanta, RNK talog je sušen na vazduhu i rastvaran u vodi bez nukleaza. Nakon određivanja koncentracije RNK pomoću spektrofotometra, uzorci su čuvani na -70°C do upotrebe.

Reverzna transkripcija i dobijanje komplementarne DNK. Ukupna RNK korišćena je za dobijanje cDNK i to na osnovu oligo dT prajmera koji omogućava reverznu transkripciju samo iRNK. Reverzna transkripcija vršena je prema uputstvu proizvođača kompleta za reverznu transkripciju (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA, Fermentas). Ukratko: 2 µg RNK, 1 µl oligo dT prajmera i vode bez nukleaza do ukupne zapremine od 12.5 µl inkubirani su na 65°C u trajanju od 5 minuta a potom im je dodavan osnovni miks koji se sastojao od: RevertAid reverzne transkriptaze, smeše nukleotida (dNTP miks) i inhibitora ribonukleaze u puferu za reverznu transkripciju. Ovakva smeša zapremine 20 µl inkubirana je 60 minuta na 42°C a zatim 10 min na 70°C u termobloku aparata Mastercycler personal (Eppendorf, Nemačka). Koncentracija cDNK određivana je pomoću spektrofotometra.

Reakcija lančanog umnožavanja. PCR produkti su dobijeni amplifikacijom 200 ng cDNK upotrebom odgovarajućih prajmera i osnovnog miksa koji se sastojao od: 2 puta koncentrovanog pufera za PCR sa solima Mg, smeše nukleotida (dNTP, 500 µM) i Taq DNK polimeraze (50 U/ml) (Fermentas). Amplifikacija cDNK se odvijala po sledećem osnovnom PCR programu:

5 min na temperaturi od 94°C

30 ciklusa: 45 sec na temperaturi od 94°C

30 sec na temperaturi od 52°C

1.5 min na temperaturi od 72°C

10 min na 72°C

Sekvence prajmera i temperatura za vezivanje specifična za svaki prajmer prikazane su u **Tabeli 5**. GAPDH i β-aktin su amplifikovani kao kontrola količine cDNK u svakom uzorku.

PCR produkti razdvajani su elektroforezom na agaroznom gelu (1.5%) sa 0.01% etidijum-bromida (Invitrogen) u TAE puferu i vizuelizovani osvetljavanjem gela UV svetlošću. Relativna ekspresija iRNK za specifične gene određivana je kao odnos optičkih gustina traka pomoću ImageJ programa.

TABELA 5. Prajmeri primenjeni u eksperimentima (*Fw-forward prajmer; Rev-Reverse prajmer; bp-bazni par*).

PRAJMERI			
Gen	Sekvenca	Veličina PCR produkta	Temperatura vezivanja prajmera
mišji IL-17R	Fw: GGTGGAGAGCAACTCCAAAA	200 bp	52°C
	Rev: AAACAACGTAGGTGCCGAAG		
mišji Miogenin	Fw: TTTCTACCAGGAGCCCCACTT	707 bp	52°C
	Rev: TGATGGCTTTTGACACCAAC		
mišji Cox-2	Fw: CCTGCTGCCCGACACCTTCA	540 bp	52°C
	Rev: CAGATGAGAGACTGAATTGAGGCAG		
humani eNOS	Fw: GTGATGGCGAAGCGAGTGAA	422 bp	55°C
	Rev: CCGAGCCCGAACACACAGAA		
humani Cox-2	Fw: CCTTCCTCCTGTGCCTGATG	203 bp	50°C
	Rev: CTGGCCCTCGCTTATGATCT		
h/m β -Aktin	R&D Systems	302 bp	55°C
h/m GAPDH	Fw: ACCACAGTCCATGCCATCAC	452 bp	52°C
	Rev: TCCACCACCTGTTGCTGTA		

3.7.2. Analiza genske ekspresije pomoću prolazne transfekcije ćelija i merenja transaktivacije genskih reportera

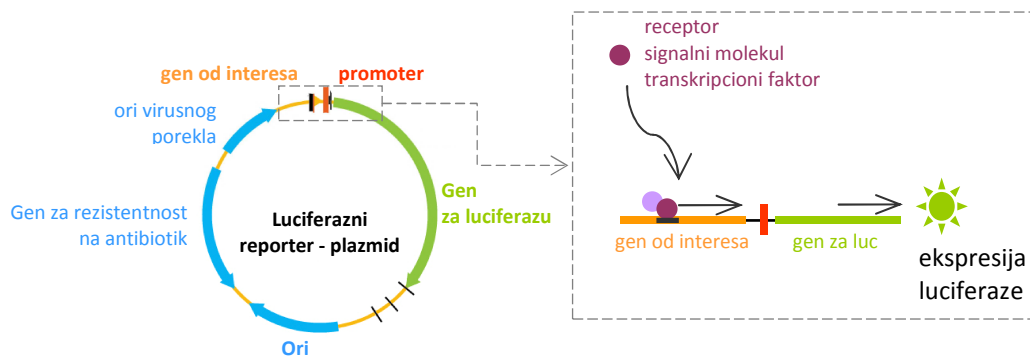
3.7.2.1. Umnožavanje i prečišćavanje plazmida

Dobijanje *Escherichia coli* bakterija pogodnih za transformaciju. *E.coli* pogodne za transformaciju dobijene su prema protokolu Chung i sar. (1989). Ukratko, bakterije soja *E. coli* gajene su u Luria-Bertani (LB) medijumu (Torlak, Beograd, Srbija) preko noći, nakon čega su centrifugirane na 1000 g, na 4°C u trajanju od 20 min, a potom resuspendovane u odnosu 1:10 u ledenom rastvoru za transformaciju i čuvanje (TSS, *transformation and storage solution*) koji se sastojao od 10% polietilen glikola (PEG), 5% DMSO i 50 mM Mg^{2+} ($MgCl_2$) u LB medijumu, pH 6.5. Ovako su dobijene *E. coli* pogodne za transfekciju koje su potom skladištene u TSS-u na -70°C do transformacije.

Transformacija bakterija i prečišćavanje plazmida. Plazmidi resuspendovani u TE puferu (10 mM Tris, pH 7.5 i 1 mM EDTA, pH 8.0 u destilovanoj vodi) dodavani su bakterijama soja *E. coli* pogodnim za transfekciju u LB medijumu koje su potom inkubirane na 4°C u trajanju od 30 min, što je omogućilo usvajanje plazmida. Nakon dodavanja LB medijuma, bakterije su inkubirane 1h na sobnoj temperaturi na rotacionoj mešalici, kako bi došlo do ekspresije gena za rezistenciju na antibiotik. Bakterije su potom zasejane na 1% agar u LB medijumu sa 100 µg/ml ampicilina (PAA Laboratories) i inkubirane preko noći na 37°C. Po jedna nastala kolonija prenošena je nastavkom za pipetu u 3 ml LB medijuma sa 100 µg/ml ampicilina i inkubirana na 37°C na rotacionoj mešalici do zamućenja medijuma, odnosno do umnožavanja bakterija. Plazmidi su prečišćeni iz bakterijskih kultura pomoću komercijalnih Miniprep ili Midiprep kompleta (Promega, Madison, WI, SAD) prema uputstvu proizvođača.

3.7.2.2. Plazmidi

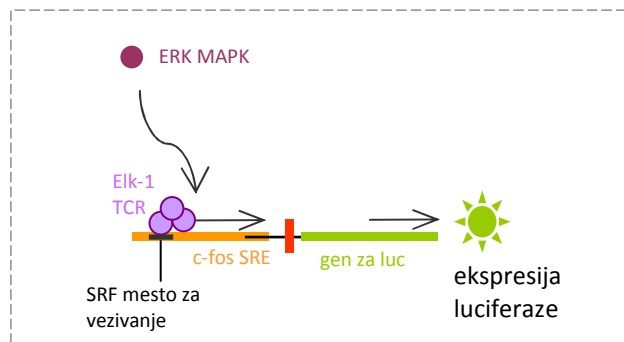
Plazmidi koji se koriste kao vektori za kloniranje najčešće su plazmidi bakterije *E. coli* modifikovani tako da najbolje zadovolje najrazličitije eksperimentalne potrebe (Slika 14).



SLIKA 14. Shematski prikaz Luciferaznog reporter - plazmida. Plazmidni vektori primenjeni za prolaznu transfekciju sisarskih ćelija u ovoj studiji konstruisani su tako da sadrže mesto početka replikacije (*ori*, origin of replication) iz virusa koji može da inficira sisarske ćelije, mesto početka replikacije koje omogućava replikaciju plazmidne DNK u ćeliji domaćinu (*Ori*), jak promoter i uz njega DNK koja kodira za protein čija se ekspresija prati u sisarskoj ćeliji. U slučaju reporter plazmida transkripcija gena koji se istražuje dešava se samo u prisustvu specifičnih signalnih molekula, transkripcionih faktora ili receptora, tako da oni zapravo omogućavaju analizu prethodnika aktivacije genske transkripcije. Kada dođe do aktivacije gena od interesa pokreće se transkripcija reporter gena, tj. Luciferaze. Svi reporter plazmidi korišćeni tokom izrade ove studije, sadrže gen za luciferazu svica *Photinus pyralis*. Luciferaza je visoko senzitivni enzimatski reporter koji se može analizirati bilo kojim standardnim metodama za detekciju luciferaze, omogućavajući kvantifikaciju stepena indukcije signalnog puta. Takođe, svi primenjeni vektori sadrže gen za rezistenciju na ampicilin koji omogućava propagaciju i selekciju plazmida u *E. coli*.

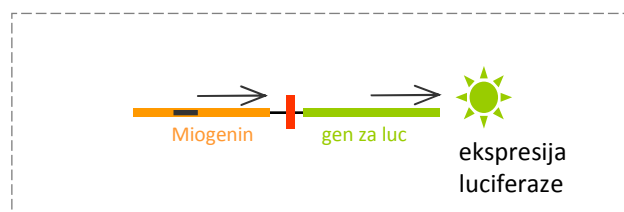
U izradi ove studije korišćeni su sledeći plazmidi:

pSRE-luc reporter plazmid za MAPK/ERK, dizajniran je za praćenje indukcije SRE i MAPK puteva signalne transdukcije (**Slika 15**). pSRE-luc vektor sadži dve kopije c-fos SRE (*Serum Response Element*) koji sadže SRF mesto za vezivanje uzvodno od promotera i gena za luciferazu. Nakon aktivacije ERK MAPK, dolazi do fosforilacije Elk-1 proteina koji se onda zajedno sa TCR i SRF transkripcionim faktorima vezuje za SRF mesto za vezivanje na plazmidnoj DNK, što dovodi do indukcije transkripcije i aktivacije gena reportera, odnosno gena za luciferazu. pSRE-luc plazmid dobijen je ljubaznošću Dr Angel Corbí (Centro de Investigaciones Biologicas, Madrid, Španija).



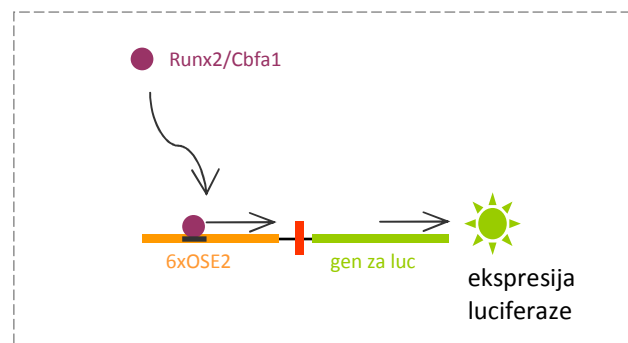
SLIKA 15. Shematski prikaz aktivacije pSRE-luc plazmida.

G133-luc, plazmid-reporter za miogenin, konstruisan je u svrhu ispitivanja signalnih puteva uključenih u miogenu diferencijaciju, a koristi se za praćenje ekspresije gena za miogenin (**Slika 16**). Osnovu konstrukta čini pXP2 vektor u koga je ugrađen promoterski region za miogenin sa specifičnim mestima za vezivanje, povezan sa genom za luciferazu (*Xu i Wu, 2000*). Aktivacija gena za miogenin istovremeno aktivira gen za luciferazu, čime je omogućena kvantifikacija genske ekspresije. G133-luc plazmid dobijen je ljubaznošću Dr Zhenguo Wu (Hong Kong University of Science & Technology, Hong Kong, Kina).



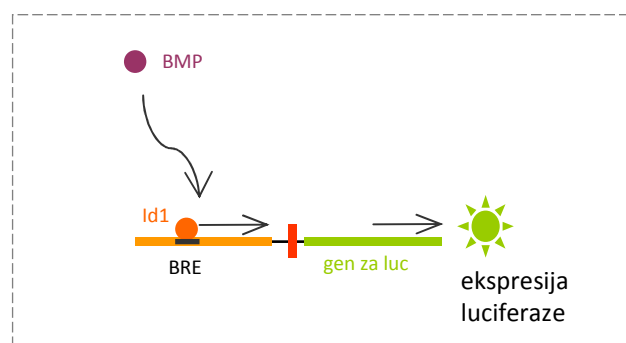
SLIKA 16. Shematski prikaz aktivacije G133-luc plazmida.

p6OSE2-luc, reporter plazmid za Runx2/Cbfa1 sadrži šest OSE2 (*osteoblast-specific cis-acting element*) elemenata praćenih genom za luciferazu (*Geoffroy i sar., 1995*) (**Slika 17**). Runx2/Cbfa1 je transkripcioni faktor koji pripada Runt porodici transkripcionih faktora koji se vezuju za OSE2 i tako aktiviraju ekspresiju osteokalcina, gena specifičnog za osteoblaste (*Cui i sar., 2003*). p6OSE2-luc plazmid dobijen je ljubaznošću Dr Gerard Karsenty (Columbia University Medical Center, New York, SAD).



SLIKA 17. Shematski prikaz aktivacije p6OSE2-luc plazmida.

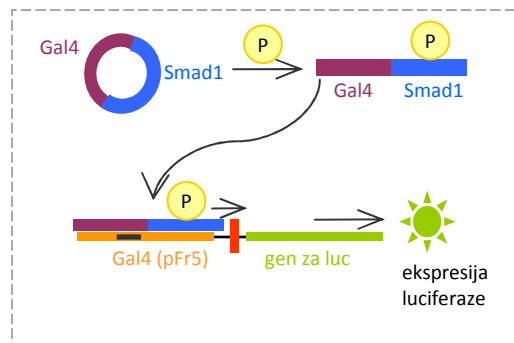
pBRE-luc, reporter za BMP-Smad signalni put, sadrži BRE mesto za vezivanje Id1 transkripcionog faktora aktiviranog od strane BMP, vezanog za gen za luciferazu u pGL3 vektoru (*Korchynskyi i ten Dijke, 2002*) (**Slika 18**). pBRE-luc plazmid dobijen je ljubaznošću Dr Peter ten Dijke (Leiden University Medical Center, Leiden, Holandija).



SLIKA 18. Shematski prikaz aktivacije pBRE-luc plazmida.

Gal4-Smad1 plazmid kodira za Smad1 (*Nakayama i sar., 2003*) (**Slika 19**). Ekspresioni plazmid za Gal4-Smad1 fuzionisani protein, koji sadrži cDNA za Smad1 nishodno od sekvence koja kodira za Gal4 domen za vezivanje za DNK, koji je istovremeno

aktivator transkripcije. Čelije su ko-transfektovane ovim plazmidom i Gal4-luc reporter plazmidom **pFr5-Luc** (Stratagene, La Jolla, CA). Aktivacija gena za Smad1 omogućava vezivanje Gal4 domena za Gal4-luc reporter-plazmid, te aktivaciju gena za luciferazu. Gal4-Smad1 plazmid dobijen je ljubaznošću Dr Konosuke Nakayama (University of Tokyo School of Medicine, Tokio, Japan).



SLIKA 19. Shematski prikaz aktivacije Gal4-Smad1/pFr5-luc plazmida.

pECE/HA MAPKK S218D/S222D, MEK1 konstrukt obeležen hemaglutininom (HA) je konstitutivno aktivni mutant sa regulatornim mestom za fosforilaciju sisarske MAP kinaze kinaze (MEK1) (*Pages i sar., 1994*). Plazmid je dobijen ljubaznošću Dr Jacques Pouyssegur (University of Nice-Sophia Antipolis, Francuska).

Q207D sadrži konstitutivno aktivan ALK2 gen kloniran u pCMV5 vektor (*Craft i sar., 2007*), dok **K233R** sadrži gen za neaktivnu formu (*kinase dead*) ALK2 gena kloniran u pCMV5 vektor. Oba plazmida dobijena su ljubaznošću Dr Calvin Vary (Northwestern University, Chicago, SAD).

SV40-β-Galaktozidaza (SV40-β-Gal) kontrolni vektor korišćen je kao pozitivna kontrola za efikasnost transfekcije. SV40-β-Gal sadrži bakterijski lacZ gen, koji se konstitutivno eksprimira u ćelijama i čijom transkripcijom i translacijom nastaje enzim β-galaktozidaza. β-galaktozidaza je odličan reporter enzim jer se njegova ekspresija može detektovati direktno u ćelijskim lizatima. Lizatima se dodaje supstrat za β-galaktozidazu, i njihovom reakcijom nastaju hemiluminiscentni produkti čija se jačina može očitati na luminometru.

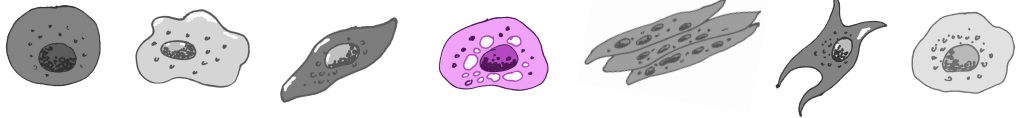
3.7.2.3. Transfekcija C2C12 ćelija

C2C12 ćelije kultivisane su u pločama sa 24 otvora (2×10^5 ćelija po otvoru) u standardnom medijumu. Nakon dostizanja 70% konfluentnosti, ćelije su transfektovane pomoću *Superfect* reagensa za transfekciju (Qiagen, Hilden, Nemačka) sa 500 ng odgovarajućeg plazmida i 25 ng SV40- β -Gal po otvoru, kontrole za efikasnost transfekcije. Šest sati nakon transfekcije, medijum je zamenjen svežim standardnim medijumom i ćelije su inkubirane preko noći. Potom su transfektovane ćelije tretirane u trajanju od 48h, prema eksperimentalnom dizajnu. Ćelije su zatim lizirane i aktivnost luciferaze je merena pomoću reagensa *Luciferase Assay System* (Promega, Adison, WI, SAD) na luminometru Optocomp-P (MGM Instruments, Hamden, SAD). Aktivnost luciferaze normalizovana je u odnosu na paralelnu aktivnost β -galaktozidaze, kako bi se uskladile razlike izazvane razlikom u efikasnosti transfekcije. Merenja β -galactozidaze vršena su primenom reagensa *Galacto-Light Plus System* (Tropix, Bedford, MA, SAD).

3.8. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA

Sva testiranja su ponavljana najmanje tri puta. Rezultati su prikazani u vidu srednjih vrednosti \pm standardna greška (SE). Student-ov t-test korišćen je za poređenje srednjih vrednosti. Statistička značajnost prihvatana je za $p < 0.05$.

4. REZULTATI



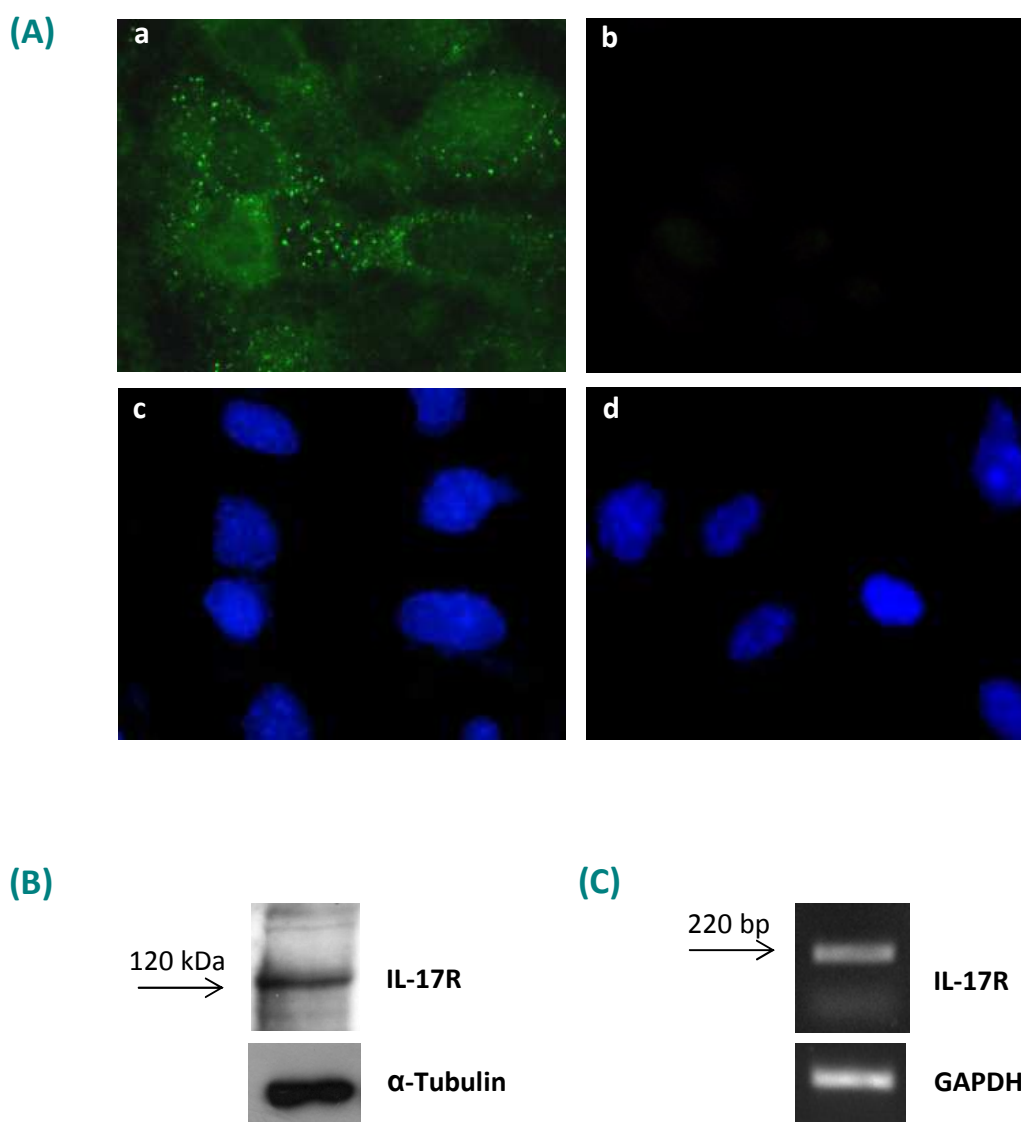
4.1. EFEKTI I MEHANIZMI DELOVANJA IL-17 NA MULTIPOTENTNE MEZENHIMSKE ĆELIJE

4.1.1. Efekat IL-17 na proliferaciju i migraciju C2C12 mezenhimskih ćelija

U svrhu određivanja efekata delovanja IL-17 na multipotentne mezenhimske ćelije C2C12, početno je ispitivano da li ove ćelije eksprimiraju receptor za IL-17. Nakon obeležavanja antitelom na IL-17R, na površini C2C12 ćelija primećene su diskretne fluorescentne tačkaste tvorevine, tipične za membranske receptore (**Slika 20Aa**), koje nisu bile prisutne u ćelijama obeleženim kontrolnim antitelom (**Slika 20Ab**). Ekspresija IL-17R dodatno je potvrđena Western blot metodom (**Slika 20B**), kao i RT-PCR metodom (**Slika 20C**).

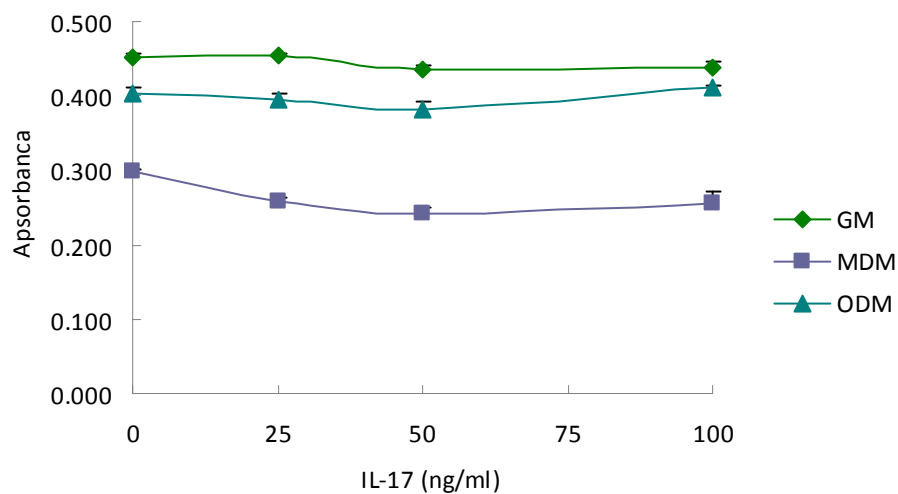
Primenom MTT testa analiziran je uticaj IL-17 na proliferaciju C2C12 ćelija. Rezultati su pokazali da delovanje IL-17 nije izmenilo proliferaciju C2C12 ćelija, nezavisno od toga da li su ćelije kultivisane u standardnom medijumu ili u medijumima za diferencijaciju (**Slika 21A**). Kao što je i očekivano, s obzirom na indukciju diferencijacije, zamena standardnog medijuma diferencijacionim medijumima je sama po sebi izazvala redukciju u proliferaciji ćelija, koja je bila značajnije niža kod ćelija gajenih u miogenom diferencijacionom medijumu.

Migratorna sposobnost C2C12 ćelija je testirana primenom *in vitro Scratch* testa. Ćelije inkubirane u standardnom medijumu pokazale su veći kapacitet za migraciju, budući da su nakon perioda od 24h ove ćelije gotovo potpuno kolonizovale ogrebotinu. Tokom istog vremenskog perioda, IL-17 je dozno zavisno inhibirao migraciju C2C12 ćelija (**Slika 21B**).



SLIKA 20. Ekspresija IL-17R u C2C12 ćelijama. **(A)** *a.* C2C12 ćelije obeležene primarnim antitelom na IL-17R i FITC-konjugovanim anti-zečjim antitelom; *b.* Ćelije obeležene izotipskom kontrolom; *c.* i *d.* Ćelijski nukleusi obeleženi DAPI-jem; Ćelije su slikane na fluorescentnom mikroskopu (uveličanje 400x). **(B)** Ekspresija IL-17R određena Western blot analizom u proteinskim lizatima C2C12 ćelija; α -tubulin je služio kao kontrola. **(C)** Ekspresija gena za IL-17R određena RT-PCR analizom; GAPDH je služio kao kontrola.

(A)

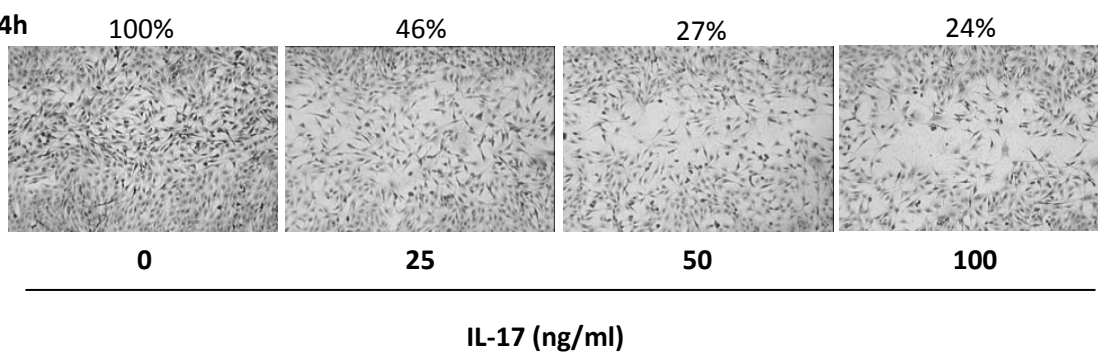


(B)

0h



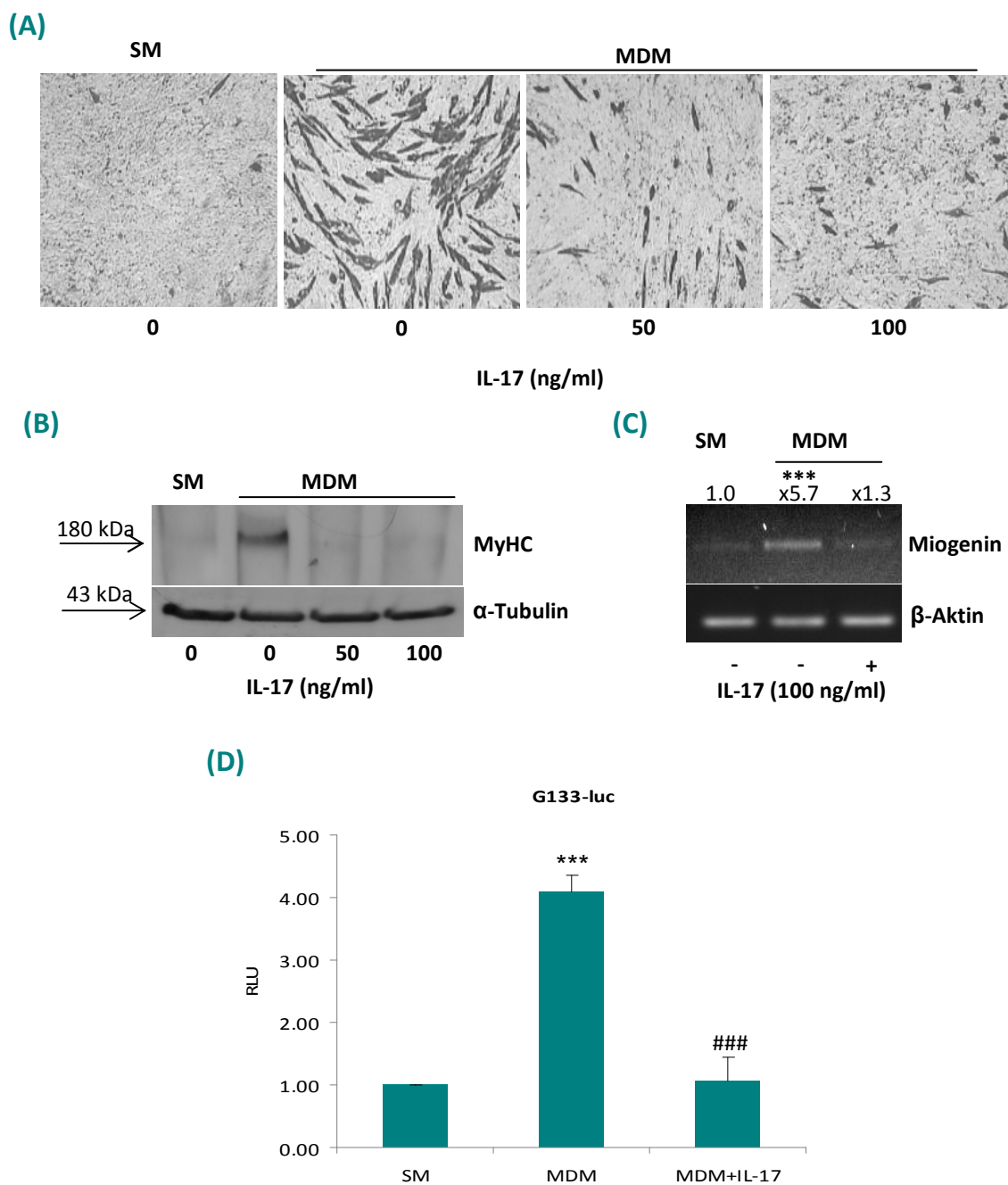
24h



SLIKA 21. Efekat IL-17 na proliferaciju i migraciju C2C12 ćelijske linije. (A) Proliferacija C2C12 ćelija određena MTT testom nakon kultivacije ćelija u standardnom medijumu (SM), miogenom diferencijacionom medijumu (MDM) i osteogenom diferencijacionom medijumu (ODM) u prisustvu 0, 25, 50 i 100 ng/ml IL-17 u trajanju od 48h. (B) Migracija C2C12 ćelija analizirana Scratch testom: nakon što je u konfluentnom monosloju C2C12 ćelija napravljena ogrebotina (0h), ćelije su inkubirane u prisustvu 0, 25, 50 i 100 ng/ml IL-17 u SM-u. Migracija ćelija u polje ogrebotine dokumentovana je nakon 24h. Brojevi iznad fotografija predstavljaju površinu polja ogrebotine pokrivenu migrirajućim ćelijama, izraženu u procentima.

4.1.2. Efekat IL-17 na miogenu diferencijaciju C2C12 mezenhimskih ćelija

Da bi se utvrdilo da li IL-17 utiče na miogenu diferencijaciju C2C12 ćelija, indukovana je njihova diferencijacija kultivacijom u miogenom diferencijacionom medijumu u trajanju od šest dana. Nakon ovog perioda praćeno je formiranje miotuba koje su obeležavane antitelom na MyHC, protein uključen u terminalnu miogenu diferencijaciju (*Asakura i sar., 2001; Wada i sar., 2002; Aziz i sar., 2009*). Kao što je prikazano na **Slici 22A**, broj miotuba pozitivnih na MyHC u prisustvu IL-17 bio je značajno niži, ukazujući na to da IL-17 inhibira miogenu diferencijaciju C2C12 ćelija, i to dozno zavisno. Ovaj rezultat je potvrđen Western blot analizom ekspresije MyHC u ćelijama, budući da je u ćelijama kultivisanim u miogenom diferencijacionom medijumu u prisustvu IL-17, ekspresija MyHC bila smanjena i njen nivo je bio sličan nivou detektovanom u C2C12 ćelijama koje nisu podvrgnute miogenoj diferencijaciji (**Slika 22B**). RT-PCR analizom ekspresije gena za miogenin, transkripcioni faktor neophodan za miogenu diferencijaciju (*Asakura i sar., 2001; Wada i sar., 2002; Aziz i sar., 2009*), pokazano je da je i ekspresija iRNK za miogenin značajno opala u C2C12 ćelijama kultivisanim u miogenom diferencijacionom medijumu u prisustvu IL-17, dostižući nivo blizak onome određenom u ćelijama kultivisanim u standardnom medijumu pre indukcije diferencijacije (**Slika 22C**). Dodatna potvrda da IL-17 inhibira miogenu diferencijaciju dobijena je nakon transfekcije C2C12 ćelija reporter plazmidom za miogenin (G133-luc), jer je pokazano da dodavanje IL-17 u medijum značajno inhibira transaktivaciju promotera za miogenin (**Slika 22D**).

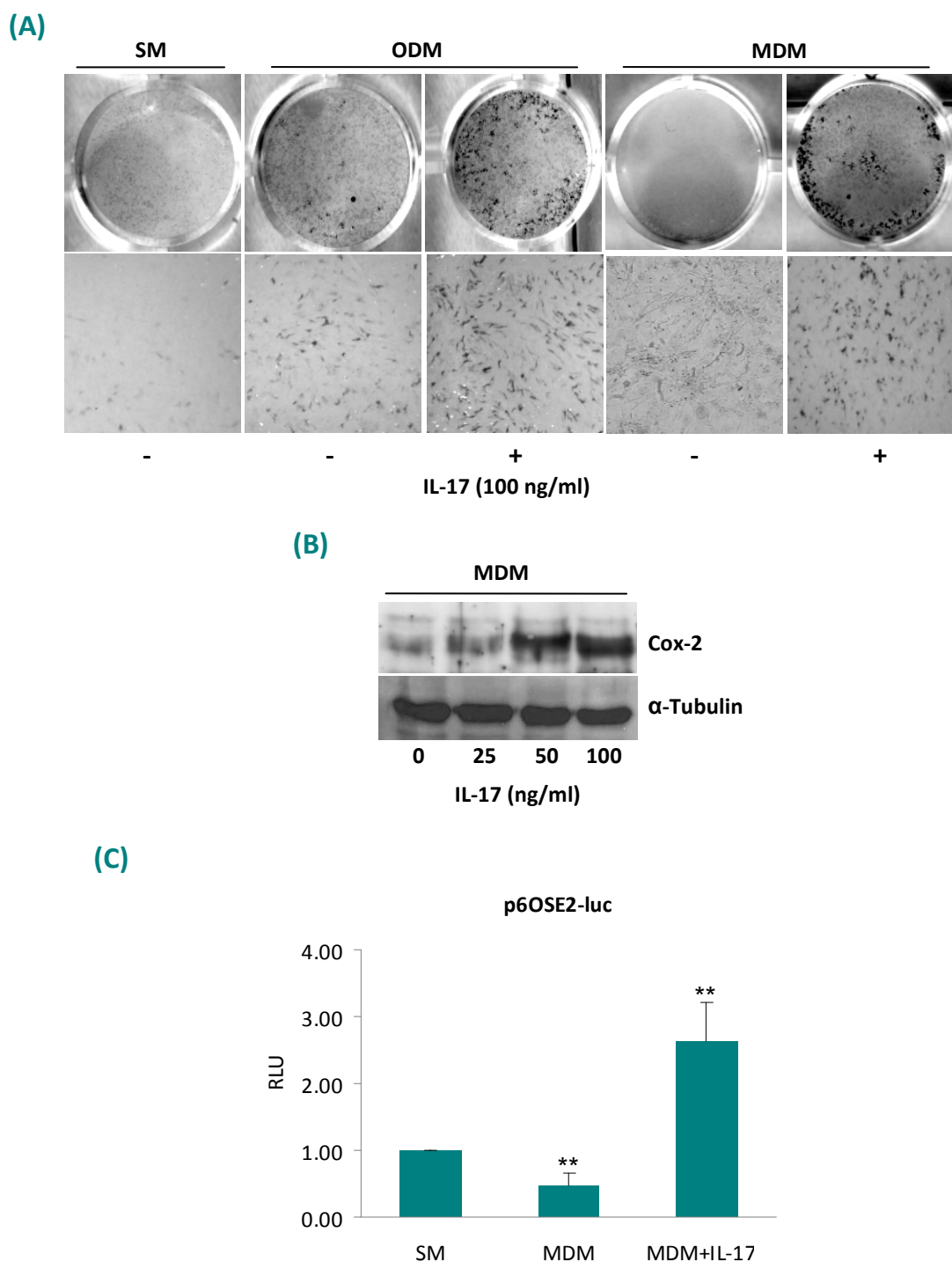


SLIKA 22. Efekat IL-17 na miogenu diferencijaciju C2C12 mezenhimskih ćelija. Ekspresija MyHC u C2C12 ćelijama kultivisanim u SM-u i MDM-u, u prisustvu različitih koncentracija IL-17 određena (A) imunocitohemijski (tamno obojene ćelije) i (B) Western blot analizom; α -tubulin je služio kao kontrola za nanošenje uzoraka na gel. (C) Ekspresija gena za miogenin određena RT-PCR metodom u ćelijama kultivisanim u SM-u ili MDM-u u odsustvu ili prisustvu 100 ng/ml IL-17; β -aktin je služio kao kontrola. Brojevi iznad slike odnose se na vrednosti denzitometrijski kvantifikovanih PCR traka, i izražene su u odnosu na netretirane ćelije, kojima je dodeljena vrednost 1. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (SM): *** $p < 0.001$. (D) Transaktivacija G133-luc reportera za miogenin u prolazno transfektovanim C2C12 ćelijama kultivisanim u SM-u ili MDM-u sa ili bez IL-17 (100 ng/ml). Vrednosti su normalizovane u odnosu na one dobijene kod ćelija inkubiranih u SM-u; RLU, relative luciferase units. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (SM): *** $p < 0.001$; u odnosu na MDM: ### $p < 0.001$.

4.1.3. Efekat IL-17 na osteogenu diferencijaciju C2C12 mezenhimskih ćelija

S obzirom na to da je IL-17 inhibirao diferencijaciju C2C12 ćelija u miotube, naš sledeći cilj bio je da utvrdimo uticaj ovog citokina na usmeravanje diferencijacije ćelija u pravcu drugih ćelijskih loza. Uzimajući u obzir skoro objavljene rezultate koji su pokazali da IL-17 indukuje osteogenu diferencijaciju MSC, analizirali smo efekat IL-17 na osteogenu diferencijaciju ćelijske linije C2C12. Ćelije su kultivisane u osteogenom diferencijacionom medijumu, sa ili bez IL-17, i nakon 6 dana određivana je aktivnost alkalne fosfataze. Kao što je prikazano na **Slici 23A**, osteogena diferencijacija indukovana kultivacijom ćelija u osteogenom diferencijacionom medijumu dodatno je bila stimulisana u prisustvu IL-17. Daljim eksperimentima nastojali smo da utvrdimo u kojoj meri uticaj IL-17 na osteogenu diferencijaciju zavisi od osteogenih faktora prisutnih u osteogenom diferencijacionom medijumu. U tu svrhu, C2C12 ćelije su kultivisane u miogenom diferencijacionom medijumu, budući da je ovaj medijum kao dodatak sadržao samo 2% konjskog seruma, te je bio lišen bilo kojih drugih faktora za indukciju diferencijacije, uključujući i osteogene. Nakon šest dana kultivacije u ovakvim uslovima, ćelije gajene u odsustvu IL-17 bile su potpuno negativne na ALP i unjima je uočeno prisustvo miotuba. Međutim, u prisustvu IL-17, uočene su kolonije pozitivne na ALP, bez vidljivih miotuba (**Slika 23A**). Prisustvo ovog ranog fenotipskog markera za osteogenu diferencijaciju ukazalo je da efekat IL-17 na osteogenu opredeljenost C2C12 ćelija ne zavisi od primenjenog diferencijacionog medijuma.

Dodatno je analizirana i ekspresija Cox-2, proteina uključenog u osteogenu diferencijaciju (*Li i sar., 2011*), u C2C12 ćelijama kultivisanim u miogenom diferencijacionom medijumu. Uočeno je dozno-zavisno povećanje ekspresije Cox-2 nakon tretmana IL-17, što je potvrdilo stimulatorni efekat IL-17 na osteogenu diferencijaciju (**Slika 23B**). Pored toga, C2C12 ćelije transfektovane su reporterom za Runx2/Cbfa1 (p6OSE2-luc), esencijalni transkripcioni faktor u osteogenoj diferencijaciji (*Lian i Stein, 2003*). Primećeno je značajno povećanje u transaktivaciji Runx2/Cbfa1 reportera u transfektovanim ćelijama kultivisanim u prisustvu IL-17 (**Slika 23C**).



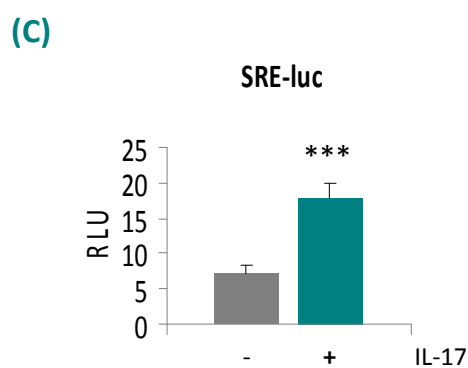
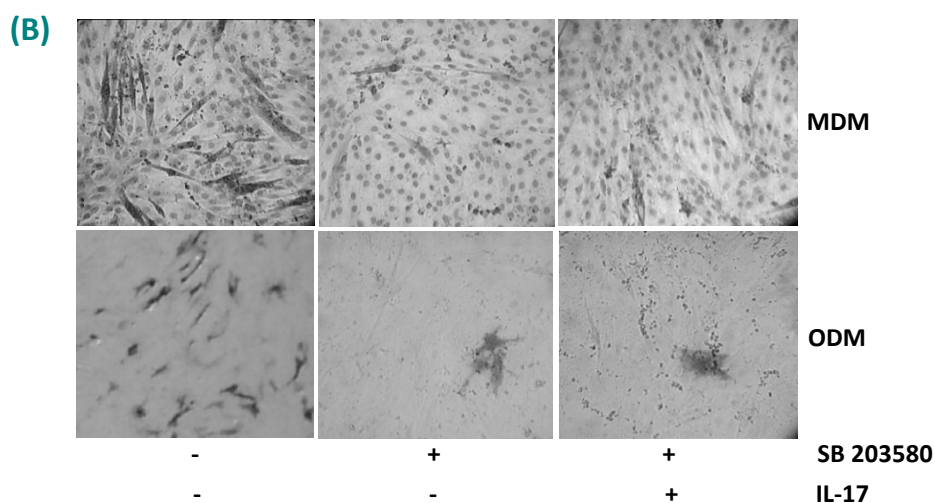
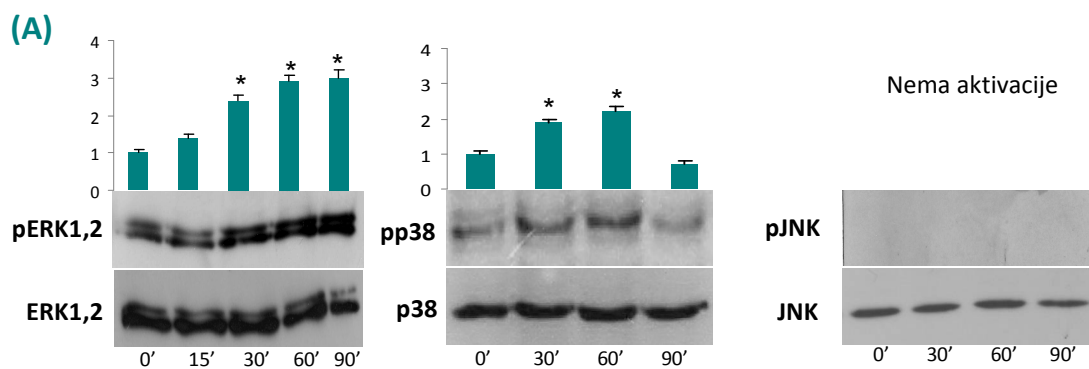
SLIKA 23. Efekat IL-17 na osteogenu diferencijaciju C2C12 mezenhimskih ćelija. **(A)** Aktivnost alkalne fosfataze u C2C12 ćelijama kultivisanim u SM-u, ODM-u i MDM-u, u odsustvu ili prisustvu 100 ng/ml IL-17. **(B)** Ekspresija Cox-2 u ćelijama kultivisanim u MDM-u sa 0, 25, 50 i 100 ng/ml IL-17; α -tubulin je služio kao kontrola. **(C)** Transaktivacija p6OSE2-luc reportera za Runx2/Cbfa1 nakon kultivacije ćelija u SM-u i MDM-u sa ili bez IL-17 (100 ng/ml). Vrednosti su normalizovane u odnosu na vrednosti dobijene u kontrolnim ćelijama (SM); RLU, relative luciferase units. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (SM): ** $p < 0.01$.

4.1.4. Unutarćelijska signalizacija IL-17 u C2C12 ćelijama

Naredni cilj bio je ispitivanje signalnih puteva koje IL-17 aktivira u C2C12 ćelijama. Da bismo utvrdili da li IL-17 aktivira MAPK, ćelijama kultivisanim u medijumu bez dodatka FBS-a, dodavano je 100 ng/ml IL-17 u različitim vremenskim intervalima. Nakon kultivacije analizirana je ekspresija aktivnih, fosforilisanih formi p38, JNK i ERK1,2 MAPK u ćelijskim lizatima. Rezultati prikazani na **Slici 24A** pokazuju značajno povećanu fosforilaciju ERK1,2 MAPK u ćelijama inkubiranim sa IL-17 u trajanju od 30 minuta i duže. Takođe je primećena povišena ekspresija fosforilisanog p38, sa najvišom aktivacijom 30 i 60 minuta nakon dodavanja IL-17. Suprotno tome, ekspresija fosforilisane forme JNK nije primećena ni kod netretiranih niti kod IL-17 tretiranih C2C12 ćelija.

Kako bi se ispitalo učešće MAPK signalnih puteva u IL-17 indukovanoj opredeljenosti C2C12 ćelija za diferencijaciju, C2C12 ćelije su pre-inkubirane sa specifičnim farmakološkim inhibitorima za p38 i MEK1,2-ERK1,2 signalne puteve, a potom je ćelijama dodavan IL-17 u miogenom i osteogenom diferencijacionom medijumu. Primena specifičnog inhibitora za p38, SB203580, bilo samog ili u kombinaciji sa IL-17, blokirala je kako miogenu tako i osteogenu diferencijaciju C2C12 ćelija (**Slika 24B**), ukazujući da je p38 osnovni regulatorni molekul koji učestvuje u diferencijaciji C2C12 ćelija u obe mezenhimske linije, bez obzira na prisustvo IL-17. Zbog toga su dalji eksperimenti bili usmereni na istraživanje ERK1,2 MAPK signalnog puta.

Da bi smo potvrdili stimulatorni efekat IL-17 na fosforilaciju ERK1,2 MAPK, C2C12 ćelije su transfektovane reporter plazmidom za MEK1,2 MAPK (pSRE-luc). Ćelije su potom inkubirane sa IL-17 u trajanju od 48h, nakon čega je transaktivacija reportera merena luminometrijski. Saglasno sa povišenom fosforilacijom ERK1,2 MAPK, IL-17 je značajno pojačao i transaktivaciju MAPK reportera (**Slika 24C**).



SLIKA 24. Unutarćelijska signalizacija aktivirana IL-17 u C2C12 ćelijama. **(A)** Aktivacija ERK1,2, p38 i JNK MAPK u C2C12 ćelijama kultivisanim u medijumu bez seruma sa 100 ng/ml IL-17 tokom naznačenih vremenskih intervala, određena Western blot analizom. Grafici prikazuju promene u aktivaciji ERK1,2 i p38 (normalizovane za kontrolu za svako pojedinačno vreme) kao i srednje vrednosti \pm SE. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (0'): * $p < 0.05$. **(B)** Ekspresija MyHC i aktivnost ALP u C2C12 ćelijama kultivisanim u MDM-u ili ODM-u, u odsustvu ili prisustvu inhibitora za p38 MAPK, SB203580 (10 μ M) i IL-17 (100 ng/ml). **(C)** Transaktivacija MAPK/ERK reportera (SRE-luc) u prolazno transfektovanim C2C12 ćelijama u prisustvu 100 ng/ml IL-17; RLU, relative luciferase units. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu: *** $p < 0.001$.

4.1.5. Učešće ERK1,2 signalnog puta u IL-17-indukovanoj inhibiciji miogeneze i u IL-17-indukovanoj stimulaciji osteogeneze

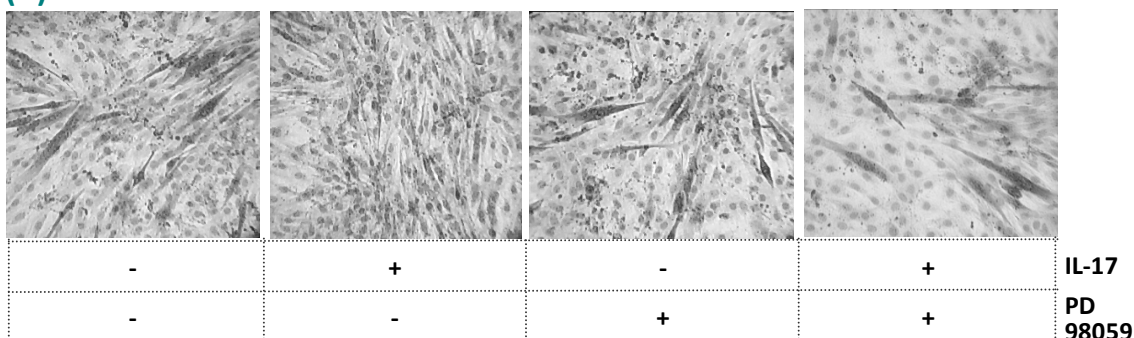
Za dalju analizu učešća ERK1,2 u IL-17-indukovanoj inhibiciji miogene diferencijacije C2C12 ćelija, korišćen je inhibitor za MEK1,2 (PD98059). Kao što je prikazano na **Slici 25A**, kultivacija C2C12 ćelija sa inhibitorom PD98059, u prisustvu IL-17, uticala je da ćelije delimično povrate sposobnost formiranja miotuba, vidljivih nakon obeležavanja na MyHC. Ovaj rezultat je potvrđen Western blot analizom ekspresije MyHC, s obzirom na to da C2C12 ćelije preinkubirane sa inhibitorom, bilo u prisustvu ili odsustvu IL-17, ekspimiraju MyHC na istom nivou kao i kontrolne ćelije kultivisane u miogenom diferencijacionom medijumu (**Slika 25B**). Pored toga, nakon preinkubacije sa inhibitorom, ekspresija gena za miogenin dostigla je nivo prisutan u C2C12 ćelijama kultivisanim u miogenom diferencijacionom medijumu pre delovanja IL-17 (**Slika 25C**). Takođe, inhibitor za MEK1,2 blokirao je supresivni efekat IL-17 na transaktivaciju G133-luc promotera miogenina u transfektovanim C2C12 ćelijama (**Slika 25D**).

Isti PD98059 inhibitor korišćen je u analizi uloge ERK1,2 MAPK signalnog puta u IL-17 indukovanoj stimulaciji osteogene diferencijacije C2C12 ćelija. Da bi se isključio uticaj osteogenih faktora i odredio signalni put aktiviran isključivo od strane IL-17, ćelije su kultivisane u serumom-osiromašenom miogenom diferencijacionom medijumu. Dobijeni rezultati pokazali su da je IL-17-stimulisana osteogena diferencijacija blokirana nakon preinkubacije ćelija sa PD98059 inhibitorom, s obzirom na to da u kulturama C2C12 ćelija ko-tretiranim sa PD98059 i IL-17 nije primećeno prisustvo ALP pozitivnih kolonija (**Slika 26A**). Ovaj rezultat je dodatno potvrđen u eksperimentima gde je PD98059 inhibirao IL-17-indukovanu transaktivaciju Runx2/Cbfa1 reportera u C2C12 ćelijama (**Slika 26B**).

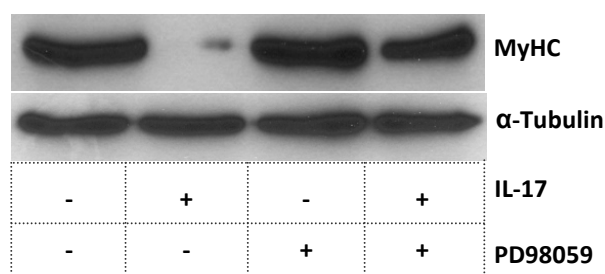
Kako bi se potvrdilo da je ERK1,2 MAPK direktno uključena u indukciju osteogene diferencijacije od strane IL-17, C2C12 ćelije su transfektovane plazmidom koji je sadržao konstitutivno aktivnu formu MEK1 (caMEK1, pECE/HA MAPKK). Prethodno je, kao pozitivna kontrola MEK1 ERK1,2 signalnog puta, određena aktivacija pSRE-luc reportera u prisustvu caMEK1 (**Slika 26C**), uz Western blot analizu ekspresije HA-obebeženog MEK1 proteina u transfektovanim ćelijama (**Slika**

26C, Insert). Čelije su potom ko-transfektovane sa caMEK1 i Runx2/Cbfa1 reporterom i kultivisane u standardnom medijumu ili miogenom diferencijacionom medijumu tokom 24h. U istim uslovima kultivisane su i ćelije ko-transfektovane sa praznim kontrolnim vektorom i Runx2/Cbfa1 reporterom. Vrednosti aktivnosti luciferaze dobijene u lizatima ćelija ko-transfektovanim sa caMEK1 i Runx2/Cbfa1 reporterom normalizovane su u odnosu na vrednosti dobijene u lizatima ćelija ko-transfektovanim praznim vektorom i Runx2/Cbfa1 reporterom. Dobijeni rezultati pokazali su da ektopična ekspresija caMEK1 značajno povećava aktivaciju Runx2/Cbfa1, u oba medijuma, ukazujući na to da je aktivacija ERK1,2 ključni događaj u aktivaciji Runx2/Cbfa1 transkripcionog faktora koji, sledstveno, inicira osteogenu diferencijaciju (**Slika 26D**).

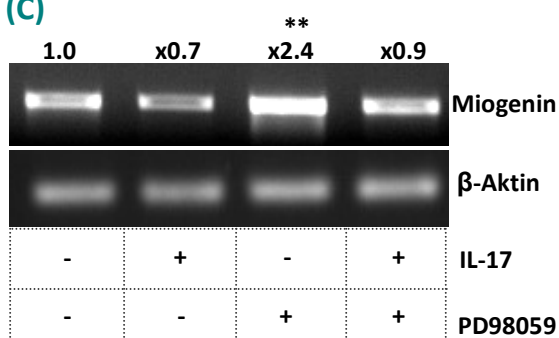
(A)



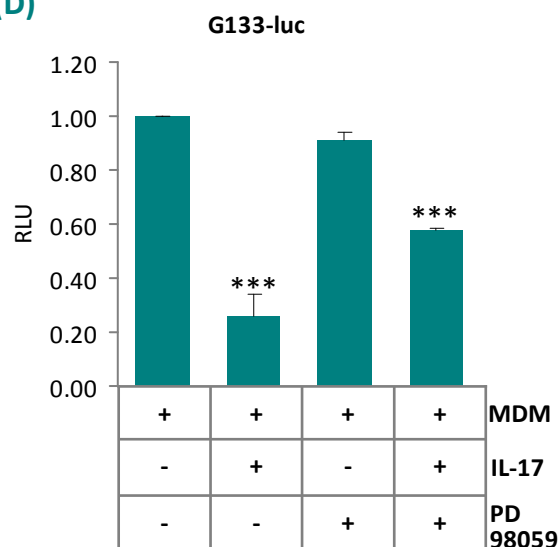
(B)



(C)

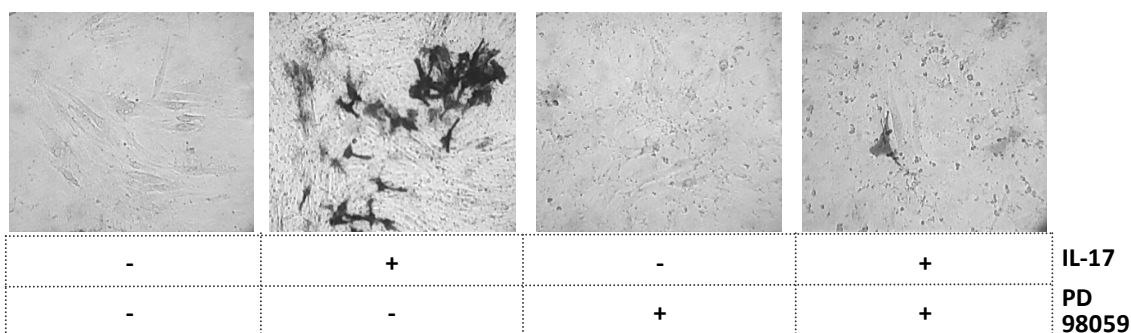


(D)

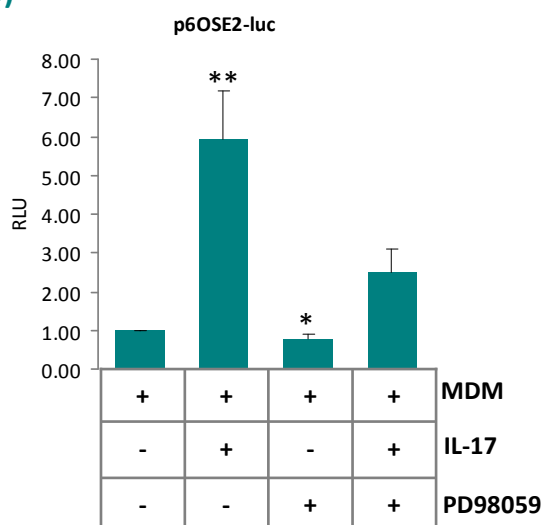


SLIKA 25. Učešće ERK1,2 signalnog puta u IL-17-indukovanoj inhibiciji miogeneze. C2C12 ćelije kultivisane su u MDM-u, u odsustvu ili prisustvu IL-17 (100 ng/ml) i PD98059 (25 μM). Ekspresija MyHC u C2C12 ćelijama određena je (A) imunocitohemijski i (B) Western blot analizom; α-tubulin je služio kao kontrola. (C) Ekspresija miogenina određena RT-PCR-om; β-aktin je služio kao kontrola. Vrednosti iznad slika odnose se na denzitometrijski kvantifikovane PCR trake, i izražene su u odnosu na netretirane ćelije, kojima je dodeljena vrednost 1. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu: ** $p < 0.01$ (D) Transaktivacija G133-luc reportera za miogenin u transfektovanim C2C12 ćelijama. Vrednosti su normalizovane u odnosu na netretirane ćelije, kojima je dodeljena vrednost 1; RLU, relative luciferase units. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu: *** $p < 0.001$.

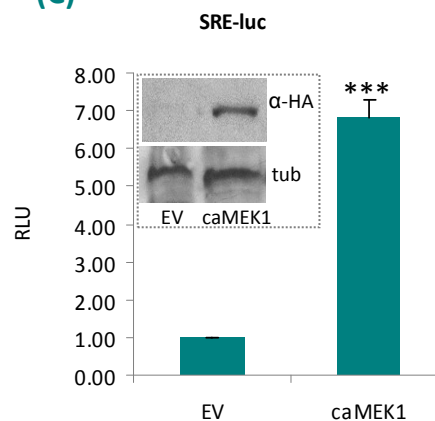
(A)



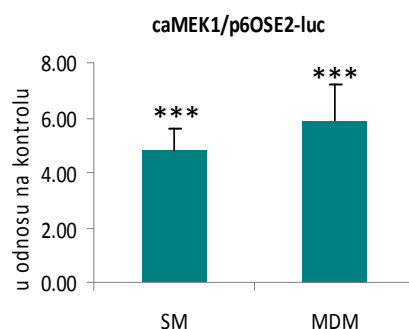
(B)



(C)



(D)

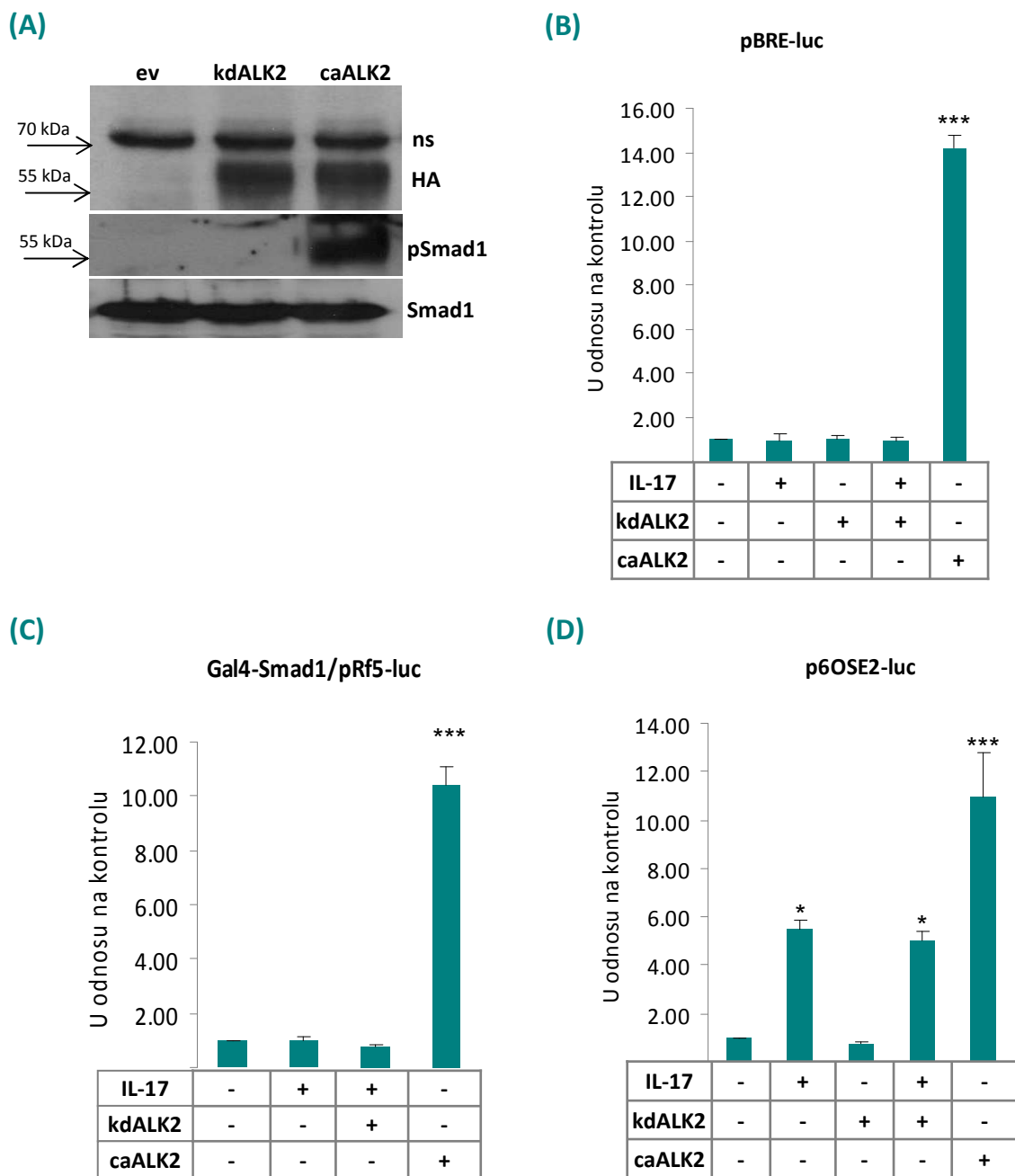


SLIKA 26. Učešće ERK1,2 signalnog puta u IL-17-indukovanoj stimulaciji osteogeneze. (A) Aktivnost ALP detektovana u C2C12 ćelijama kultivisanim u MDM-u sa IL-17 (100 ng/ml) i PD 98059 (25 μ M). (B) Transaktivacija p6OSE2-luc reportera za Runx2/Cbfa1 u transfektovanim C2C12 ćelijama u odsustvu ili prisustvu IL-17 (100 ng/ml) i PD 98059 (25 μ M) u MDM-u. Vrednosti su normalizovane u odnosu na one dobijene u ćelijama kultivisanim u kontrolnom MDM-u. RLU, relative luciferase units. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (MDM): ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$. (C) Ekspresija SRE-luc reportera u C2C12 ćelijama transfektovanim praznim vektorom (ev, empty vector) i konstitutivno aktivnim MEK1 (caMEK1), pECE/HA MAPKK. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (EV): *** $p < 0.001$; Inset: Ekspresija HA-obeležnog MEK1 plazmida u ćelijama transfektovanim sa EV i caMEK1, detektovana Western blot-om. (D) Transaktivacija p6OSE2-luc reportera u C2C12 ćelijama transfektovanim sa caMEK1 plazmidom, kultivisane u SM-u i MDM-u. Vrednosti su normalizovane u odnosu na ćelije transfektovane sa EV. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (EV): *** $p < 0.001$.

4.1.6. Učešće BMP signalizacije u IL-17-indukovanoj osteogenoj diferencijaciji C2C12 ćelija

Poznato je da je BMP-Smad signalni put uključen u osteogenu diferencijaciju miogenih progenitora (*Katagiri i sar., 1994; Osses i sar., 2009; Kim i sar., 2010*). Kao što je prethodno pokazano, BMP-9 indukovana ostogena diferencijacija C2C12 ćelija podrazumeva aktivaciju receptora za BMP, ALK2 (*Luo i sar., 2010*). Stoga je dalje ispitivano da li je BMP-Smad signalni put uključen i u IL-17-indukovanu osteogenu diferencijaciju C2C12 ćelija. U tu svrhu primenjena su dva plazmida, jedan koji sadrži gen za „kinase-dead“ ALK2 receptor (kdALK2), odnosno neaktivnu formu ALK2 receptora (*Romero i sar., 2010*), i drugi, koji sadrži gen za konstitutivno aktivnu formu ALK2 receptora (caALK2). Ova dva plazmida koristila su kao „prekidač“ za BMP-Smad signalni put: caALK2 za aktiviranje signalnog puta a kdALK2 za blokiranje signalnog puta. U cilju potvrde aktivnosti plazmida, sprovedena je Western blot analiza ekspresije HA-obeđenih ALK2 proteina u transfektovanim ćelijama (**Slika 27A**). Pored toga, funkcionalna aktivnost caALK2 pokazana je i prisustvom fosforilisanе forme Smad1 jedino u ćelijama transfektovanim sa caALK2 (**Slika 27A**). Nishodno od ALK2 receptora, u BMP-Smad signalnom putu, aktiviraju se Smad signalni molekuli. Za ispitivanje nishodne aktivacije BMP-Smad signalne kaskade primenjena su dva plazmida: BRE-luc, specifični reporter plazmid za BMP-Smad signalni put i Gal4-Smad1/Gal4-luc sistem koji omogućava praćenje aktivacije Smad1 proteina. C2C12 ćelije su ko-transfektovane sa BRE-luc reporter plazmidom i kdALK2 ili caALK2 i potom kultivisane u miogenom diferencijacionom medijumu sa ili bez IL-17. Kao što je prikazano na **Slici 27B**, kultivacija ćelija sa IL-17 nije dovela do aktivacije BRE-luc reportera u poređenju sa bazalnim nivoom. U prisustvu neaktivne forme ALK2 receptora takođe je izostala aktivacija BRE-luc reportera, dok je jaka aktivacija postignuta jedino u ćelijama transfektovanim sa caALK2, u odsustvu IL-17. Pored toga, C2C12 ćelije su ko-transfektovane sa Gal4-Smad1/Gal4-luc sistemom i dva plazmida koji ekspimiraju mutirane ALK2 gene. Slično prethodnom eksperimentu, IL-17 nije aktivirao ni Gal4-Smad1/Gal4-luc sistem u poređenju sa bazalnim nivoom, dok je jaka aktivacija primećena jedino nakon ko-transfekcije sa caALK2, u odsustvu IL-17 (**Slika 27C**).

Konačno, da bi se utvrdilo da li je aktivacija Runx2/Cbfa1 transkripcionog faktora od strane IL-17 posredovana BMP signalnom kaskadom, ćelije su kofektovane sa Runx2/Cbfa1 reporter plazmidom i kdALK2 ili caALK2 plazmidima. Aktivacija Runx2/Cbfa1 reportera uočena je nakon delovanja IL-17, čak i u ćelijama kofektovanim sa kdALK2, potvrđujući da IL-17 indukovana osteogena diferencijacija C2C12 ćelija ne zavisi od aktivacije BMP signalnog puta (**Slika 27D**). Ćelije kofektovane sa caALK2, u odsustvu IL-17 pokazale su visoku transaktivaciju Runx2/Cbfa1 reporter plazmida, potvrđujući aktivnost BMP signalnog puta u kontrolnim uslovima (**Slika 27D**).



SLIKA 27. Učešće BMP signalizacije u IL-17-indukovanoj osteogenoj diferencijaciji C2C12 ćelija. (A) Ektopična ekspresija HA-obeženog ALK2 u ćelijama transfektovanim sa kinazno neaktivnim (kd, kinase dead) ALK2, konstitutivno aktivnim (ca, constitutively active) ALK2 ili praznim vektorom (ev, empty vector). Fosforilacija Smad1 određena Western blot analizom. ns-nespecifične trake kao kontrola za nanošenje uzoraka. (B) Transaktivacija pBRE-luc, reportera za BMP-Smad signalni put, u C2C12 ćelijama transfektovanim sa ev, kdALK2 ili caALK2, u odsustvu ili prisustvu IL-17 (100 ng/ml). (C) Transaktivacija Gal4-Smad1/pRf5-luc u C2C12 ćelijama nakon transfekcije i tretmana opisanim pod B. (D) Transaktivacija p6OSE2-luc, reportera za Runx2/Cbfa1 u C2C12 ćelijama nakon transfekcije i tretmana opisanim pod B. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu (ev): * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

4.2. EFEKTI IL-17 NA FUNKCIJE ENDOTELSKIH ĆELIJA KULTIVISANIH U USLOVIMA RAZLIČITE KONCENTRACIJE KISEONIKA

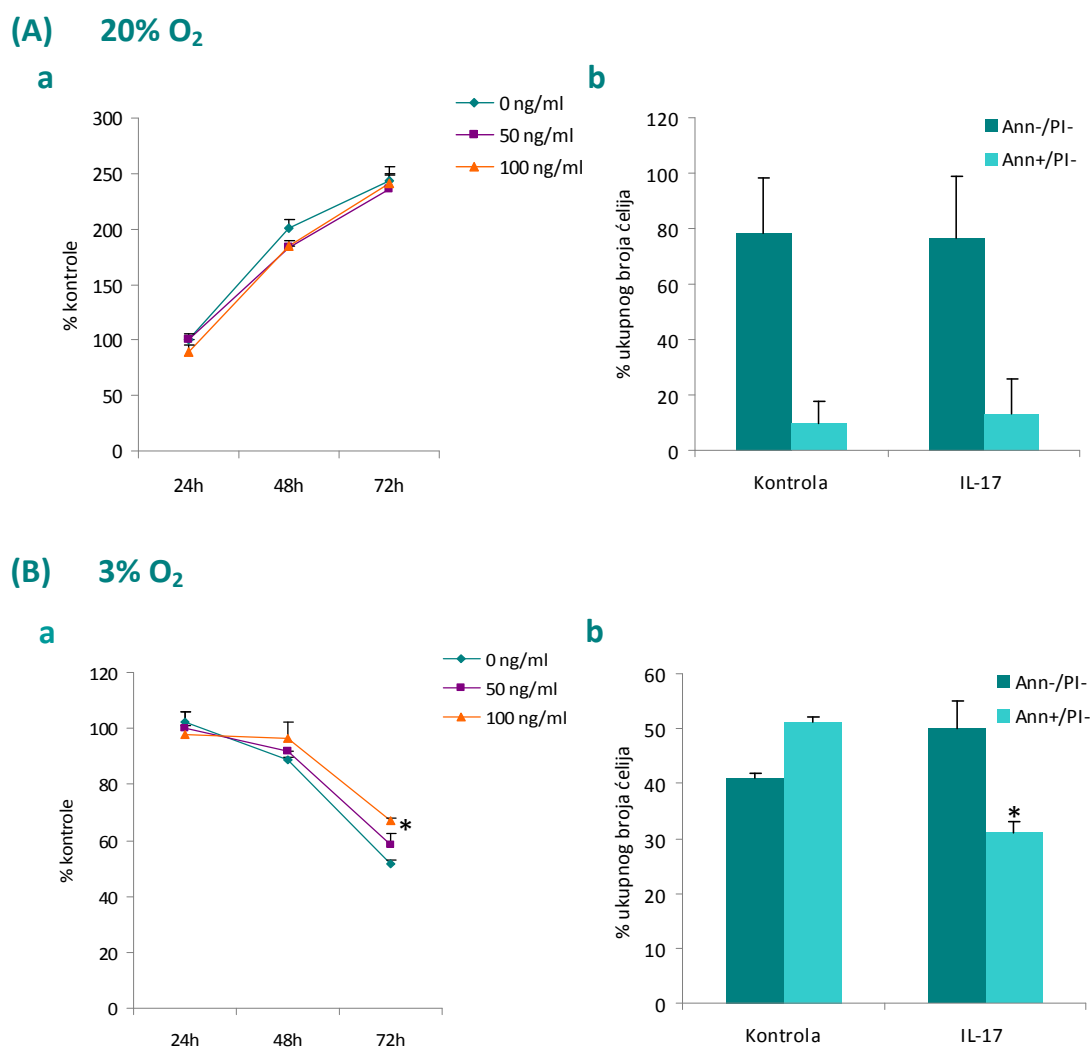
U okviru ispitivanja uticaja IL-17 na različite funkcije endotelskih ćelija, praćeni su efekti ovog citokina na proliferaciju, apoptozu, migraciju i tubulogeni potencijal humane EA.hy 926 ćelijske linije. U cilju ispitivanja molekularnih mehanizama preko kojih IL-17 ostvaruje svoj efekat na endotelske ćelije, određivan je i uticaj IL-17 na ekspresiju proteina i gena za eNOS i Cox-2. Efekti IL-17 su određivani uporedo na dve koncentracije kiseonika (20% O₂ i 3% O₂) u okviru ispitivanja uticaja hipoksije na endotelske ćelije.

4.2.1. Efekat IL-17 na proliferaciju EA.hy 926 ćelija kultivisanih u prisustvu 20% O₂ i 3% O₂

EA.hy 926 ćelije su kultivisane na 20% O₂ i 3% O₂ u prisustvu 0, 50 i 100 ng/ml IL-17 u trajanju od 24h, 48h i 72h, nakon čega je analizirana proliferacija ćelija MTT testom. Rezultati su pokazali da u uslovima normoksije – 20% O₂ u atmosferi, EA.hy 926 ćelije imaju visok proliferativni kapacitet, s obzirom na to da je nakon 72h proliferacija ćelija povećana gotovo 2.5 puta, pri čemu rastuće koncentracije IL-17 nisu uticale na stepen proliferacije (**Slika 28Aa**). Međutim, proliferacija EA.hy 926 ćelija određena u uslovima hipoksije - 3% O₂, pokazala je da su EA.hy 926 ćelije osetljive na nisku koncentraciju kiseonika u atmosferi, s obzirom na to da je broj vijabilnih ćelija nakon 72h kultivacije bio preko 50% niži od početne vrednosti (**Slika 28Ba**). U uslovima hipoksije razlikovao se i uticaj IL-17 na proliferaciju EA.hy 926 ćelija, jer je IL-17 na dozno-zavisan način povećavao preživljavanje ćelija, sa najizraženijim efektom pri koncentraciji IL-17 od 100 ng/ml.

Dobijeni rezultati su ukazali da IL-17 ispoljava protektivni efekat na EA.hy 926 ćelije na niskoj koncentraciji O₂. Da bismo potvrdili ovo zapažanje, pristupili smo određivanju apoptotskih profila EA.hy 926 ćelija kultivisanih u uslovima normoksije i hipoksije, u prisustvu ili odsustvu IL-17. Saglasno sa prethodnim nalazima, nakon kultivacije ćelija na 20% O₂ detektovan je nizak procenat apoptotičnih (Ann V pozitivnih) ćelija, pri čemu prisustvo IL-17 nije dovelo do značajnih promena u broju i

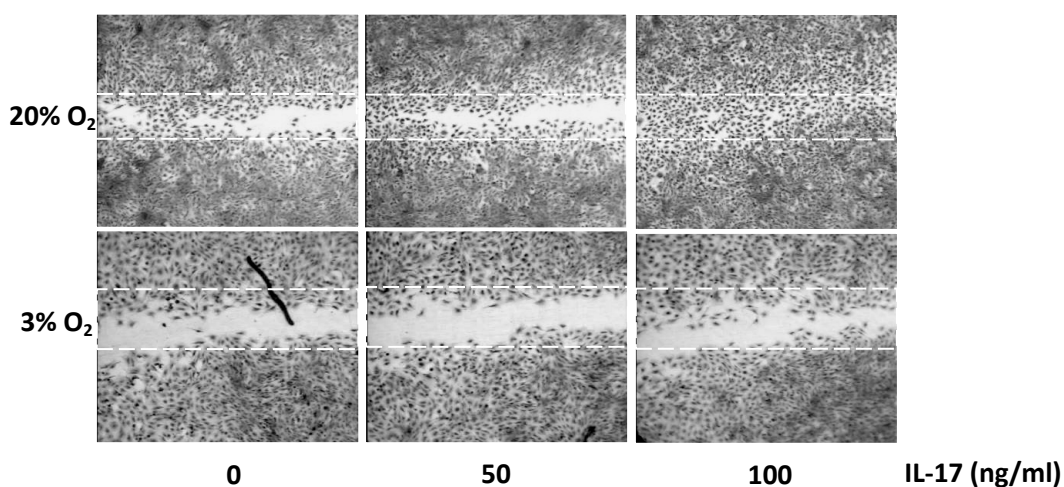
odnosu vijabilnih i apoptotičnih ćelija (Slika 28Ab). S druge strane, pri kultivaciji endotelskih ćelija na 3% O₂, više od polovine detektovanih ćelija je bilo apoptotično, ali je prisustvo IL-17 izmenilo ovaj odnos, povećavajući procenat vijabilnih ćelija, odnosno značajno smanjujući zastupljenost apoptotičnih ćelija (Slika 28Bb).



SLIKA 28. Efekat IL-17 na proliferaciju EA.hy 926 ćelija kultivisanih u prisustvu 20% O₂ i 3% O₂. **(A) a.** Proliferacija EA.hy 926 ćelija određena MTT testom nakon 24, 48 i 72h inkubacije na 20% O₂ u prisustvu 0, 50 ili 100 ng/ml IL-17. **b.** Apoptotski profil EA.hy 926 ćelija određen protočnom citometrijom nakon 24h inkubacije ćelija na 20% O₂ u odsustvu ili prisustvu 100 ng/ml IL-17. Ann-/PI- ćelije su vijabilne dok su Ann+/PI- ćelije apoptotične. **(B) a.** Proliferacija EA.hy 926 ćelija određena MTT testom nakon 24, 48 i 72h inkubacije na 3% O₂ u prisustvu 0, 50 ili 100 ng/ml IL-17. **b.** Apoptotski profil EA.hy 926 ćelija određen protočnom citometrijom nakon 24h inkubacije ćelija na 3% O₂ u odsustvu ili prisustvu 100 ng/ml IL-17. Ann-/PI- ćelije su vijabilne dok su Ann+/PI- ćelije apoptotične. Statistička značajnost u odnosu na kontrolu: *p<0.05.

4.2.2. Efekat IL-17 na migraciju EA.hy 926 ćelija kultivisanih u prisustvu 20% O₂ i 3% O₂

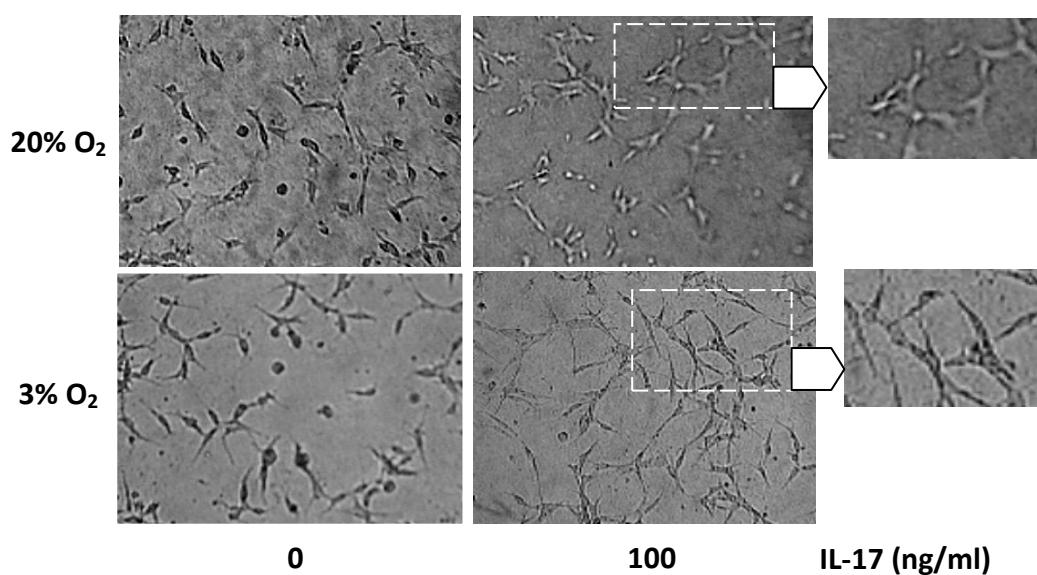
U okviru ispitivanja različitih funkcija endotelskih ćelija izloženih različitim koncentracijama kiseonika, ispitivan je i efekat IL-17 na migratornu sposobnost ćelija primenom *Scratch* testa. Migracija EA.hy 926 ćelija u polje ogrebotine praćena je tokom 24h, pri inkubaciji ćelija u uslovima normoksije i hipoksije u prisustvu ili odsustvu IL-17. Rezultati prikazani na **Slici 29** pokazali su da je u uslovima normoksije, na 20% O₂, IL-17 stimulisao migraciju EA.hy 926 ćelija na dozno-zavisnan način. S druge strane, inkubacija EA.hy 926 ćelija na 3% O₂ indukovala je smanjenje njihove migracije, pri čemu IL-17 nije imao uticaja na ovaj inhibitorski efekat.



SLIKA 29. Efekat IL-17 na migraciju EA.hy 926 ćelija kultivisanih u prisustvu 20% O₂ i 3% O₂. Migracija EA.hy 926 ćelija analizirana *Scratch* testom: ogrebotina je napravljena u konfluentnom monosloju ćelija, nakon čega su ćelije kultivisane u prisustvu 0, 50 i 100 ng/ml IL-17 na 20% O₂ i 3% O₂ u atmosferi. Migracija ćelija u polje ogrebotine dokumentovana je nakon 24h na svetlosnom mikroskopu, uvećanje 100x.

4.2.3. Efekat IL-17 na tubulogenezu EA.hy 926 ćelija kultivisanih u prisustvu 20% O₂ i 3% O₂

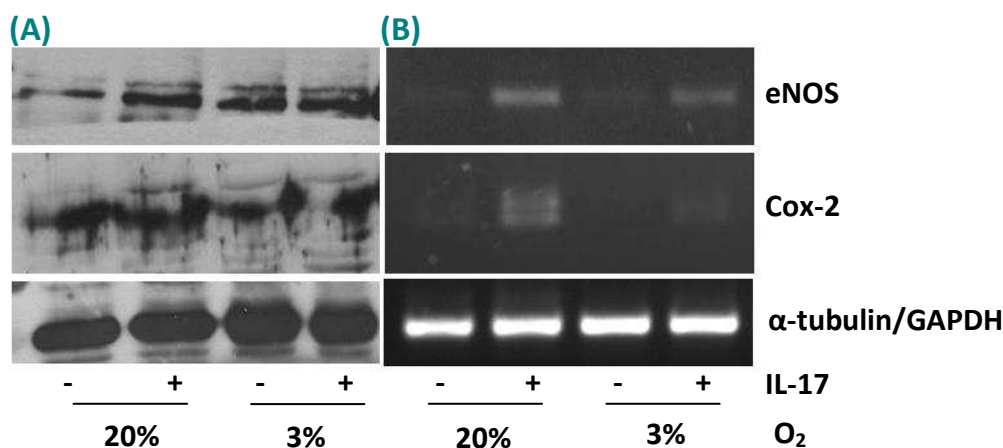
Angiogeni potencijal EA.hy 926 ćelija analiziran je određivanjem kapaciteta tubulogeneze nakon njihovog kultivisanja na kolagenom gelu, tokom 24h, pri inkubaciji ćelija u atmosferi sa 20% O₂ i 3% O₂, u prisustvu ili odsustvu IL-17. Rezultati su ukazali na sličan kapacitet EA.hy 926 ćelija da formiraju tubule pri kultivisanju u uslovima i normoksije i hipoksije. Takođe, rezultati su pokazali da IL-17 stimuliše tubulogenezu EA.hy 926 ćelija, indukujući pojavu većeg broja izduženih povezanih ćelija koje formiraju tubulogene mreže (Slika 30).



SLIKA 30. Efekat IL-17 na tubulogenezu EA.hy 926 ćelija kultivisanih u prisustvu 20% O₂ i 3% O₂. Tubulogeni kapacitet EA.hy 926 ćelija određen nakon kultivisanja ćelija na kolagenom gelu. Ćelije su inkubirane na 3% O₂ i 20% O₂ u odsustvu ili prisustvu IL-17 (100 ng/ml). Tubulogeneza endotelskih ćelija dokumentovana je nakon 24h na svetlosnom mikroskopu, uvećanje 100x .

4.2.4. Efekat IL-17 na ekspresiju eNOS i Cox-2 u EA.hy 926 ćelijama kultivisanim u prisustvu 20% O₂ i 3% O₂

eNOS i Cox-2 su važni molekuli uključeni u odgovor endotelskih ćelija na različite faktore i citokine. S toga je ispitivan i efekat IL-17, u uslovima normoksije i hipoksije, na ekspresiju ovih proteina i njihovih gena u EA.hy 926 ćelijama. Western blot analizom utvrđeno je da je ekspresija eNOS proteina viša u ćelijama u prisustvu IL-17 na obe koncentracije O₂, pri čemu je veća razlika između kontrolnih i tretiranih ćelija primećena nakon inkubacije ćelija na 20% O₂. Ekspresija proteina niža je kod ćelija inkubiranih na 3% O₂, uz malo povećanje koje indukuje IL-17 (**Slika 31A**). Analizom ekspresije gena za eNOS jasnije je pokazan inducibilni efekat citokina (**Slika 31B**). Rezultati su takođe pokazali da IL-17 indukuje ekspresiju Cox-2 na obe koncentracije kiseonika, gde je ekspresija proteina i transkripta viša na 20% O₂ u poređenju sa njihovom ekspresijom na 3% O₂ (**Slika 31**).



SLIKA 31. Ekspresija proteina i gena za eNOS i Cox-2 u EA.hy 926 ćelijama kultivisanim u odsustvu ili prisustvu IL-17 na 3% O₂ i 20% O₂. Ćelije su inkubirane na 3% O₂ i 20% O₂ u odsustvu ili prisustvu IL-17 (100 ng/ml) u trajanju od 24h. (A) Ekspresija proteina određena Western blot analizom; α-tubulin je služio kao kontrola. (B) Ekspresija iRNK za eNOS i Cox-2 određena RT-PCR-om; GAPDH je služio kao kontrola.

4.3. USPOSTAVLJANJE ADEKVATNOG MODELA ZA PROUČAVANJE PROCESA DIFERENCIJACIJE MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA U ENDOTELSKE ĆELIJE

4.3.1. Izolacija i kultivacija mezenhimskih matičnih ćelija iz tkiva pupčanika

Adherentne ćelije nalik fibroblastima primećene su oko komadića tkiva 5-7 dana nakon postavljanja eksplanta, dok su konfluentnost dovoljnu za prvu pasažu ćelije dostigle nakon 10-15 dana. Posle nekoliko pasaža ćelije su održale svoju morfologiju i svojstvo adhezije za plastiku i nisu se spontano diferencirale (**Slika 32A**).

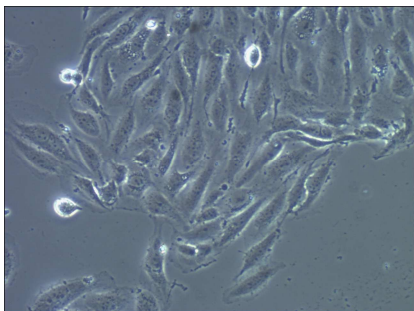
Kratkotrajna proliferacija. Test kratkotrajne proliferacije pokazao je jako visoku proliferativnu moć MSC, s obzirom na to da se broj ćelija uvećao gotovo 40 puta sedmog dana od zasejavanja ćelija. Reprezentativni grafik koji prikazuje trend rasta UC-MSK prikazan je na **Slici 32B**.

Dugotrajna proliferacija. Dodatni eksperimenti su urađeni kako bi se potvrdio visok kapacitet za ekspanziju MSC. Ćelije su zasejavane u različitom broju (1×10^4 i 5×10^4), kako bi se analizirala zavisnost rasta ćelija od njihovog početnog broja kao i vreme potrebno za dupliranje populacije. Dobijeni rezultati bili su u skladu je sa visokom proliferativnom moći MSC, s obzirom na to da je vreme dupliranja populacije (PDT) iznosilo oko 34h (35 ± 3 h za UC-MSK izolovane iz prvog uzorka tkiva i 33 ± 5 h za UC-MSK izolovane iz drugog uzorka tkiva), za obe početne koncentracije ćelija.

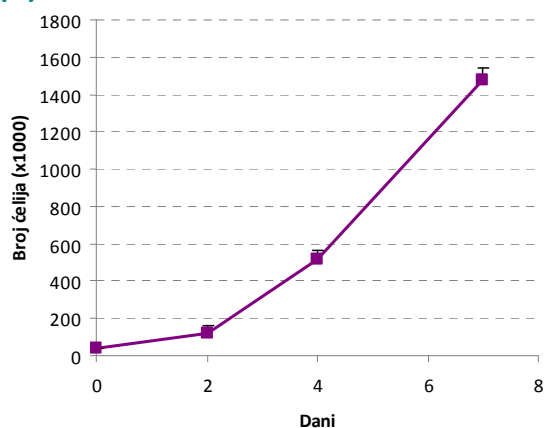
CFU-F. Rezultati analize klonogenog kapaciteta MSC određivanog pomoću CFU-F testa pokazali su prisustvo klonogenih populacija ćelija sa tipičnom morfologijom nalik fibroblastima u okviru izolovane populacije MSC, pri čemu je broj kolonija bio obrnuto srazmeran broju zasejanih ćelija. Kapacitet MSC da formiraju kolonije bio je na visokom nivou, s obzirom na to da se procenat ćelija koje su formirale kolonije kretao između 55 i 100% (**Slika 32C**).

Krioprezervacija. Ćelije su u medijumu za zamrzavanje (10% DMSO u FBS-u) skladištene do dve godine u tečnom azotu. Nakon odmrzavanja, ćelije su pokazivale visok procenat vijabilnosti u rasponu od 75-90% a karakteristike njihovog rasta su se održale, zajedno sa sposobnošću za diferenciranje.

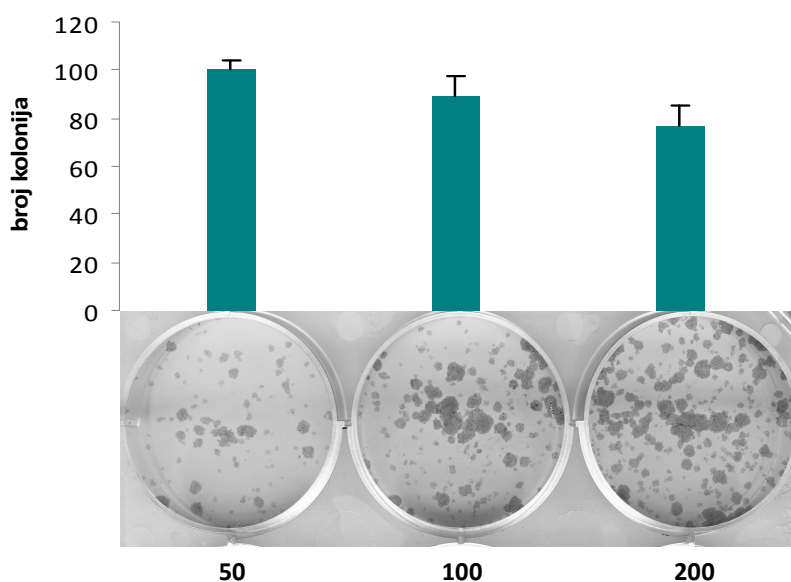
(A)



(B)



(C)

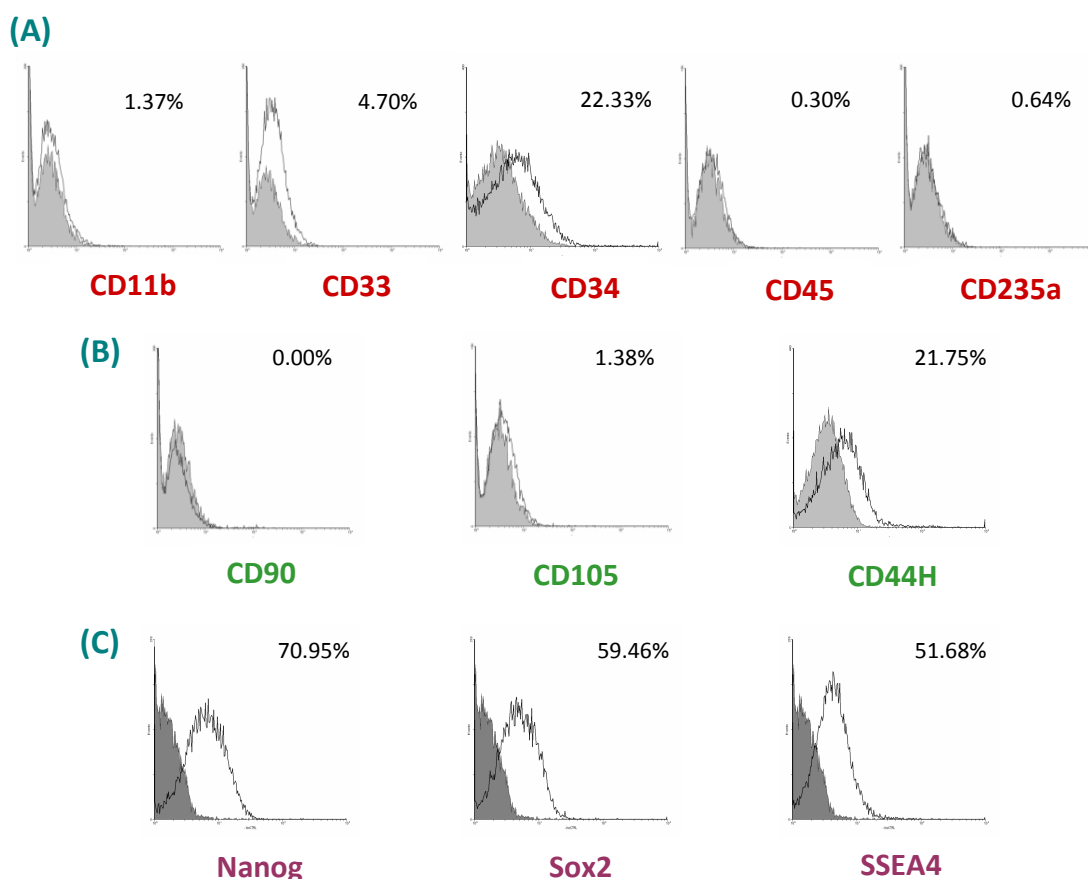


SLIKA 32. Izolacija i kultivacija UC-MSC. (A) Morfologija UC-MSC, fazni kontrast, uveličanje 100x (B) Proliferacija ćelija u kratkotrajnim kulturama. Prikazana je kriva rasta UC-MSC, sa srednjim vrednostima \pm SE. (C) Efikasnost formiranja kolonija u zavisnosti od početnog broja zasejanih ćelija. UC-MSC su kultivisane u maloj gustini (50, 100 ili 200 ćelija po otvoru) u standardnom medijumu u trajanju od 14 dana, nakon čega su CFU-F obojene Crystal violet bojom. Efikasnost formiranja CFU-F kolonija definisana je kao odnos broja kolonija i broja zasejanih ćelija. Predstavljene su srednje vrednosti \pm SE dobijene nakon tri nezavisna eksperimenta.

4.3.2. Karakterizacija mezenhimskih matičnih ćelija izolovanih iz tkiva pupčanika

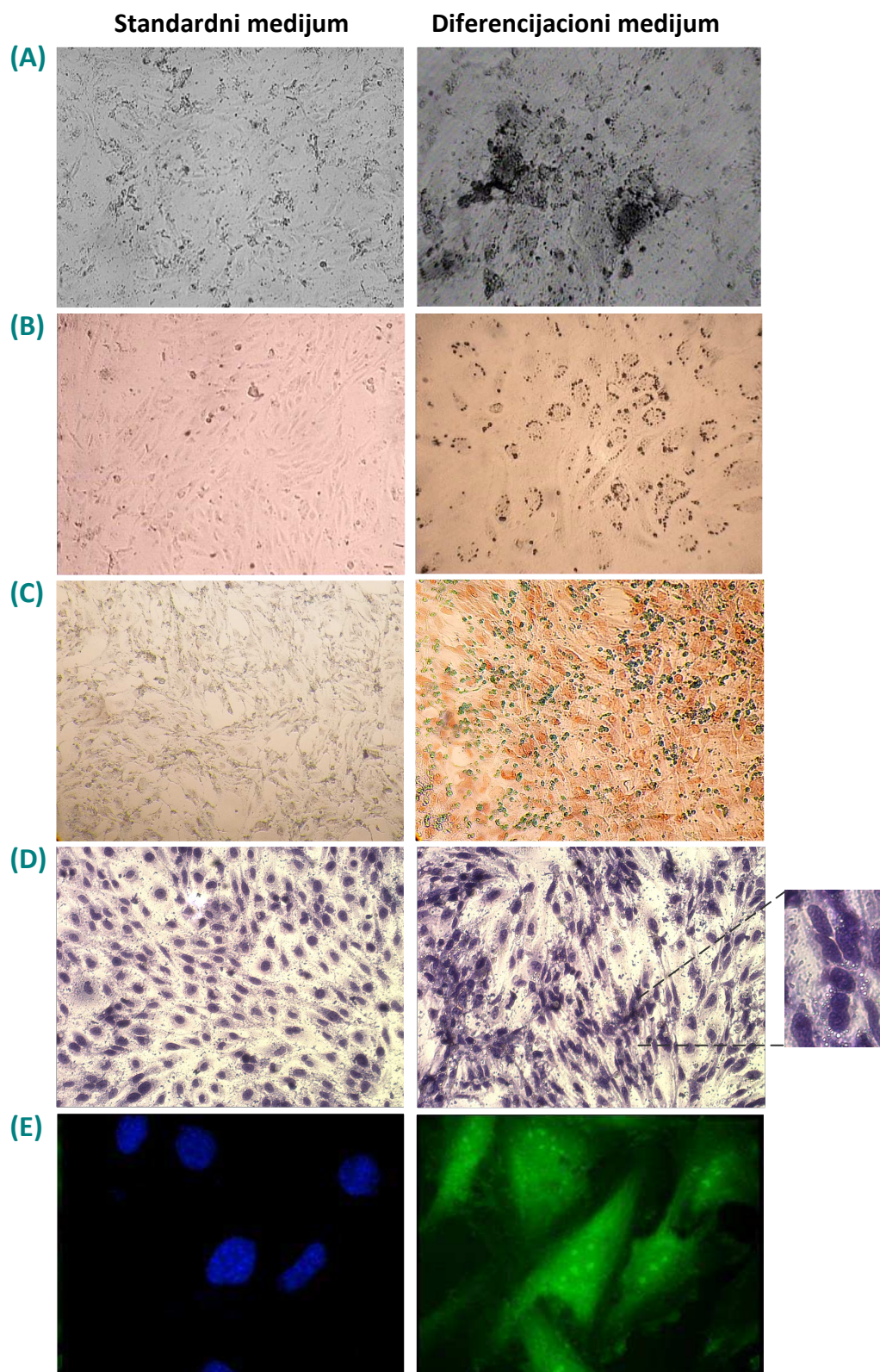
Svojstvo adherentnosti za plastiku. Primarne ćelijske linije izolovane iz oba uzorka tkiva pupčanika pokazale su svojstvo adherentnosti za plastiku, kako u samom početku, prilikom procesa izolacije, tako i nakon velikog broja pasaža (preko 20).

Imunofenotip UC-MSC. Protočnom citometrijom je analiziran imunofenotip UC-MSC između treće i šeste pasaže. Procenat pozitivnih i negativnih ćelija za svaki marker prikazan je na **Slici 33**. Analiza ekspresije površinskih markera pokazala je pozitivnu ekspresiju CD44 kod 21% ćelijske populacije i negativnu ekspresiju CD11b, CD33, CD34, CD235a, CD45, CD105 i CD90. Međutim, pokazano je da UC-MSC u visokom procentu ekspimiraju embrionalne markere: Nanog (70%), Sox-2 (59%) i SSEA4 (51%).



SLIKA 33. Imunofenotip UC-MSC. Na reprezentativnim histogramima dobijenim nakon protočne citometrije prikazana je ekspresija (neosenčeni histogrami) (A) hematopoetskih antigena (CD11b, CD33, CD34, CD45 i CD235a), (B) mezenhimskih antigena (CD90, CD105 i CD44H) i (C) embrionalnih marker-antigena (Nanog, Sox-2 i SSEA4) u poređenju sa izotipskim kontrolama (osenčeno) u UC-MSC.

Diferencijacija UC-MSC. Kao funkcionalni test potvrde identiteta MSC, analiziran je diferencijacioni potencijal ćelija izolovanih iz tkiva pupčanika. Diferencijacija ćelija prikazana je na **Slici 34**. Indukcija osteogene diferencijacije vršena je u trajanju od šest dana, koliko je potrebno za ekspresiju ranog osteogenog markera, ALP. Pozitivna ekspresija i aktivnost ALP pokazana je dodavanjem odgovarajućeg supstrata za ovaj enzim nakon čega se ćelije u kojima postoji prisustvo ALP boje intenzivno teget-sivom bojom. Osteogena diferencijacija postignuta je kod UC-MSC od oba donora (**Slika 34A**). Indukcija adipogene diferencijacije dovela je do inhibicije proliferacije ćelija i promene u njihovoj morfologiji. Prve lipidne kapi unutar ćelija pojavile su se već nakon druge nedelje kultivacije u ADM-u. Nakon 21 dana, *Oil Red O* bojenjem dokazano je da je većina ćelija aktivno deponovala unutarćeljske lipide. Indukcija diferencijacije u adipocite bila je uspešna kod UC-MSC iz oba uzorka (**Slika 34B**). Indukcija hondrogene diferencijacije trajala je 21 dan nakon čega su ćelije obojene Safranin O bojom koja boji proteoglikane, proizvod hondrogenih ćelija, u narandžastu boju. Obojeni proteoglikani primećeni su u oba uzorka UC-MSC (**Slika 34C**). Indukcija miogene diferencijacije kultivisanjem ćelija u MDM-u tokom 16 dana dovela je do formiranja izduženih višejedarnih ćelija, miotuba, kod UC-MSC oba donora. Miotube su vidljive pod mikroskopom nakon bojenja *Crystal violet* bojom, koja omogućava jasno uočavanje jedara u ćelijama (**Slika 34D**). Kod UC-MSC nakon tretmana sa TGF- β uočena je ekspresija α SMA, proteina karakterističnog za miofibroblaste (**Slika 34E**).



SLIKA 34. Diferencijacija UC-MSC. (A) Osteogena diferencijacija potvrđena pozitivnim bojenjem na aktivnost ALP, uveličanje 100x. (B) Hondrogena diferencijacija potvrđena pozitivnim bojenjem proteoglikana Safranin O bojom, uveličanje 100x. (C) Adipogena diferencijacija potvrđena bojenjem lipidnih kapi u ćelijama Oil Red O bojom, uveličanje 100x. (D) Miogena diferencijacija potvrđena formiranjem multinuklearnih miotuba obojenih Crystal Violet bojom, uveličanje 100x. (E) Diferencijacija u miofibroblaste potvrđena obeležavanjem ćelija na α SMA, uveličanje 400x.

4.3.3. Diferencijacija UC-MSC u endotelske ćelije

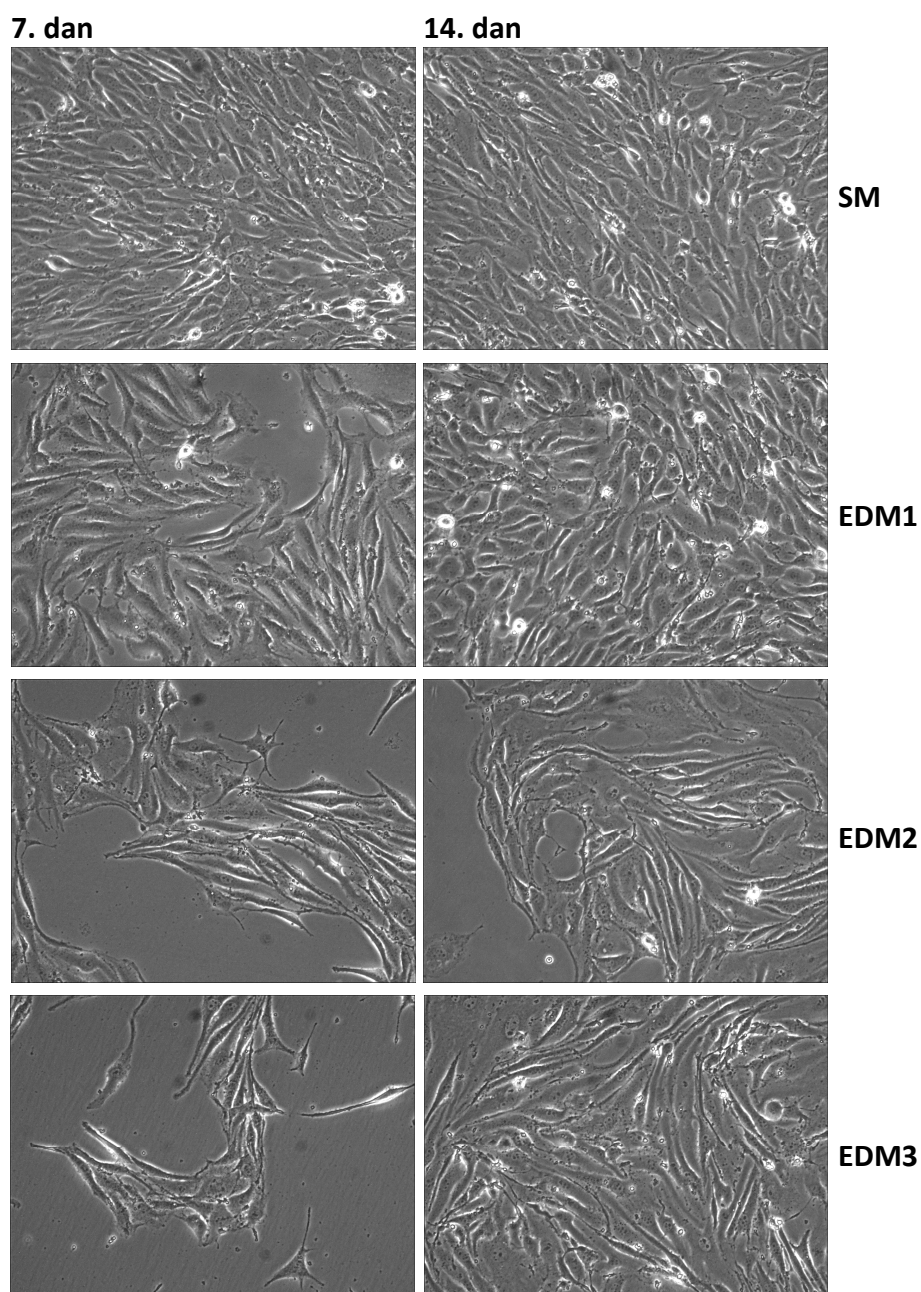
Prethodna istraživanja diferencijacije ESC u endotelske ćelije pokazala su da se najveći prinos endotelskih ćelija dobija inhibicijom receptora za TGF- β na ćelijama tokom indukcije diferencijacije (*James i sar., 2010; Watabe i sar., 2003*). Stoga je u cilju diferenciranja UC-MSC u endotelske ćelije primenjen sličan indukcionim medijum nakon čije primene je analizirana uspešnost endotelske diferencijacije. Da bi se ostvarila inhibicija ALK5 receptora za TGF- β , primenjen je farmakološki inhibitor SB505124. Prvenstveno je određena optimalna koncentracija inhibitora, tako što su UC-MSC inkubirane u prisustvu 0.10 μ M, 0.25 μ M i 0.50 μ M SB505124. Budući da su se koncentracije SB505124 od 0.25 μ M i 0.50 μ M pokazale kao letalne za UC-MSC, dok su ćelije u prisustvu 0.1 μ M inhibitora pokazale umereno niži stepen proliferacije, poslednja koncentracija je primenjivana u daljim eksperimentima.

UC-MSC su podeljene u četiri grupe prema medijumima u kojima su kultivisane:

1. SM – ćelije kultivisane u standardnom medijumu
2. EDM1 – ćelije kultivisane u standardnom medijumu sa 50 ng/ml VEGF
3. EDM2 – ćelije kultivisane u standardnom medijumu sa 0.1 μ M SB505124
4. EDM3 – ćelije kultivisane u standardnom medijumu sa 0.1 μ M SB505124 i 50 ng/ml VEGF

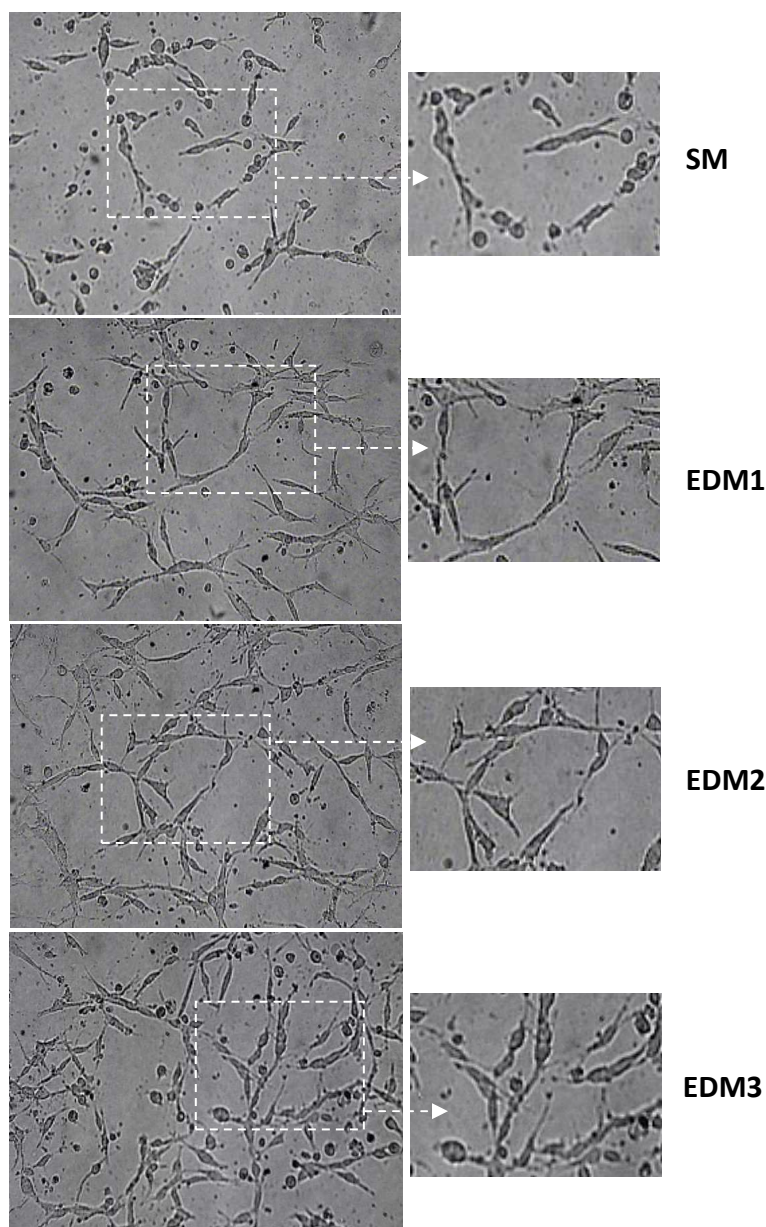
Morfologija ćelija tokom diferencijacije. Morfologija UC-MSC praćena je i dokumentovana tokom indukcije endotelske diferencijacije, i to sedmog i četrnaestog dana (**Slika 35**). Ćelije na početku pokazuju karakterističnu morfologiju nalik fibroblastima. Sedmog dana indukcije diferencijacije, ćelije kultivisane u standardnom medijumu, zadržale su morfologiju nalik fibroblastima, dok su ćelije kultivisane u sva tri EDM-a pokazale značajne promene u morfologiji: bile su izdužene i raspoređene u većoj gustini u odnosu na ćelije u kontrolnoj kulturi. Ćelije kultivisane u EDM2 i 3, bile su izduženije od ćelija kultivisanih u EDM1. Takođe, proliferacija ćelija kultivisanih u EDM2 i 3 bila je sporija od proliferacije ćelija kultivisanih u standardnom medijumu i EDM1. Nakon 14 dana indukcije diferencijacije, morfološke karakteristike uočene sedmog dana su postale još intenzivnije, uz veće razlike između grupa. Kontrolne ćelije

zadržale su svoju karakterističnu morfologiju, dok su ćelije inkubirane u prisustvu EDM1, koje su brže proliferisale od preostale dve grupe ćelija morfološki bile između kontrolne i EDM2 i 3 grupa ćelija, budući da su bile blago izdužene, za razliku od ćelija inkubiranih sa EDM2 i EDM3, koje su bile jako izdužene i u bliskom međusobnom kontaktu.



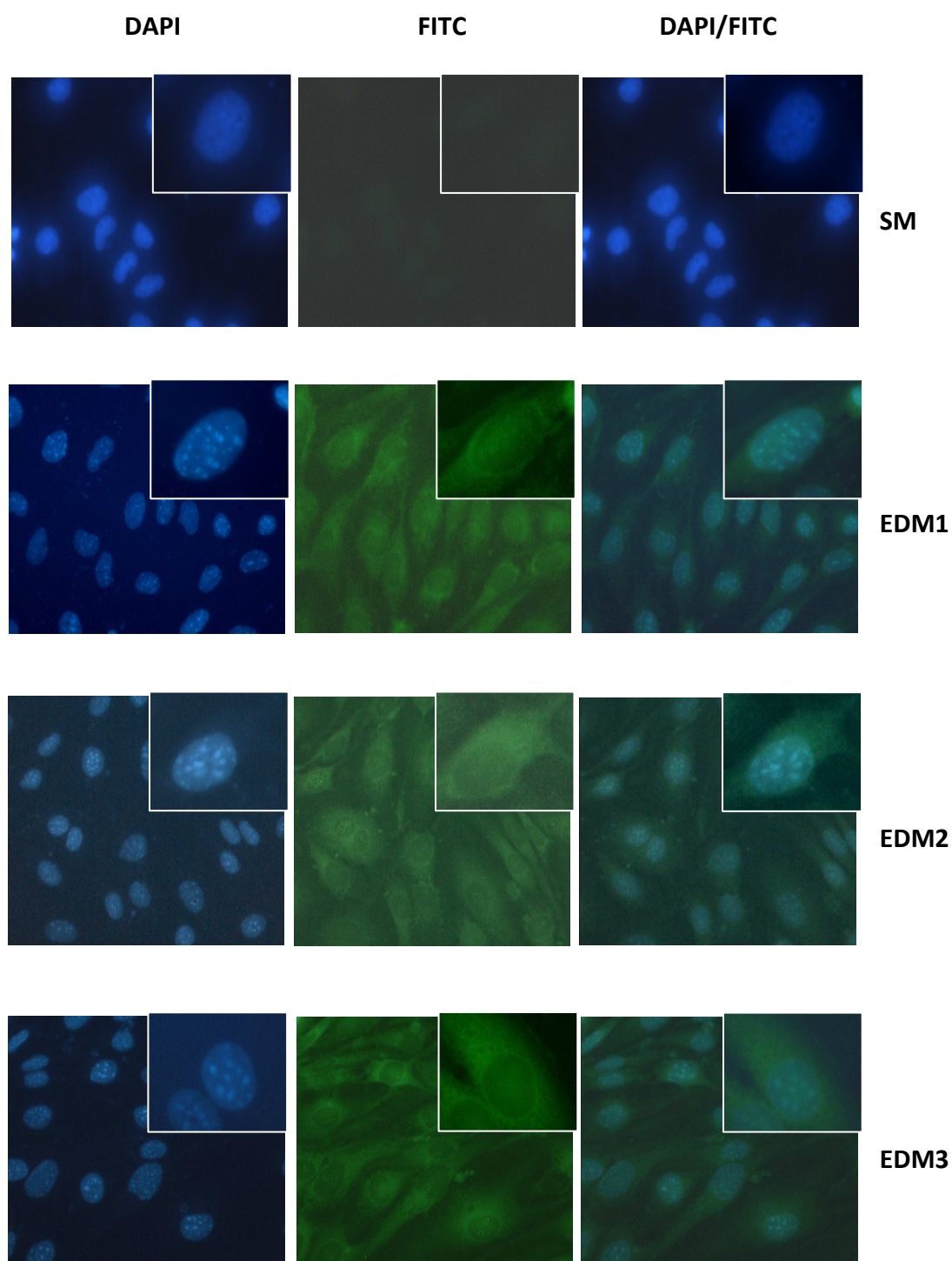
SLIKA 35. Morfologija UC-MSC tokom indukcije endotelne diferencijacije. Ćelije su slikane pod faznim kontrastom sedmog i četrnaestog dana indukcije endotelne diferencijacije, kultivisanjem u 3 različita diferencijaciona medijuma: EDM1 (50 ng/ml VEGF), EDM2 (0.5 μ M SB505124) i EDM3 (50 ng/ml VEGF i 0.5 μ M SB505124). Ćelije kultivisane u standardnom medijumu (SM) služile su kao negativna kontrola. Prikazane su reprezentativne mikrofografije. Uveličanje 100x.

Tubulogeni kapacitet UC-MSK diferenciranih u endotelske ćelije. Tokom endotelske diferencijacije ćelija, praćeno je i njihovo funkcionalno svojstvo formiranja mreže tubula na kolagenom matriksu *in vitro* (**Slika 36**). Kontrolne ćelije ispoljavale su nizak nivo spontane tubulogeneze. Ćelije stimulisane VEGF-om i SB505124 pokazale su veći kapacitet za formiranje tubula. Najveći broj povezanih izduženih ćelija primećen je nakon zajedničkog tretmana sa VEGF-om i SB505124 inhibitorom (EDM3).

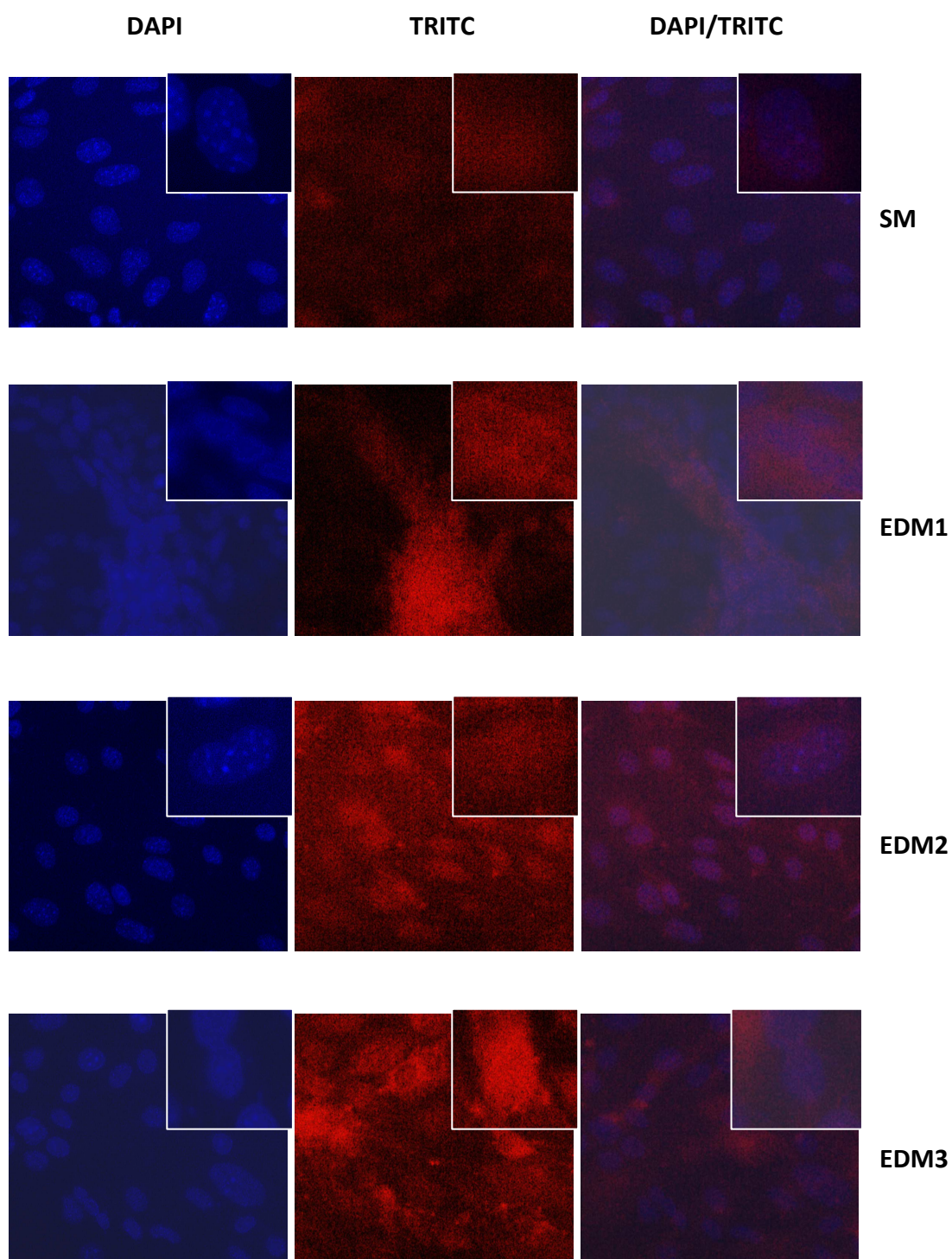


SLIKA 36. Tubulogeni kapacitet UC-MSK diferenciranih u endotelske ćelije. UC-MSK su nakon 14 dana indukcije endotelske diferencijacije, kultivisanjem u tri različita diferencijaciona medijuma: EDM1, EDM2 i EDM3, zasejane na kolagen. Nakon 24h inkubacije, formiranje mreže tubula dokumentovano je na svetlosnom mikroskopu. Prikazane su reprezentativne mikrografije. Uveličanje 100x

Ekspresija proteina specifičnih za endotelske ćelije u UC-MSK nakon indukcije diferencijacije. Kao fenotipsku potvrdu diferencijacije UC-MSK u endotelske ćelije, nakon 14 dana kultivacije u različitim uslovima, ćelije su obeležene antitelima na CD31 (**Slika 37**) i vWf (**Slika 38**), proteinske markere karakteristične za endotelske ćelije. Ćelije gajene u sva tri diferencijaciona medijuma pokazale su pozitivnu ekspresiju oba proteina, a najjača ekspresija primećena je kod ćelija ko-tretiranih VEGF-om i SB505124 inhibitorom. U kontrolnim ćelijama pokazano je potpuno odsustvo endotelskih markera. Na ovaj način, dokazana je uspešna diferencijacija UC-MSK u endotelske ćelije.



SLIKA 37. Ekspresija CD31 antigena u UC-MSC diferenciranim u endotelne ćelije. Ćelije su nakon 14 dana indukcije endotelne diferencijacije, kultivisanjem u tri različita diferencijaciona medijuma: EDM1, EDM2 i EDM3, obeležene FITC-konjugovanim antitelom na CD31 i DAPI-jem. Ćelije kultivisane u SM-u služile su kao negativna kontrola. Ekspresija CD31 dokumentovana je na fluorescentnom mikroskopu. Prikazane su reprezentativne mikrografije. Uveličanje 200x.



SLIKA 38. Ekspresija vWf u UC-MSC diferenciranim u endotelne ćelije. Ćelije su nakon 14 dana indukcije endotelne diferencijacije, kultivisanjem u tri različita diferencijaciona medijuma: EDM1, EDM2 i EDM3, obeležene TRITC-konjugovanim antitelom na vWf i DAPI-jem. Ćelije kultivisane u SM-u služile su kao negativna kontrola. Ekspresija vWf dokumentovana je na fluorescentnom mikroskopu. Prikazane su reprezentativne mikrografije. Uveličanje 200x.

5. DISKUSIJA



5.1. EFEKTI I MEHANIZMI DELOVANJA IL-17 NA MULTIPOTENTNE MEZENHIMSKE ĆELIJE

Iako je poznato da je IL-17, citokin produkovan prvenstveno od Th17 ćelija, uključen u regulaciju raznovrsnih bioloških aktivnosti u mnogim somatskim tkivima, njegovi efekti, mehanizmi i značaj delovanja na mnoge ćelije u organizmu, među njima i na mezenhimske matične ćelije još uvek nisu dovoljno istraženi. Najnoviji radovi u ovoj oblasti ukazali su da je IL-17 faktor rasta za mišje i humane MSC (*Huang i sar., 2006; Huang i sar., 2009, Mojsilović i sar., 2011*), kao i da ima ulogu regulatora diferencijacije mezenhimskih matičnih ćelija, jer stimuliše osteogenu diferencijaciju humanih MSC (*Huang i sar., 2009*), dok s druge strane inhibira adipogenezu humanih MSC poreklom iz kostne srži (*Shin i sar., 2009*). Deo istraživanja sprovedenih u okviru ove doktorske disertacije bio je posvećen rasvetljavanju uloge IL-17 u regulaciji diferencijacije mezenhimskih ćelija, na modelu C2C12 ćelijske linije. Diferencijacija je usmeravana u pravcu miogene i osteogene loze, i određivani su molekularni mehanizmi koji leže u osnovi delovanja ovog citokina.

IL-17 inhibira miogenu diferencijaciju i indukuje osteogenu diferencijaciju C2C12 mezenhimskih ćelija

Inhibitorni efekat IL-17 na miogenezu, povezan sa smanjenom ekspresijom proteina i gena relevantnih za mišićnu diferencijaciju, je nova regulatorna uloga citokina, pokazana po prvi put u ovoj studiji. Efekat IL-17 na miogenu diferencijaciju je prvo zapažen na nivou formiranja miotuba i značajno umanjene ekspresije marker proteina za diferencirane mišićne ćelije, MyHC, u C2C12 ćelijama kultivisanim u prisustvu IL-17. S obzirom na to da je diferencijacija skeletnih mišićnih ćelija regulisana aktivacijom transkripcionog faktora miogenina, koji pripada familiji MyoD proteina (*Asakura i sar., 2001; Wada i sar., 2002; Aziz i sar., 2009*), uočena IL-17-indukovana inhibicija ekspresije iRNK za miogenin, kao i inhibicija aktivnosti njegovog reportera, potvrdila je negativan uticaj IL-17 na miogenu diferencijaciju.

Skeletno mišićno tkivo poseduje sposobnost ekstenzivne regeneracije i reparacije nakon povrede i to putem aktivacije satelitskih ćelija prisutnih *in situ*, indukujući njihovu proliferaciju, migraciju na mesto oštećenja i diferencijaciju u adultne mišićne ćelije

(Leloup i sar., 2007; Morgan, 2003). S obzirom na to da IL-17 u našim eksperimentalnim uslovima nije doveo do promene u proliferaciji C2C12 ćelija, ali jeste inhibirao njihovu migraciju, moguće je da, pored toga što utiče na smanjenje ekspresije miogenina i MyHC, IL-17 svoj inhibitorski efekat na miogenu diferencijaciju C2C12 ćelija postiže, delom preko redukcije migratornog kapaciteta ćelija, na ovaj način sprečavajući kontakt i fuziju mioblasti, što konačno onemogućava formiranje višejedarnih miofibrila (Leloup i sar., 2007). Mali broj kratkih miofibrila primećen nakon kultivacije ćelija u miogenom diferencijacionom medijumu u prisustvu IL-17 potvrđuje ovu pretpostavku. Ipak, dalja istraživanja su neophodna kako bi se detaljno i sa sigurnošću utvrdila uloga IL-17 u ćelijskoj fuziji uključenoj u miogenu diferencijaciju. Važno je naglasiti da su slični, naizgled kontradiktorni rezultati, objavljeni i u vezi uloge IL-17 u procesu adipogene diferencijacije. Naime, novija studija koju su objavili Lee i sar. (2011) pokazala je da IL-17 pojačava adipogenu diferencijaciju C2C12 ćelija u uslovima koji podržavaju adipogenezu, dok je studija Shin i sar. (2009) ukazala na inhibitorski efekat IL-17 na adipocitnu diferencijaciju humanih MSC poreklom iz kostne srži. Ovi rezultati sugerišu da kontrola ćelijskih funkcija, uključujući i proces diferencijacije, umnogome zavisi od složenih interakcija koje se u specifičnoj mikrosredini ostvaruju između citokina i različitih ciljnih ćelija.

Rezultati dobijeni u okviru ovog rada vezani za IL-17-indukovanu stimulaciju osteogene diferencijacije C2C12 ćelija saglasni su sa skoro objavljenim rezultatima koji su pokazali da IL-17 ima sposobnost da stimuliše osteogenu diferencijaciju humanih MSC, nezavisno od svog delovanja na ćelijsku proliferaciju (Huang i sar., 2009). S obzirom na to da se proces diferencijacije odvija paralelno sa umanjenom proliferacijom ćelija, sugerirana je mogućnost i da samo smanjenje stepena ćelijskog rasta može uzrokovati viši stepen diferencijacije. Međutim, s obzirom da su rezultati dobijeni u ovom radu, kao i rezultati drugih grupa pokazali da IL-17 ne dovodi do promena u dinamici proliferacije kako C2C12 ćelijske linije, tako i humanih MSC (Huang i sar., 2009), razumljivo je pretpostaviti i da efekti IL-17 na diferencijaciju C2C12 ćelija nisu posledica izmenjene proliferacije. Pored toga, naši rezultati, u saglasnosti sa prethodno objavljenim rezultatima (Huang i sar., 2009), koji su pokazali da IL-17 snažno indukuje osteogenu diferencijaciju u odsustvu bilo kojih dodatnih osteogenih signala, čak i u medijumu koji potvrđeno indukuje miogenezu C2C12 ćelija, ukazuju da indukcija osteogene diferencijacije od strane IL-17 nastupa paralelno sa inhibicijom miogene diferencijacije. Diferencijacija ćelija u pravcu

određene ćelijske loze uz istovremenu supresiju alternativnih fenotipova, određena je aktivacijom specifičnih signalnih molekula i transkripcionih faktora (Yi i sar., 2010). Poznato je da je Runx2/Cbfa1 esencijalni transkripcioni faktor koji određuje opredeljenost ćelija za osteogenu diferencijaciju (Komori, 2003) kao i da ovaj transkripcioni faktor indukuje transdiferencijaciju primarnih skeletnih mioblasta u osteoblaste (Gersbach i sar., 2004). Stoga, rezultati prikazani u ovom radu, koji pokazuju da IL-17 indukuje ekspresiju Runx2/Cbfa1, potvrđuju induktivni uticaj IL-17 na osteogenu diferencijaciju i upućuju na jedan od mogućih mehanizama putem kojeg IL-17 podstiče osteogenu diferencijaciju C2C12 ćelija. Poznato je i da Cox-2 gen, koji se aktivira rano kao odgovor na inflamatorne stimuluse na mestu inflamacije (Dubois i sar., 1998), takođe može biti značajan za osteogenu diferencijaciju ćelija (Zhang i sar., 2002). Stoga, podaci dobijeni u ovoj studiji, koji su pokazali da IL-17 stimuliše ekspresiju Cox-2 u C2C12 ćelijama, potvrđuju prethodno objavljene podatke, prema kojima se intenzitet IL-17-indukovane osteogene diferencijacije humanih MSC pojačava paralelno sa povećanjem ekspresije Cox-2 (Huang i sar., 2009). Iako ovi rezultati upućuju da se, bar delom, stimulatorni efekat IL-17 na osteogenu diferencijaciju ostvaruje preko indukcije ekspresije Cox-2, neophodna su dodatna istraživanja kako bi se odredila tačna uloga Cox-2 u IL-17-indukovanoj osteogenoj diferencijaciji C2C12 mioblasta.

ERK1,2 signalni put uključen je u IL-17-indukovanu inhibiciju miogeneze i u IL-17-indukovanu stimulaciju osteogeneze

Međusobna povezanost ekstracelularnih signala i transkripcione regulacije predstavlja ključnu komponentu u određivanju smera ćelijske diferencijacije. MAPK su jedan od najčešće istraživanih signalnih puteva (Gaffen, 2009a; Jaiswal i sar., 2000). Prema prethodnim nalazima, MAPK su ključne za razvoj i diferencijaciju mišića (Keren i sar., 2006), kao i za indukciju osteogene diferencijacije (Leloup i sar., 2007). U ovom kontekstu, pokazano je da aktivacija ERK1,2 MAPK inhibira miogenu diferencijaciju indukovanu od strane FGF-a i TGF- β , a takođe se pretpostavlja da je ovo esencijalni signalni put uključen u opredeljenje MSC za osteogenu i adipogenu diferencijaciju (Jaiswal i sar., 2000; Gallea i sar., 2001; Arita i sar., 2011; Yang i sar., 2006). Kada je u pitanju IL-17, pokazano je da sva tri tipa MAPK mogu biti aktivirana od strane ovog citokina, u različitim tipovima ćelija, ali na način specifičan za svaki pojedinačni ćelijski

tip (*Gaffen, 2008; Ivanov i Linden, 2009; Xu i Cao, 2010; Krstić i sar., 2009a*). U dodatnim eksperimentima rađenim u našoj Laboratoriji, koji nisu deo ove disertacije, zapažena je aktivacija ERK1,2 MAPK od strane IL-17 u L6E9 pacovskim mioblastima, kao i u primarnim humanim MSC.

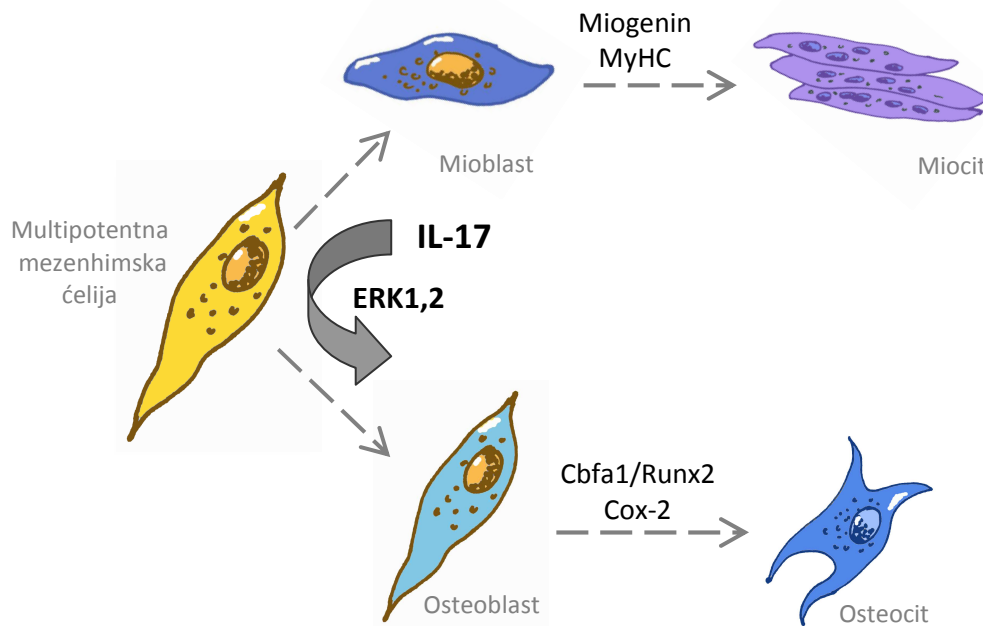
Rezultati naših istraživanja pokazali su da IL-17 povećava nivo fosforilisanih formi ERK1,2 i p38 MAPK u C2C12 ćelijama, dok ekspresija fosforilisane forme JNK nije bila detektovana kako u netretiranim kontrolama, tako ni u ćelijama inkubiranim sa IL-17, ukazujući na učešće MAPK signalizacije u IL-17 indukovanim efektima. Iako zapaženo odsustvo efekta IL-17 na aktivaciju JNK MAPK treba tumačiti sa predostrožnošću, s obzirom da su prethodno objavljeni rezultati pokazali da je JNK signalni put uključen u miostatin-zavisnu inhibiciju miogene diferencijacije C2C12 ćelija (*Huang i sar., 2007*), naša dalja istraživanja su bila prevashodno usmerena na određivanje značaja p38 i ERK1,2 MAPK signalizacije u IL-17 indukovanim efektima.

Primenom specifičnih farmakoloških inhibitora za p38 i ERK1,2 MAPK pokazano je različito učešće ove dve MAPK u regulaciji IL-17-indukovane opredeljenosti C2C12 ćelija za diferencijaciju. Naime, iako je IL-17 povećao fosforilaciju p38 MAPK u C2C12 ćelijama, inhibicija ovog signalnog molekula blokirala je, kako miogenu tako i osteogenu diferencijaciju ćelija, nezavisno od prisustva IL-17. Ovakav rezultat potvrdio je da je aktivacija p38 neophodna za regulaciju procesa diferencijacije u pravcu obe loze, kao što je i prethodno pokazano (*Luo i sar., 2010; Keren i sar., 2006*).

S druge strane, inhibicija fosforilacije ERK1,2 preokrenula je inhibiciju miogene diferencijacije uzrokovanu prisustvom IL-17, i to eliminišući kako redukciju u broju miotuba, tako i umanjenju ekspresiju MyHC i miogenina. Inhibicija ERK1,2 MAPK preokrenula je i IL-17-indukovanu osteogenu diferencijaciju C2C12 ćelija, blokiranjem ekspresije Runx2/Cbfa1, kao i aktivnosti ALP. Pored toga, ektopična ekspresija caMEK1 u transfektovanim ćelijama rezultirala je u značajnom povećanju ekspresije Runx2/Cbfa1, potvrđujući uključenost ERK1,2 u osteogenoj diferencijaciji indukovanoj od strane IL-17. U skladu sa našim rezultatima, su i ranije objavljeni nalazi koji su pokazali da ERK MAPK kontroliše ekspresiju Runx2/Cbfa1, upućujući na to da ovaj signalni put ima važnu ulogu u kontroli ekspresije gena specifičnih za osteoblaste (*Xiao i sar., 2000; Ge i sar., 2009*). Međutim, poznato je da je aktivacija ERK važna ne samo za proces osteogeneze (*Deschaseaux i sar., 2009*), već i za hondrogenezu (*Oh i sar., 2000*) i miogenezu (*Yang i sar., 2006*), pri čemu je važno naglasiti da je učešće ERK1,2 u inhibiciji ili u indukciji

određenog procesa diferencijacije zavisno od tipa ćelija koji je korišćen u istraživanju (Yang *i sar.*, 2006). Kako je poznato da ista mreža signalnih komponenti koordinira brojne ćelijske funkcije inicirane različitim regulatorima, a mehanizmi koji obezbeđuju selektivnu diferencijaciju različitih ćelijskih loza nisu još u potpunosti razjašnjeni, u ovom trenutku, možemo jedino da pretpostavimo da IL-17 indukuje osteogenu diferencijaciju aktivirajući istovremeno ERK1,2 i p38 intracelularne puteve u C2C12 ćelijama, održavajući strogu ravnotežu između ove dve MAPK. U slučajevima kada je potreban „prekidač” za opredeljenost, bilo u pravcu miogene ili osteogene loze, aktivacija ERK1,2 postaje ključni signal koji se aktivira. Iako ova pretpostavka mora biti u potpunosti dokazana, rezultati prikazani u ovom radu po prvi put upućuju da IL-17, posredstvom ERK1,2 MAPK pokreće novi signalni mehanizam odgovoran za lozno-specifičnu opredeljenost C2C12 ćelija.

Prema prethodnim saznanjima, C2C12 mioblasti se mogu transdiferencirati u osteoblaste nakon stimulacije BMP proteinima (Yamamoto *i sar.*, 1997; Luo *i sar.*, 2010). Kanonski signalni put BMP posredovan je ALK1/2/3/6 receptorima tipa I koji fosforilišu Smad1, Smad5 i Smad8 signalnih molekula (Santibanez *i sar.*, 2011). C2C12 ćelije uglavnom eksprimiraju ALK2, uz nisku ekspresiju ALK3 i ALK6 receptora. Pored toga, noviji rezultati ukazuju da BMP-9 ima sposobnost indukcije osteogeneze putem ALK1 i ALK2 receptora u C2C12 ćelijama (Luo *i sar.*, 2010). Takođe, u C2C12 ćelijama kultivisanim u standardnim uslovima detektovana je i ekspresija BMP receptora tipa II, kao i izostanak aktivnosti molekula BMP-2, BMP-6 i BMP-7 (Zilberberg *i sar.*, 2007). Imajući ove podatke u vidu, naši dalji eksperimenti, u kojima smo koristili ALK2 mutantne konstrukte, bili su usmereni ka rasvetljavanju pitanja da li je BMP-Smad signalni put uključen u lozno-zavisnu opredeljenost koju indukuje IL-17 u C2C12 ćelijama. Dobijeni rezultati pokazali su da IL-17 ne dovodi do aktivacije BMP-Smad signalnog puta u C2C12 ćelijama. Pored toga, podaci dobijeni nakon „uključivanja”, odnosno „isključivanja” ALK2 receptora, odgovornog za inicijaciju BMP signalnog puta, pokazali su da IL-17 aktivira Runx2/Cbfa1 transkripcioni faktor bez obzira na aktivnost ALK2. Iz ovih rezultata mogli smo da zaključimo da je IL-17-indukovana osteogena diferencijacija C2C12 ćelija posredovana ERK1,2 signalnim putem, nezavisno od BMP signalizacije. Ovakav zaključak u saglasnosti je sa drugim objavljenim rezultatima koji potvrđuju postojanje BMP-nezavisnih mehanizama uključenih u osteogenu diferencijaciju C2C12 ćelija (Osses *i sar.*, 2009).



SLIKA 39. IL-17 modulira opredeljenost C2C12 ćelija tako što inhibira njihovu miogenu diferencijaciju putem inhibicije ekspresije miogenina i MyHC i indukuje njihovu osteogenu diferencijaciju, tako što utiče na povećanje ekspresije Runx2/Cbfa1 i Cox-2 proteina. Promena opredeljenosti ćelija nastala dejstvom IL-17, posredovana je aktivacijom ERK1,2 MAPK.

Istraživanje regulacije opredeljenosti ćelija za miogenu ili osteogenu lozu od strane IL-17 od važnosti je za razumevanje patogeneze inflamatornih oboljenja u mišićima i kostima, koja uključuju infiltraciju Th17 ćelija u tkivo i sintezu IL-17, poput polimiozitisa, dermatomiozitisa i reumatoidnog artritisa (Chevrel, 2003; Tournadre i sar., 2010; Chabaud i sar., 1999; Kotake i sar., 1999). Inflamacija nastala u mišićnom tkivu takođe može indukovati formiranje ektopičnog koštanog tkiva (Hashimoto i sar., 2007; McCarthy i Sundaram, 2005). Za nastanak svih navedenih patoloških stanja prisustvo multipotentnih, neopredeljenih ćelija u tkivu je od suštinske važnosti (McCarthy i Sundaram, 2005). Međutim, iako još uvek nema dovoljno dokaza koji bi potvrdili prisustvo IL-17 u tkivu zahvaćenom inflamacijom tokom formiranja ektopičnog koštanog tkiva, uvereni smo da je ovo pitanje vredno istraživanja u budućnosti. Prema brojnim publikacijama koje pokazuju da je glavna biološka uloga IL-17 da deluje poput citokina za finu regulaciju u povećavanju ili redukovanju imunskog i hematopoetskog odgovora (Ivanov i Linden, 2009; Jovčić i sar., 2007; Chabaud i sar., 1999), IL-17 može biti deo regulatorne mreže koja ima sposobnost da izmeni ravnotežu u opredeljenosti mioblasta u pravcu osteogene ili miogene diferencijacije. Takođe, IL-17 može biti i jedan od kandidata koji mogu biti

uključeni u destrukciju mišića u miopatijama ili u patološkom formiranju koštanog tkiva u mišićima. Iako naši podaci, kao i drugi objavljeni rezultati, upućuju da je IL-17 sposoban da indukuje osteogenu diferencijaciju (Huang i sar., 2009; Rifas i sar., 2003), dalja ispitivanja, kako *in vivo* tako i *in vitro* neophodna su da potvrde ovu hipotezu.

Gledano u celini, rezultati istraživanja efekata IL-17 na mezenhimske ćelije idu u prilog mišljenju da IL-17 učestvuje u regulaciji miogene i osteogene diferencijacije C2C12 ćelija, s obzirom na to da je IL-17-zavisna inhibicija miogeneze povezana sa redukcijom ekspresije iRNK za miogenin, redukcijom ekspresije MyHC i formiranja miotuba, dok je IL-17-zavisna indukcija osteogeneze povezana sa indukcijom ekspresije iRNK za Runx2/Cbfa1, indukcijom ekspresije Cox-2 i aktivnosti ALP (Slika 39). Rezultati su takođe pokazali da IL-17 ostvaruje ove efekte putem aktivacije ERK1,2 MAPK signalnog puta, nezavisno od BMP-Smad signalnog puta. Može se zaključiti da IL-17 modulira ložno-zavisnu opredeljenost C2C12 mioblasta *in vitro* indukujući osteogenu i istovremeno inhibirajući miogenu diferencijaciju.

5.2. EFEKTI IL-17 NA FUNKCIJE ENDOTELSKIH ĆELIJA KULTIVISANIH U USLOVIMA RAZLIČITE KONCENTRACIJE KISEONIKA

Određivanje zastupljenosti kiseonika u organizmu ukazalo je na različit procenat kiseonika u različitim organima, u rasponu od 0.5% to 14% (Ivanović, 2009a), upućujući da se i efekti biološki aktivnih molekula mogu razlikovati u zavisnosti od koncentracije kiseonika u mikrosredini. Takođe, postoje i mišljenja da standardna *in vitro* istraživanja, koja se sprovode u prisustvu 20% kiseonika, mogu dovesti do pogrešnih zaključaka kada su u pitanju ćelijski odgovori na citokine *in vivo*, budući da ova koncentracija kiseonika nije uporediva sa onom u fiziološkim uslovima (Ivanović, 2009a). Efekti IL-17 na angiogenezu prethodno su ispitivani najčešće u kontekstu patoloških stanja povezanih sa angiogenezom, poput tumora i reumatoidnog artritisa (Liu i sar., 2011; Numasaki i sar., 2005; Pickens i sar., 2010; Numasaki i sar., 2003). Međutim, iako se pomenuta oboljenja karakterišu hipoksičnim uslovima, prethodna istraživanja nisu uzimala u obzir koncentraciju O₂ u mikrosredini. U ovoj studiji ispitivani su efekti IL-17 na endotelne ćelije i njihove funkcije značajne za proces angiogeneze, pri čemu je praćen i uticaj različitih koncentracija kiseonika.

Efekti koje IL-17 ostvaruje na funkcije endotelskih ćelija razlikuju se u zavisnosti od koncentracije kiseonika u mikrosredini

Rezultati prikazani u ovom radu pokazali su da su EA.hy 926 ćelije izuzetno osetljive na nisku koncentraciju kiseonika u atmosferi, s obzirom na to da je broj vijabilnih ćelija nakon kultivacije u uslovima hipoksije (3% O₂) značajno opadao i bitno se razlikovao od visokog proliferativnog kapaciteta određenog u uslovima normoksije (20% O₂). Ovaj nalaz potvrđen je i određivanjem apoptotskih profila ćelija kultivisanih u uslovima normoksije i hipoksije, s obzirom na to da je niska koncentracija kiseonika povećala broj apoptotičnih ćelija u kulturama. Različita reaktivnost endotelskih ćelija na različite stepene oksigenacije u kulturama *in vitro* je u skladu sa prethodno objavljenim radovima u kojima je pokazano da umerena hipoksija može indukovati proliferaciju, preživljavanje, migraciju ćelija i formiranje vaskulature, dok značajno niži procenat O₂ može dovesti do visokog stepena apoptoze (Fong, 2009).

Određivanje uticaja IL-17 na endotelske ćelije je pokazalo da ovaj citokin nema značajnog efekta na proliferaciju EA.hy 926 ćelija kultivisanih na 20% O₂, kao i da ne dovodi do značajnih promena u broju i odnosu vijabilnih i apoptotičnih ćelija. Međutim, za razliku od uslova normoksije, u uslovima hipoksije, pri kultivisanju u prisustvu 3% O₂, IL-17 je pokazao protektivno dejstvo na ćelije, koje je bilo najizraženije pri koncentraciji od 100 ng/ml. Naime, ova koncentracija citokina sačuvala je vijabilnost ćelija, snižavajući broj apoptotičnih ćelija za 20%. Naša ranija ispitivanja pokazala su da IL-17 ispoljava sličan protektivni efekat i na humane hematopoetske ćelije izolovane iz periferne krvi, pogotovu na matične ćelije opredeljene za eritrocitnu lozu, s obzirom da je značajno povećavao proliferaciju eritroidnih progenitora u ko-kulturama sa MSC nakon inkubacije na 3% O₂, dok je porast proliferacije bio značajno niži pri kultivaciji na 20% O₂ (*Krstić i sar., 2009*).

Različita reaktivnost endotelskih ćelija na različite stepene oksigenacije u kulturama *in vitro* potvrdila se i prilikom ispitivanja uticaja IL-17 i različitih koncentracija kiseonika na migratornu sposobnost EA.hy 926 ćelija, s obzirom da je u našim eksperimentima hipoksija uzrokovala značajno smanjenje migracije EA.hy 926 ćelija. Smanjen stepen migracije EA.hy 926 ćelija u prisustvu 3% O₂, slično proliferaciji, potvrdio je da je nizak stepen oksigenacije u izvesnoj meri toksičan za ovu ćelijsku liniju.

Određivanje uticaja IL-17 pokazalo je da je ovaj citokin stimulisao migraciju EA.hy 926 ćelija kultivisanih u prisustvu 20% O₂, ali njegovim dodavanjem nije bila prevaziđena inhibicija migracije nastala kultivisanjem ćelija na 3% O₂. Ovaj rezultat u saglasnosti je sa novijim istraživanjima, sprovedenim na standardnih 20% O₂, na humanim dermalnim endotelskim ćelijama (*Moran i sar., 2011*) i humanim endotelskim ćelijama mikrovaskulature pluća (*Pickens i sar., 2010*), koji su ukazali da je proangiogena uloga IL-17 delom posredovana indukcijom ćelijske migracije.

Za razliku od proliferacije i migracije, kapacitet EA.hy 926 ćelija da formiraju tubule nije bio izmenjen pri kultivisanju u uslovima i normoksije i hipoksije, dok je u prisustvu IL-17, na obe koncentracije kiseonika, sposobnost EA.hy 926 ćelija za tubulogenezu bila veća, potvrđujući proangiogenu ulogu ovog citokina.

Dobijeni rezultati koji se odnose na uobičajene funkcije endotelskih ćelija uključene u proces angiogeneze: proliferaciju, migraciju i formiranje tubula, analizirane u prisustvu 20% O₂, potvrđuju prethodne rezultate koji su ukazali da je IL-17 citokin sa proangiogenim delovanjem (*Numasaki i sar., 2003, 2005; Pickens i sar., 2010*). Međutim, od

posebne je važnosti osvrnuti se na naše rezultate koji su pokazali da koncentracija O₂ od 3% ispoljava toksično dejstvo na EA.hy 926 ćelije. S obzirom na to da se radi o ćelijskoj liniji, moguće je da su se ove ćelije vremenom adaptirale na koncentraciju kiseonika koja je značajno viša od one u fiziološkim uslovima, dok je 3% O₂, iako bliža *in vivo* mikrosredini, postala toksična za njih. Imajući ovo u vidu, smatramo da je potrebno posebno sagledavati uticaj koncentracije kiseonika u zavisnosti od toga da li se u eksperimentalnom pristupu koriste primarne ćelije, koje su „naviknute” na nisku koncentraciju O₂ u fiziološkim uslovima, ili besmrtnne ćelijske linije koje su izmenjene i već dugo vremena izložene standardizovanim uslovima kultivacije na 20% O₂.

Aktiviranje unutarćelijskih molekularnih mehanizama od strane IL-17 zavisi od procenta kiseonika u mikrosredini

Ispitivanja molekularnih mehanizama koji se nalaze u osnovi delovanja IL-17 na endotelske ćelije započeli smo određivanjem uticaja IL-17 na ekspresiju gena za eNOS i Cox-2, kao i njihovih proteinskih produkata u EA.hy 926 ćelijama. Poznato je da endotelske ćelije ekspimiraju dve forme ciklooksigenaze: Cox-1 (konstitutivna forma) i Cox-2 (inducibilna forma) koje katalizuju konverziju arahidonske kiseline u prostaglandin H₂ (Cook-Johnson i sar., 2006). Smatra se da je proangiogena uloga Cox-2 posredovana indukcijom sinteze prostanoida, koji zatim stimulišu ekspresiju drugih proangiogenih faktora (Iñiguez i sar., 2003). Rezultati dobijeni u eksperimentima sa EA.hy 926 ćelijama pokazali su da je ekspresija Cox-2 povećana u prisustvu IL-17 što je u saglasnosti sa ranijim studijama koje su pokazale da Cox-2, koji nije ekspimiran u normalnim fiziološkim uslovima, može biti visoko ekspimiran nakon stimulacije proinflamatornim citokinima (Kim i sar., 2011), poput IL-17 (Hirata i sar., 2011). Ekspresija Cox-2 bila je niža u EA.hy 926 ćelijama kultivisanim na 3% O₂, suprotno prethodnim nalazima koji su demonstrirali da hipoksija utiče na povećanje ekspresije Cox-2 u različitim tipovima ćelija, među kojima su i humane endotelske ćelije iz umbilikalne vene (HUVEC, *Human umbilical vein endothelial cells*) (Cook-Johnson i sar., 2006). Međutim, potrebno je naglasiti da je ekspresija Cox-2 pokazana u našim rezultatima bila u korelaciji sa prethodno dobijenom angiogenim reaktivnošću EA.hy 926 ćelija na IL-17. Naime, u uslovima kada je detektovana povišena ekspresija Cox-2 (kultivacija u prisustvu IL-17 na 20% O₂), stimulisane su kako migracija, tako i sposobnost EA.hy 926 ćelija za

tubulogenezu. S druge strane, smanjenje ekspresije Cox-2 na 3% O₂ dešava se uporedo sa smanjenom migracijom ćelija. Međutim, da bi se potvrdile pretpostavke da je Cox-2 medijator angiogenih efekata IL-17, moraju biti sprovedena dodatna molekularna istraživanja.

NO je dobro istražen reaktivni molekul sa ubikvitarnom ekspresijom i mnogobrojnim fiziološkim funkcijama, od kojih je najpoznatija uloga u održavanju vaskularnog tonusa (*Michel i sar., 1997; Ho i sar., 2012*). Kod sisara postoje tri izoforme enzima koje učestvuju u sintezi NO iz aminokiseline L-arginina: neuronska NO sintaza (nNOS), inducibilna NO sintaza i endotelska NO sintaza. eNOS ima ključnu ulogu u postnatalnoj angiogenezi, jer NO koji sintetiše učestvuje u prenosu unutarćelijskih signala aktiviranih angiogenim faktorima (*Forstermann i Sessa, 2012*). Prethodno objavljeni rezultati pokazali su da je NO važan medijator različitih efekata koje IL-17 ispoljava delujući na hematopoetske progenitore i to putem aktivacije eNOS i iNOS (*Krstić., 2009; Bugarski i sar., 2004; Jovčić i sar., 2004; Krstić i sar., 2010*). Novija istraživanja ukazala su na postojanje složenih funkcionalnih interakcija između NO i O₂ koje mogu biti od velikog značaja za razvoj nekih oboljenja, posebno onih koja su povezana sa hipoksičnim uslovima u tkivu (*Ho i sar., 2012*). Rezultati dobijeni u ovom radu pokazali su da IL-17 stimuliše ekspresiju eNOS u EA.hy 926 ćelijskoj liniji, kako na 20% O₂, tako i na 3% O₂, sa primetnijom razlikom u ekspresiji na nivou iRNK. Takođe, saglasno prethodnim saznanjima (*Ho i sar., 2012*), ekspresija iRNK za eNOS niža je u uslovima hipoksije. Povišena ekspresija eNOS indukovana IL-17 u EA.hy 926 ćelijama upućuje na to da NO može biti posrednik u smanjenju apoptoze ovih ćelija, budući da su ranija istraživanja pokazala da NO pozitivno deluje na preživljavanje endotelskih ćelija (*Dimmeler i Zeiher, 1999*). Da bi se sa sigurnošću utvrdilo da li NO posreduje u pro-angiogenim efektima IL-17, neophodna su detaljnija istraživanja na molekularnom nivou.

Uloga IL-17 u angiogenezi još uvek nije u potpunosti definisana. Međutim, opšte je prihvaćeno da je IL-17 citokin sa proangiogenim delovanjem (*Numasaki i sar., 2003, 2005; Pickens i sar., 2010*). Eksperimenti sprovedeni na mišjem modelu reumatoidnog artritisa pokazali su da IL-17 povećava vaskularnost u zglobovima miša i stimuliše formiranje krvnih sudova *in vivo* (*Pickens i sar., 2010*). Takođe, stimulatívni efekat IL-17 utvrđen je u eksperimentu neovaskularizacije rožnjače pacova (*Numasaki i sar., 2003*). Bitno je naglasiti da mikrosredinu tumora i sinovijalno tkivo reumatoidnog artritisa

karakteriše nizak nivo kiseonika (*Ng i sar., 2010*), kao i da su oštećena tkiva tipično hipoksična i bogata infiltriranim imunskim ćelijama koje eksprimiraju visok stepen angiogenih faktora (*Fong, 2009*), između ostalih i IL-17. Osim toga, hipoksija u tumorima indukuje angiogenezu kao i aktivaciju imunosupresivnih mehanizama (*Tartour i sar., 2011*). Uzimajući u obzir prethodna saznanja, istraživanja ćelijskog odgovora na delovanje IL-17 u korelaciji sa različitim koncentracijama O₂ u mikrosredini od velikog su značaja.

Imajući u vidu rezultate prikazane u ovom delu disertacije, možemo potvrditi da IL-17 stimuliše ključne događaje uključene u proces angiogeneze EA.hy 926 endotelskih ćelija, poput ćelijske migracije i tubulogeneze, kao i ekspresiju eNOS i Cox-2. Pro-angiogeni efekti IL-17 primećeni su u prisustvu 20% O₂, dok je za koncentraciju kiseonika od 3% utvrđeno da ima toksično dejstvo na ovu ćelijsku liniju. Istraživanja u sklopu ove studije omogućila su delimičan uvid u raznovrsnost modulacije ćelijskih funkcija od strane IL-17, a u uslovima različitih koncentracija O₂. Da bi se konačno rasvetlili efekti i mehanizmi koji se nalaze u osnovi delovanja ovog citokina neophodna su dodatna istraživanja, uz zapažanje da i sama koncentracija O₂ treba biti izabrana u skladu sa poreklom i karakteristikama ćelija koja se koriste u eksperimentima.

5.3. USPOSTAVLJANJE MODELA ZA DIFERENCIJACIJU MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA U ENDOTELSKE ĆELIJE

Mezenhimske matične ćelije, prisutne u brojnim adultnim tkivima (*Kassis i sar., 2006; Locke i sar., 2011; Salem i Thiernemann, 2010*), predstavljaju prirodni rezervoar za regeneraciju tkiva, poseduju sposobnost usmerene mobilizacije na mesto oštećenja, visok proliferativni potencijal kao i kapacitet za diferencijaciju u različite tipove ćelija (*Caplan, 2007; Chamberlain i sar., 2007; Giordano i sar., 2007*). S obzirom na njihove neprocenljive regenerativne, angiogene i imunosupresivne osobine koje ukazuju na njihov ogroman terapijski potencijal, MSC su izazvale veliko interesovanje za istraživanja u oblasti biomedicine, a ispituju se i u nekoliko oblasti kliničkih istraživanja (*Brooke i sar., 2007; Trounson i sar., 2011*). Istraživanja izvedena poslednjih godina dovela su do saznanja da se MSC, u zavisnosti od njihovog izvora, razlikuju prema kapacitetu za diferencijaciju, prema brzini proliferacije, sposobnosti za dugotrajnu ekspanziju, sposobnosti imunosupresije i drugim osobinama. Jedno od ključnih pitanja vezanih za MSC kada je u pitanju njihova klinička primena jeste njihova dostupnost. Tkivo pupčanika, koje se rutinski odbacuje nakon porođaja, predstavlja lako dostupan, siguran i etički nekompromitovan izvor za dobijanje MSC. Shodno svemu navedenom, jedan od ciljeva u okviru ove studije bila je izolacija i karakterizacija MSC.

UC-MSK poseduju visok klonogeni kapacitet, odlikuju se brzom proliferacijom i visokom sposobnošću ekspanzije

MSC su izolovane iz tkiva pupčanika metodom eksplanta, na osnovu jedne od glavnih osobina MSC – adherentnosti za plastiku. UC-MSK su uspešno izolovane iz dva od šest uzoraka pupčanika, uz zapažanje da je uspeh izolacije zavisio od vremena proteklog između preuzimanja tkiva iz bolnice do početka postupka izolacije. U slučaju uspešnih izolacija, ovaj vremenski period iznosio je manje od 12 sati. Dobijene ćelije su imale karakterističnu morfologiju nalik fibroblastima. Klonogeni kapacitet UC-MSK bio je visok, budući da su ove ćelije pokazale visoku efikasnost u formiranju CFU-F. Njihova sposobnost za dugotrajnu ekspanziju, čak i više od 20 pasaža, kao i njihova brza proliferacija (vreme dupliranja populacije bilo je 30 sati) ukazali su na to da UC-MSK imaju visok kapacitet za samoobnovu, što ih svrstava u povoljne kandidate za potencijalnu

primenu. Navedeni rezultati su u skladu sa prethodno objavljenim koji su pokazali da MSC izolovane iz perinatalnih tkiva (pupčanik i placenta) poseduju viši proliferativni kapacitet u poređenju sa MSC izolovanim iz adultnih tkiva (*Kern i sar., 2006; He i sar., 2006; Bieback i Brinkmann, 2010; Hass i sar., 2011*). Karakteristike koje se odnose na proliferativni kapacitet i trajnost MSC u *in vitro* uslovima važne su u kontekstu njihove primene u ćelijskoj terapiji i tkivnom inženjerstvu, ako imamo u vidu da će u ove svrhe biti potrebne velike količine ćelija. Pomenute osobine UC-MSC omogućile bi produkciju velikog broja ćelija čak i kada bi početno bio izolovan mali broj ćelija iz tkiva.

Nekarakterističan imunofenotip UC-MSC ne isključuje njihovo mezenhimsko poreklo i multipotentnost

Jedan od kriterijuma za definisanje MSC jeste pozitivna ekspresija mezenhimskih i negativna ekspresija hematopoetskih površinskih antigena (*Dominici i sar., 2006*). Analizom UC-MSC metodom protočne citometrije utvrđena je pozitivna ekspresija CD44 kod 21% i CD34 kod 22% ćelijske populacije, dok je istovremeno utvrđena negativna ekspresija kako hematopoetskih (CD11b, CD33, CD235a, CD45) tako i nekih mezenhimskih (CD105 i CD90) antigena. Odsustvo mezenhimskih markera kod UC-MSC se može objasniti na više načina. Prvenstveno, danas ne postoji saglasnost oko univerzalnog i jedinstvenog skupa markera za mezenhimske matične ćelije, dok je istovremeno pokazano da CD105, CD90 i CD44 mogu biti eksprimirani i na humanim fibroblastima kože ili pluća (*Alt i sar., 2011; Halfon i sar., 2011*), što dalje ukazuje da je neophodno identifikovati dodatne, nove površinske molekule čijom bi se primenom sa sigurnošću definisale MSC. Takođe, imunofenotip ćelija može biti izmenjen u zavisnosti od izvora ćelija, metoda primenjenih za njihovu izolaciju, kao i uslovima *in vitro* kultivacije koji bi mogli uzrokovati gubitak površinskih proteina eksprimiranih na primarnim MSC (*Kern i sar., 2006; Roodbrouck i sar., 2011*). Pored toga, imunocitohemijskim obeležavanjem (rezultati nisu prikazani u okviru ove studije) utvrđeno je da UC-MSC eksprimiraju vimentin, glavnu citoskeletnu komponentu mezenhimskih ćelija, što ide u prilog mišljenju da ove ćelije imaju mezenhimsko poreklo, i da to nisu epitelne ili endotelske ćelije. Takođe, izolovana populacija primarnih ćelija uvek je heterogenog karaktera i sastoji se iz više ćelijskih populacija, te i u slučaju UC-MSC opisanih ovde, postoji mogućnost da deo ćelijske populacije čine MSC (CD44 pozitivne) i

endotelske progenitor ćelije (CD34 pozitivne). Detaljnije analize i sortiranje ćelija omogućile bi razjašnjenje ove dileme.

S obzirom na nekarakterističnu ekspresiju površinskih antigena, kapacitet UC-MSC za diferencijaciju u najmanje tri ćelijske loze pokazao se ključnim za utvrđivanje njihovog funkcionalnog kvaliteta, budući da je upravo ovo karakteristično biološko svojstvo MSC. U cilju potvrde njihove multipotentnosti, UC-MSC su pomoću specifičnih diferencijacionih medijuma stimulisane da se diferenciraju u adipocite, osteoblaste, hondroblaste i miocite. UC-MSC su uspešno diferencirane u sve četiri ćelijske loze, čime je dokazana njihova multipotentnost, odnosno „matičnost”. Takođe, u prisustvu TGF- β , UC-MSC su pokazale ekspresiju α SMA molekula karakterističnog za miofibroblaste, intermedijarni ćelijski tip u diferencijaciji glatkomišićnih ćelija. Stoga je u cilju dalje karakterizacije koja bi dokazala njihovu multipotentnost, određivana i ekspresija embrionalnih markera i utvrđeno je da UC-MSC u visokom procentu ekspimiraju embrionalne markere Nanog (>70%), Sox-2 (>59%) i SSEA4 (>51%). Na osnovu dosadašnjih saznanja smatra se da se poreklo MSC može odraziti na njihove biološke osobine, kao i na njihov stepen opredeljenosti. Posebno se naglašava razlika između MSC izolovanih iz adultnih i perinatalnih tkiva, s obzirom na to da se MSC izolovane iz perinatalnih tkiva smatraju primitivnijim u odnosu na one dobijene iz ostalih tkiva, sa visokim potencijalom za proliferaciju i ekspanziju (*Hass i sar., 2011*).

Imajući u vidu da su MSC otkrivene kao posebna subpopulacija ćelija u hematopoetskoj mikrosredini kostne srži, nekarakterističan imunofenotip UC-MSC ukazao je da, pored sposobnosti usmerene migracije (engl. *homing*), MSC možda poseduju još neke osobine slične hematopoetskim matičnim ćelijama, poput njihove hijerarhijske organizacije. Naime, danas je opšteprihvaćeno da su HSC heterogena populacija ćelija sa hijerarhijskom strukturom u okviru koje se multipotentnost progresivno smanjuje. Uzimajući ovo u obzir, raznovrsnost između različitih populacija MSC opisana u mnogim radovima, može se objasniti hipotezom da su izolovane MSC različitog stepena opredeljenosti. Razumevanje diferencijacije multipotentnih HSC u različite tipove funkcionalnih ćelija krvi značajno je unapređeno analizom površinskih antigena koji su omogućili identifikaciju i izolaciju različitih subpopulacija krvnih ćelija na različitom stepenu opredeljenosti. Pored analize imunofenotipa, razvijen je i niz dobro definisanih i visoko senzitivnih testova koji dodatno objašnjavaju funkcionalnost i diferencijacioni potencijal ovih ćelija. Nedostatak specifičnih fenotipskih markera za MSC otežava njihovu

identifikaciju i izučavanje, navodeći na zaključak da je funkcionalni test njihovog kapaciteta za diferencijaciju u ovom momentu najznačajniji za dokazivanje njihove multipotentnosti.

Inhibicija TGF- β signalizacije usmerava UC-MSC da se diferenciraju u endotelne ćelije

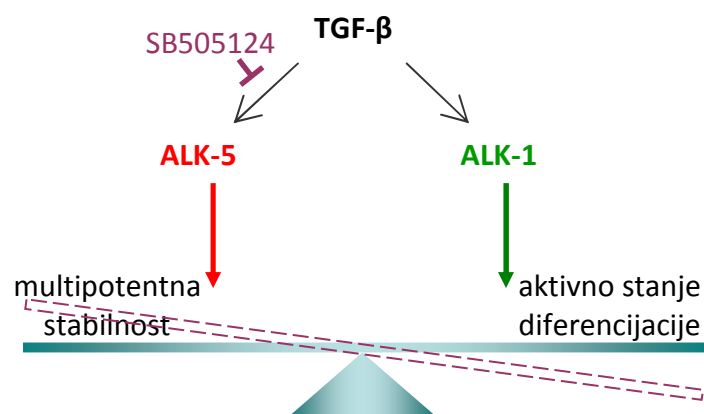
Neophodan preduslov za ostvarenje uspešne produkcije endotelne ćelije za terapijsku primenu jeste dobijanje dovoljne količine trajno stabilnih endotelne ćelije koje nakon ekspanzije zadržavaju svoj angiogeni profil i ne diferenciraju se u ne-endotelne ćelijske tipove. Za diferencijaciju endotelne ćelije *in vitro* do sada su primenjivane embrionalne matične ćelije (Yamashita i sar., 2000; Zhang i sar., 2006) i mezenhimske matične ćelije izolovane iz različitih izvora (Jazayeri i sar., 2008; Gang i sar., 2006; Oswald i sar., 2004; Wu i sar., 2007). Diferencijacija ovih ćelija indukovana je primenom različitih faktora koji indukuju endotelnu diferencijaciju, i gotovo uvek je uključivala primenu VEGF-a. Međutim, pokazalo se da primena VEGF-a za dobijanje endotelne ćelije koje bi se koristile u terapijske svrhe ima izvesnih nedostataka, s obzirom na to da VEGF povećava permeabilnost krvnih sudova, što može dovesti do nastanka edema u tkivu (Watabe i sar., 2003). Takođe, protokoli koji su koristili VEGF za endotelnu diferencijaciju omogućavali su kratkotrajnu stabilnost diferenciranih endotelne ćelije, posebno onih koje su dobijene od ESC, budući da su se te ćelije mogle diferencirati u tri ćelijska tipa uključena u izgradnju krvnih sudova: u pericite, glatkomišićne ćelije i endotelne ćelije. Da bi se povećala stabilnost i prinos endotelne ćelije diferencijacijom iz ESC, primenjena je nova metoda koja je uključivala inhibiciju TGF- β signalizacije (Watabe i sar., 2003; James i sar., 2010). Ovakav pristup endotelnoj diferencijaciji zasniva se na činjenici da TGF- β aktivira unutarćelijske signalne puteve preko dva receptora tipa 1 u endotelne ćelijama: ALK1 i ALK5, preko kojih se ostvaruju suprotni efekti u aktivaciji endotelne ćelije, odnosno njihovoj proliferaciji i migraciji. Ravnoteža u aktivaciji ova dva receptora omogućava **stabilnost** endotelne ćelije u krvnim sudovima. Naime, aktivacijom ALK1 pokreće se signalni put koji uključuje Smad1 i Smad5 signalne molekule, koji dovodi do aktivacije endotela, odnosno do pojačane proliferacije i migracije endotelne ćelije, dok se aktivacijom ALK5 pokreće signalizacija koja uključuje Smad2 i Smad3 i koja kao krajnji ishod ima održavanje endotelne ćelije u stadijumu mirovanja (Fernandez i sar., 2005, Santibañez i sar., 2011). Na osnovu ovih saznanja, osmišljen je

protokol za endotelsku diferencijaciju ESC koji je u svojoj osnovi imao inhibiciju ALK5 receptora, pomoću sintetičkog, komercijalno dostupnog inhibitora. Ovaj protokol omogućio je uspešnu diferencijaciju, dobar prinos i stabilnost dobijenih endotelskih ćelija (*Watabe i sar., 2003; James i sar., 2010*).

Visok diferencijacioni potencijal UC-MSC, i ekspresija embrionalnih markera na UC-MSC izolovanim u našoj studiji, naveli su nas da primenimo sličan protokol i u našem eksperimentalnom pristupu. Kako bismo odredili najpovoljnije uslove za endotelsku diferencijaciju ovih ćelija, koristili smo tri vrste diferencijacionog medijuma: EDM1, koji je sadržao VEGF; EDM2, koji je sadržao inhibitor ALK5 receptora, SB505124; i EDM3, koji je sadržao VEGF i SB505124. Nakon 14 dana kultivisanja UC-MSC sa navedenim medijumima, najizraženija promena u morfologiji primećena je kod ćelija inkubiranih u prisustvu inhibitora, samog i u kombinaciji sa VEGF-om.

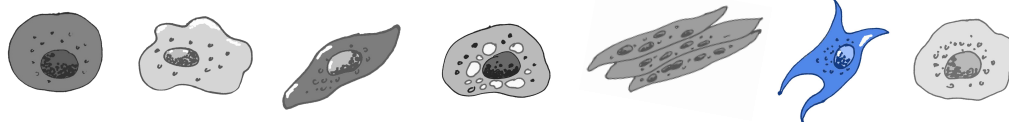
UC-MSC su nakon diferencijacije u sva tri tipa medijuma pokazivale funkcionalnu sposobnost endotelskih ćelija za formiranje tubulogene mreže na kolagenom matriksu, uz najbolje razvijenu mrežu nakon kultivacije u prisustvu VEGF-a i SB505124. Takođe, imunohistohemijska detekcija endotelskih markera – CD31 i vWf pokazala je da su se UC-MSC uspešno diferencirale u endotelske ćelije nakon kultivacije u sva tri medijuma za diferencijaciju, uz najvišu ekspresiju vWf u EDM3. Na osnovu prikazanih rezultata, može se zaključiti da je endotelska diferencijacija UC-MSC bila najuspešnija kada su ćelije inkubirane u prisustvu VEGF-a i SB505124, s obzirom na to da su UC-MSC nakon ovog tretmana pokazale najveće morfološke promene, najveći kapacitet za tubulogenezu, kao i najvišu ekspresiju endotelskih marker proteina, što je u skladu je sa prethodnim studijama na kojima je bilo zasnovano naše istraživanje (*Watabe i sar., 2003; James i sar., 2010*). Ovaj rezultat nas je naveo da pretpostavimo da je inhibicija ALK5 receptora omogućila bržu i efikasniju diferencijaciju UC-MSC, tako što je aktivirala ćelije iz stanja mirovanja. Pored toga, poznato je da TGF- β učestvuje u održanju multipotentnosti ćelija, putem inhibicije diferencijacije u određene ćelijske tipove (*Derynck i Akhurst, 2007*), pa i endotelske diferencijacije ESC (*Watabe i sar., 2003*). Shodno tome, možemo pretpostaviti da, slično mehanizmu prisutnom u endotelskim ćelijama (*Fernandez i sar., 2005*), inhibicijom TGF- β signalizacije, MSC iz stanja “multipotentne stabilnosti” prelaze u „aktivno stanje diferencijacije” (**Slika 40**). Međutim, naša istraživanja su se zasnivala na kratkotrajnoj kultivaciji UC-MSC u diferencijacionim medijumima, jer su za primarni cilj imala potvrdu uspešnosti protokola za endotelsku diferencijaciju ESC. Kako je nakon

dobijenih podataka jasno da se i MSC, tačnije UC-MSK, mogu na ovaj način diferencirati u endotelske ćelije, buduća istraživanja mogla bi biti usmerena ka dugotrajnijoj diferencijaciji ćelija, uz variranje različitih parametara kultivacije, kao što su broj dana u kulturi, termini aplikacije inhibitora, koncentracije aktivnih supstanci itd. Posebno je važan i nalaz da je specifični inhibitor za TGF- β receptor, SB505124, ostvario diferencijaciju UC-MSK u endotelske ćelije čak i bez prisustva VEGF-a. Ovaj podatak upućuje na postojanje specifičnog signalnog mehanizma kojim TGF- β kontroliše multipotentno stanje ovih MSC. Pored toga ne treba zanemariti i činjenicu da UC-MSK opisane u ovoj studiji u malom procentu eksprimiraju i CD34 antigen, što može značiti da su ovo MSC predodređene da postanu endotelske ćelije, te je zbog toga njihova diferencijacija u tom pravcu olakšana. Važno je naglasiti da su rezultati prikazani u ovoj disertaciji pokazali da se UC-MSK, koje se odlikuju visokom sposobnošću samoobnove i visokim kapacitetom za diferencijaciju, mogu diferencirati u endotelske ćelije putem inhibicije ALK5 receptora za TGF- β , a da su neophodna dalja detaljna istraživanja kako za utvrđivanje ispravnosti postavljene hipoteze, tako i za uspostavljanje protokola za ostvarenje uspešne produkcije endotelskih ćelija za terapijsku primenu.



SLIKA 40. Shematski prikaz hipoteze prema kojoj inhibicija ALK5 receptora omogućava bržu i efikasniju diferencijaciju UC-MSK, tako što je menja stanje ravnoteže i pomera ćelije iz stanja "multipotentne stabilnosti" u „aktivno stanje diferencijacije“. Izmenjeno iz Fernandez i sar., 2006. Clin Med Res.

6. ZAKLJUČAK



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

1. IL-17 inhibira miogenu diferencijaciju dok istovremeno stimuliše osteogenu diferencijaciju multipotentne mezenhimske ćelijske linije C2C12

- * Inhibicija miogene diferencijacije C2C12 ćelija ostvaruje se smanjenjem ekspresije miogenina i MyHC u prisustvu IL-17
- * Inhibicija migracije C2C12 ćelija od strane IL-17 može imati udela u inhibiciji njihove miogene diferencijacije
- * Indukcija osteogene diferencijacije C2C12 ćelija ostvaruje se indukcijom ekspresije Runx2/Cbfa1 i Cox-2 u prisustvu IL-17
- * IL-17-indukovana promena opredeljenosti C2C12 ćelija posredovana je aktivacijom ERK1,2 MAPK
- * IL-17-indukovana stimulacija osteogene diferencijacije C2C12 ćelija je nezavisna od BMP signalnog puta

2. IL-17 umanjuje apoptozu EA.hy 926 ćelija kultivisanih na 3% O₂ i stimuliše procese uključene u angiogenezu u EA.hy 926 ćelijama kultivisanim na 20% O₂

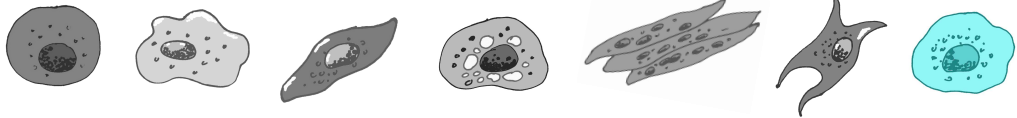
- * EA.hy 926 ćelije spontano podležu apoptozi na 3% O₂
- * IL-17 ima protektivno dejstvo na EA.hy 926 ćelije inkubirane u prisustvu 3% O₂
- * IL-17 indukuje migraciju EA.hy 926 ćelija kultivisanih u prisustvu 20% O₂
- * IL-17 stimuliše tubulogenezu EA.hy 926 ćelija kultivisanih na 20% O₂ i 3% O₂
- * IL-17 stimuliše ekspresiju eNOS i Cox-2 u EA.hy 926 ćelijama u prisustvu 20% O₂ i 3% O₂

3. Uspostavljen model za proučavanje procesa diferencijacije mezenhimskih matičnih ćelija u endotelske ćelije

- * MSC su uspešno izolovane iz tkiva pupčanika, uspostavljena je njihova dugotrajna kultivacija i krioprezervacija
 - UC-MSK poseduju visok klonogeni kapacitet, odlikuju se brзом proliferacijom i visokom sposobnošću ekspanzije
 - UC-MSK imaju visok kapacitet za diferencijaciju i eksprimiraju embrionalne marker proteine

- * UC-MSK se mogu diferencirati u endotelske ćelije putem inhibicije ALK5 receptora
 - UC-MSK eksprimiraju marker proteine karakteristične za endotelske ćelije (CD31 i vWf) nakon kultivacije sa VEGF-om i inhibitorom za ALK5 receptor
 - UC-MSK pokazuju povećan kapacitet za tubulogenezu nakon kultivacije sa VEGF-om i inhibitorom za ALK5 receptor

7. LITERATURA



- Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(6):464-478, 2007.
- Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J Leukoc Biol* 71(1):1-8, 2002.
- Ahmadian Kia N, Bahrami AR, Ebrahimi M, Matin MM, Neshati Z, Almohaddesin MR, Aghdami N, Bidkhorri HR. Comparative Analysis of Chemokine Receptor's Expression in Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow and Adipose Tissue. *J Mol Neurosci* 44(3):178-185, 2011.
- Alipour R, Sadeghi F, Hashemi-Beni B, Zarkesh-Esfahani SH, Heydari F, Mousavi SB, Adib M, narimani M, Esmaeili N. Phenotypic characterizations and comparison of adult dental stem cells with adipose-derived stem cells. *Int J Prev Med* 1(3):164-171, 2010.
- Alt E, Gehmert S, Song YH, Altman A, Gehmert S, Vykoukal D, Bai X. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biol Cell* 103:197-208, 2011.
- Antonymsamy MA, Fanslow WC, Fu F, Li W, Qian S, Troutt AB, Thomson AW. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. *J Immunol* 162(1):577-584, 1999.
- Arita N, Pelaez D, Cheung HS. Activation of the extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) is needed for the TGF β -induced chondrogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 405:564-569, 2011.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85:221-228, 1999.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-966, 1997.
- Asakura A, Komaki M, Rudnicki M. Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation*, 68:245-253, 2001.
- Aviv V, Meivar-Levy I, Rachmut IH, Rubinek T, Mor E, Ferber S. Exendin-4 promotes liver cell proliferation and enhances the PDX-1-induced liver to pancreas transdifferentiation process. *The J Biol Chem* 284(48):33509-33520, 2009.
- Aziz A, Miyake T, Engleka K, Epstein J, McDermott JC. Menin expression modulates mesenchymal cell commitment to the myogenic and osteogenic lineages. *Dev Biol* 332:116-130, 2009.
- B**ecker J, McCulloch E, Till JE. Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature*. 197(4866):452-454, 1963.
- Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell* 2(4):313-319, 2008.
- Bieback K, Brinkmann I. Mesenchymal stromal cells from human perinatal tissues: From biology to cell therapy. *World J Stem Cells* 26;2(4):81-92, 2010.

- Bird L. NKT cells: NKT cells join the IL-17 gang. *Nat Rev Immunol* 8:324, 2008.
- Blaveri, K, Heslop L, Yu DS, Rosenblatt JD, Gross JG, Partridge TA, Morgan JE. Patterns of repair of dystrophic mouse muscle: Studies on isolated fibres. *Dev Dyn* 216:244–256, 1999.
- Boyle SC, Kim M, Valerius MT, McMahon AP, Kopan R. Notch pathway activation can replace the requirement for Wnt4 and Wnt9b in mesenchymal-to-epithelial transition of nephron stem cells. *Development* 138(19):4245-4254, 2011.
- Braun T, Gautel M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(6):349-61, 2011.
- Brooke G, Cook M, Blair C, Han R, Heazlewood C, Jones B, Kambouris M, Kollar K, McTaggart S, Pelekanos R, Rice A, Rossetti T, Atkinson K. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Semin Cell Dev Biol* 18(6):846-58, 2007.
- Bryson-Richardson RJ, Currie PD. The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat Rev Genet* 9(8):632-46, 2008.
- Bugarski D, Jovčić G, Katić-Radivojević S, Petakov M, Krstić A, Stojanović N, Milenković P. Hematopoietic changes and altered reactivity to IL-17 in *Syphacia obvelata*-infected mice. *Parasitol Int* 55(2):91-97, 2006.
- Bugarski D, Krstić A, Vlaški M, Petakov M, Jovčić G, Stojanović N, Milenković P. Interleukine-17-induced inhibitory effect on late stage murine erythroid bone marrow progenitors. *Eur Cytokine Netw* 15(3):247-254, 2004.
- Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port* 32(2):103-110, 2007.
- Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213:341-347, 2007.
- Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9(5):641-50, 1991.
- Cesselli D, Beltrami AP, Rigo S, Bergamin N, D'Aurizio F, Verardo R, Piazza S, Klaric E, Fanin R, Toffoletto B, Marzinotto S, Mariuzzi L, Finato N, Pandolfi M, Leri A, Schneider C, Beltrami CA, Anversa P. Multipotent progenitor cells are present in human peripheral blood. *Circ Res* 104(10):1225-1234, 2009.
- Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P. Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 42: 963-970, 1999.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25:2739-2749, 2007.
- Chan FK. Three is better than one: pre-ligand receptor assembly in the regulation of TNF receptor signaling. *Cytokine* 37:101–107, 2007.
- Chang SH, Park H, Dong C. Act1 Adaptor Protein Is an Immediate and Essential Signaling Component of Interleukin-17 Receptor. *J Biol Chem* 281(47):35603–35607, 2006.
- Chevrel G. Interleukin-17 increases the effects of IL-1 β on muscle cells: arguments for the role of T cells in the pathogenesis of myositis. *J Neuroimmunol* 137:125-133, 2003.
- Chua SJ, Casper RF, Rogers IM. Toward transgene-free induced pluripotent stem cells: lessons from transdifferentiation studies. *Cell Reprogram* 13(4):273-80, 2011.

- Chung, CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(7):2172-2175, 1989.
- Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91(10):3527-3561, 1998.
- Codarri L, Gyulveszi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magneat L, Suter T, Becher B. ROR γ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 12(6):560-567, 2011.
- Cook-Johnson RJ, Demasi M, Cleland LG, Gamble JR, Saint D, James MJ. Endothelial cell COX-2 expression and activity in hypoxia. *Biochim Biophys Acta*, 1761(12):1443-1449, 2006.
- Craft CS, Romero D, Vary CPH, Bergan RC. Endoglin inhibits prostate cancer motility via activation of the ALK2-Smad1 pathway. *Oncogene* 26(51):7240-7250, 2007.
- 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* 3(3):301-13, 2008.
- Cui CB, Cooper LF, Yang X, Karsenty G, Aukhil I. Transcriptional Coactivation of Bone-Specific Transcription Factor *Cbfa1* by TAZ. *Mol Cell Biol* 23(3):1004-13, 2003.
- Derynck R, Akhurst RJ.** Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. *Nat Cell Biol* 9(9):1000-1004, 2007.
- Deschaseaux F, Sensébé L, Heymann D. Mechanisms of bone repair and regeneration. *Trends Mol Med* 15:417-429, 2009.
- Dimmeler S, Zeiher AM. Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ* 6(10):964-968, 1999.
- 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*. 8(4):315-317, 2006.
- Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta R, Simon LS, Van De Putte LB, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12:1063-1073, 1998.
- Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289:1501-1504, 2000.
- EI-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang GX, Dittel BN, Rostami A:** The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 12:568-575, 2011.
- Ely LK, Fischer S, Garcia KC. Structural basis of receptor sharing by interleukin 17 cytokines. *Nat Immunol* 10(12):1245-1251, 2009.
- Emeis JJ, Edgell CJ. Fibrinolytic properties of a human endothelial hybrid cell line (Ea.hy 926). *Blood* 71(6):1669-1675, 1988.

- F**ernández LA, Sanz-Rodriguez F, Blanco FJ, Bernabéu C, Botella LM. Hereditary hemorrhagic telangiectasia, a vascular dysplasia affecting the TGF-beta signaling pathway. *Clin Med Res* 4(1):66-78, 2006.
- Fong GH. Regulation of angiogenesis by oxygen sensing mechanisms. *J Mol Med (Berl)* 87(6):549-560, 2009.
- Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* 33(7):829-837, 2012.
- Fossiez F, Djossou O, Chomarat P, Flores-Romo L, Ait-Yahia S, Maat C, Pin JJ, Garrone P, Garcia E, Saeland S, Blanchard D, Gaillard C, Das Mahapatra B, Rouvier E, Golstein P, Banchereau J, Lebecque S. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med* 183:2593–2603, 1996.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., and Lalykina, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3:393–403, 1970.
- Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., and Gerasimov, U.V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 20:263–272, 1987.
- G**affen SL. An overview of IL-17 function and signaling. *Cytokine* 43:402–407, 2008.
- Gaffen SL. Recent advances in the IL-17 cytokine family. *Curr Opin Immunol* 23:613–619, 2011.
- Gaffen SL. Role of IL-17 in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 11(5): 365–370, 2009.
- Gaffen SL. Structure and signalling in the IL-17 receptor superfamily. *Nat Rev Immunol* 9(8): 556-567, 2009a.
- Gallea S, Lallemand F, Atfi A, Rawadi G, Ramez V, Spinella-Jaegle S, Kawai S, Faucheu C, Huet L, Baron R, Roman-Roman S. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone* 28:491-498, 2001.
- Gang EJ, Jeong JA, Han S, Yan Q, Jeon CJ, Kim H. In vitro endothelial potential of human UC blood-derived mesenchymal stem cells. *Cytotherapy* 8(3):215-27, 2006.
- Ge C, Xiao G, Jiang D, Yang Q, Hatch NE, Roca H, Franceschi RT. Identification and functional characterization of ERK/MAPK phosphorylation sites in the Runx2 transcription factor. *J Biol Chem* 284:32533-32543, 2009.
- Geoffroy V, Ducy P, Karsenty G. A PEBP2 alpha/AML-1-related factor increases osteocalcin promoter activity through its binding to an osteoblast-specific cis-acting element. *The Journal of biological chemistry*, 270(52):30973-30979, 1995.
- Gersbach C, Byers B, Pavlath GK, García AJ. Runx2/Cbfa1 stimulates transdifferentiation of primary skeletal myoblasts into a mineralizing osteoblastic phenotype. *Exp Cell Res* 300:406-417, 2004.
- Giordano A, Galderisi U, Marino IR. From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 211:27-35, 2007.

- Goldman O, Feraud O, Boyer-Di Ponio J, Driancourt C, Clay D, Le Bousse-Kerdiles MC, Benceur-Griscelli A, Uzan G. A boost of BMP4 accelerates the commitment of human embryonic stem cells to the endothelial lineage. *Stem Cells* 27:1750–1759, 2009.
- Gordon KJ, Blobel GC. Role of transforming growth factor- β superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* 1782:197 – 228, 2008.
- Goumans, M.J., Valdimarsdottir G., Itoh S., Rosendahl A., Sideras P., ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- β type I receptors. *EMBO J.* 21:1743–1753, 2002.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(25):13625-30, 2000.
- H**ak AE, de Paepe B, de Bleecker JL, Tak PP, de Visser M. Dermatomyositis and polymyositis: new treatment targets on the horizon. *Neth J Med* 69(10):410-421, 2011.
- Halfon S, Abramov N, Grinbalt B, Ginis I. Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem Cell Dev* 20:53-66, 2011.
- Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature* 423:349-355, 2003.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin-17 producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123-1132, 2005.
- Hashimoto N, Kiyono T, Wada MR, Umeda R, Goto Y, Nonaka I, Shimizu S, Yasumoto S, Inagawa-Ogashiwa M. Osteogenic properties of human myogenic progenitor cells. *Mech Dev* 125: 257-269, 2007.
- Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* 9:12, 2011.
- Heidenreich R, Röcken M, Ghoreschi K. Angiogenesis drives psoriasis pathogenesis. *Int J Exp Pathol* 90(3):232-248, 2009.
- Hirata T, Osuga Y, Takamura M, Saito A, Hasegawa A, Koga K, Yoshino O, Hirota Y, Harada M, Taketani Y. Interleukin-17F increases the secretion of interleukin-8 and the expression of cyclooxygenase 2 in endometriosis. *Fertil Steril* 96(1):113-117, 2011.
- Ho JJ, Man HS, Marsden PA. Nitric oxide signaling in hypoxia. *J Mol Med (Berl)* 90(3):217-231, 2012.
- Huang AH-C, Chen Y-K, Lin L-M, Shieh T-Y, Chan AW-S. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *J Oral Pathol Med* 37(9):571-574, 2008.
- Huang H, Kim HJ, Chang EJ, Lee ZH, Hwang SJ, Kim HM, Lee Y, Kim HH. IL-17 stimulates the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells: implications for bone remodeling. *Cell Death Differ* 16(10):1332-1343, 2009.
- Huang W, La Russa V, Alzoubi A, Schwarzenberger P. Interleukin-17A: a T-cell-derived growth factor for murine and human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24(6):1512-1518, 2006.
- Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 190:624–631, 2004.

- Huang Z, Chen D, Zhang K, Yu B, Chen X, Meng J. Regulation of myostatin signaling by c-Jun N-terminal kinase in C2C12 cells. *Cell* 19: 2286 – 2295, 2007.
- Hung T-Y, Lin H-C, Chan Y-J, Yuan K. Isolating stromal stem cells from periodontal granulation tissues. *Clin Oral investig*, 2011.
- I**nfante-Duarte C, Horton HF, Byrne MC, Kamradt T. Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in Th cells. *J Immunol* 165:6107-6115, 2000.
- Iñiguez M, Rodríguez A, Volpert OV, Fresno M, Redondo JM. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target in angiogenesis. *Trends Mol Med* 9(2):73-78, 2003.
- Ivanov S, Linden A. Interleukin-17 as a drug target in human disease. *Trends Pharmacol Sci* 30(2):95-103, 2009.
- Ivanović Z. Hypoxia or In Situ Normoxia: The Stem Cell Paradigm *J. Cell. Physiol* 219: 271–275, 2009.
- Ivanović Z. Physiological, ex vivo cell oxygenation is necessary for a true insight into cytokine biology. *Eur Cytokine Netw* 20:7-9, 2009a.
- J**aiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase, *J Biol Chem* 275:9645-9652, 2000.
- James D, Nam HS, Seandel M, Nolan D, Janovitz T, Tomishima M, Studer L, Lee G, Lyden D, Benezra R, Zaninovic N, Rosenwaks Z, Rabbany SY, Rafii S. Expansion and maintenance of human embryonic stem cell-derived endothelial cells by TGFbeta inhibition is Id1 dependent. *Nat Biotechnol* 28(2):161-166, 2010.
- Jazayeri M, Allameh A, Soleimani M, Jazayeri SH, Piryaei A, Kazemnejad S. Molecular and ultrastructural characterization of endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 32(10):1183-1192, 2008.
- Joensuu K, Paatero I, Alm JJ, Elenius K, Aro HT, Heino TJ, Hentunen TA. Interaction between marrow-derived human mesenchymal stem cells and peripheral blood mononuclear cells in endothelial cell differentiation. *Scand J Surg* 100(3):216-22, 2011.
- Jovanović DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicœur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 160(7):3513-21, 1998.
- Jovčić G, Bugarski D, Krstić A, Vlaški M, Petakov M, Mojsilović S, Stojanović N, Milenković P. The effect of interleukin-17 on hematopoietic cells and cytokine release in mouse spleen. *Physiol Res* 56:331-339, 2007.
- Jovčić G, Bugarski D, Petakov M, Krstić A, Vlaški M, Stojanović N, Milenković P. In vivo effects of interleukin-17 on haematopoietic cells and cytokine release in normal mice. *Cell Prolif* 37:401–412, 2004.
- Jovčić G, Bugarski D, Petakov M, Stanković J, Stojanović N, Milenković P. Effect of IL-17 on in vitro hematopoietic progenitor cells growth and cytokine release in normal and postirradiated murine bone marrow. *Growth Factors* 19:61–71, 2001.

- Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, Gorodetsky R.** Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant* 37:967-976, 2006.
- Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, Rosen V, Wozney JM, Fujisawa-Sehara A, Suda T.** Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127:1755-1766, 1994.
- Keren A, Tamir Y, Bengal E.** The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. *Mol Cell Endocrinol* 252:224-230, 2006.
- 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 (Dayton, Ohio)* 24(5):1294-1301, 2006.
- Kim HJ, Kim SH.** Tanshinone IIA enhances BMP-2-stimulated commitment of C2C12 cells into osteoblasts via p38 activation. *Amino Acids* 39:1217-1226, 2010.
- Kim KH, Kim HY, Kim HH, Lee KS, Cheong J.** Hypoxia induces expression of COX-2 through the homeodomain transcription factor CDX1 and orphan nuclear receptor SHP in human endometrial cells. *Mol Hum Reprod* 17(11):710-719, 2011.
- Kolls JK, Linden A.** Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 21:467-476, 2004.
- Komori T.** Requisite roles of Runx2 and Cbfa in skeletal development. *J Bone Miner Metab* 21:193-197, 2003.
- Korchynskiy O, ten Dijke P.** Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *The Journal of biological chemistry*, 277(7), 4883-4891, 2002.
- Korn T, Bettelli E, Gao W, Awasthi A, Jäger A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK.** IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 448(7152):484-487, 2007.
- Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, Saito S, Inoue K, Kamatani N, Gillespie MT, Martin TJ, Suda T.** IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* 103:1345-1352, 1999.
- Kovačević-Filipović M, Petakov M, Hermitte F, Debeissat C, Krstić A, Jovčić G, Bugarski D, Lafarge X, Milenković P, Praloran V, Ivanović Z.** Interleukin-6 (IL-6) and low O(2) concentration (1%) synergize to improve the maintenance of hematopoietic stem cells (pre-CFC). *J Cell Physiol* 212(1):68-75, 2007.
- Kramer JM, Hanel W, Shen F, Isik N, Malone JP, Maitra A, Sigurdson W, Swart D, Tocker J, Jin T, Gaffen SL.** Cutting edge: identification of a pre-ligand assembly domain (PLAD) and ligand binding site in the IL-17 receptor. *J Immunol* 179(10):6379-83, 2007.
- Kramer JM, Yi L, Shen F, Maitra A, Jiao X, Jin T, Gaffen SL.** Cutting Edge: Evidence for Ligand-Independent Multimerization of the IL-17 Receptor. *J Immunol* 176:711-715, 2006.
- Krause C, Mei E, Xie J, Bopp M, Hochstrasser R, Pestka S.** Seeing the light: preassembly and ligand-induced changes of the interferon gamma receptor complex in cells. *Mol Cell Proteomics* 1:805-815, 2002.
- Krstić A, Ilić V, Mojsilović S, Jovčić G, Milenković P, Bugarski D.** p38 MAPK signaling mediates IL-17-induced nitric oxide synthase expression in bone marrow cells. *Growth Factors* 27:79-90, 2009a.

- Krstić A, Mojsilovic S, Jovcic G, Bugarski D. The potential of interleukin-17 to mediate hematopoietic response. *Immunol Res* 52(1-2):34-41, 2012.
- Krstić A, Santibañez JF, Okić I, Mojsilović S, Kocić J, Jovčić G, Milenković P, Bugarski D. Combined effect of IL-17 and blockade of nitric oxide biosynthesis on haematopoiesis in mice. *Acta Physiol (Oxf)* 199(1):31-41, 2010.
- Krstić A, Vlaški M, Hammoud M, Chevaleyre J, Duchez P, Jovčić G, Bugarski D, Milenković P, Bourin P, Boiron JM, Praloran V, Ivanović Z. Low O₂ concentrations enhance the positive effect of IL-17 on the maintenance of erythroid progenitors during co-culture of CD34+ and mesenchymal stem cells. *Eur Cytokine Netw* 20(1):10-6, 2009.
- Krstić A. Molekularni mehanizmi delovanja Interleukina-17 na određene matične ćelije hematopoeze kostne srži miša. Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, 2009.
- L**a Rocca G, Anzalone R, Corrao S, Magno F, Loria T, Lo Iacono M, Di Stefano A, Giannuzzi P, Marasà L, Cappello F, Zummo G, Farina F. Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem Cell Biol* 131(2):267-82, 2009.
- Lee SJ, Lee EJ, Kim SH, Choi I, Lee DM, Lee HJ, Yoon D, Chun T. IL-17A promotes transdifferentiation of mouse myoblast cells (C2C12) into adipocytes by increasing the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ through CAAT/enhancer binding protein β signaling. *Biotechnol Lett* 33(2):229-35, 2011.
- Leloup L, Daury L, Mazères G, Cottin P, Brustis JJ. Involvement of the ERK/MAP kinase signalling pathway in milli-calpain activation and myogenic cell migration. *Int J Biochem Cell Biol* 39:1177-1189, 2007.
- Li CJ, Chang JK, Wang GJ, Ho ML. Constitutively expressed COX-2 in osteoblasts positively regulates Akt signal transduction via suppression of PTEN activity. *Bone* 48:286-297, 2011.
- Lian JB, Stein GS. Runx2/Cbfa1: a multifunctional regulator of bone formation. *Curr Pharm Des* 9: 2677-2685, 2003.
- Linden A, Laan M, Anderson G. Neutrophils, interleukin-17A and lung disease. *Eur Respir J* 25:159-72, 2005.
- Liu J, Duan Y, Cheng X, Chen X, Xie W, Long H, Lin Z, Zhu B. IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 407(2):348-54, 2011.
- Locke M, Feisst V, Dunbar PR. Concise Review: Human adipose-derived stem cells: separating promise from clinical need. *Stem Cells* 29:404-411, 2011.
- Luo J, Tang M, Huang J, He BC, Gao JL, Chen L, Zuo GW, Zhang W, Luo Q, Shi Q, Zhang BQ, Bi Y, Luo X, Jiang W, Su Y, Shen J, Kim SH, Huang E, Gao Y, Zhou JZ, Yang K, Luu HH, Pan X, Haydon RC, Deng ZL, He TC. TGF β /BMP type I receptors ALK1 and ALK2 are essential for BMP9-induced osteogenic signaling in mesenchymal stem cells. *J Biol Chem*. 285(38):29588-29598, 2010.
- M**artin GR. Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78(12):7634-7638, 1981.

- McCarthy EF, Sundaram M. Heterotopic ossification: a review. *Skeletal Radiol* 34:609-619, 2005.
- Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T. Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* 272(25):15583-15586, 1997.
- Mojsilović S, Krstić A, Ilić V, Okić-Đorđević I, Kocić J, Trivanović D, Santibañez JF, Jovčić G, Bugarski D. IL-17 and FGF signaling involved in mouse mesenchymal stem cell proliferation. *Cell Tissue Res* 346(3):305-16, 2011.
- Moran EM, Connolly M, Gao W, McCormick J, Fearon U, Veale DJ. Interleukin-17A induction of angiogenesis, cell migration, and cytoskeletal rearrangement. *Arthritis Rheum* 63(11):3263-3273, 2011.
- Morgan JE, Partridge TA. Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol* 35(8):1151-6, 2003.
- Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441(7097):1068-1074, 2006.
- Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:155-174, 2003.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136:2348-2357, 1986.
- Muñoz-Chápuli R, Quesada AR, Angel Medina M. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells. *Cell Mol Life Sci* 61(17):2224-2243, 2004.
- Murugaiyan G, Saha B. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol* 183(7):4169-4175, 2009.
- Nakayama K, Tamura Y, Suzawa M, Harada SI, Fukumoto S, Kato M, Miyazono K, Rodan GA, Takeuchi Y, Fujita T. Receptor tyrosine kinases inhibit bone morphogenetic protein-Smad responsive promoter activity and differentiation of murine MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *J Bone Miner Res* 18(5):827-835, 2003.
- Ng CT, Biniecka M, Kennedy A, McCormick J, Fitzgerald O, Bresnihan B, Buggy D, Taylor CT, O'Sullivan J, Fearon U, Veale DJ. Synovial tissue hypoxia and inflammation in vivo. *Ann Rheum Dis* 69(7):1389-1395, 2010.
- Nourse MB, Halpin DE, Scatena M, Mortisen DJ, Tulloch NL, Hauch KD, Torok-Storb B, Ratner BD, Pabon L, Murry CE. VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(1):80-89, 2010.
- Novatchkova M, Leibbrandt A, Werzowa J, Neubüser A, Eisenhaber F. The STIR-domain superfamily in signal transduction, development and immunity. *Trends Biochem Sci* 28(5):226-229, 2003.
- Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 63(4-5):300-311, 2011.
- Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, Robbins PD, Tahara H, Lotze MT. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood* 101:2620-2627, 2003.
- Numasaki M, Watanabe M, Suzuki T, Takahashi H, Nakamura A, McAllister F, Hishinuma T, Goto J, Lotze MT, Kolls JK, Sasaki H. IL-17 enhances the net angiogenic activity and in

vivo growth of human non-small cell lung cancer in SCID mice through promoting CXCR-2-dependent angiogenesis. *J Immunol* 175(9):6177-6189, 2005.

- O**gawa M, Larue AC, Watson PM, Watson DK. Hematopoietic stem cell origin of mesenchymal cells: opportunity for novel therapeutic approaches. *Int J Hem* 91(3):353-359, 2010.
- Oh CD, Chang SH, Yoon YM, Lee SJ, Lee YS, Kang SS, Chun JS. Opposing role of mitogen-activated protein kinase subtypes, erk-1/2 and p38, in the regulation of chondrogenesis of mesenchymes. *J Biol Chem* 275: 5613-5619, 2000.
- Okamoto K, Takayanagi H. Osteoclasts in arthritis and Th17 cell development. *Int Immunopharmacol* 11(5):543-548, 2011.
- Osses N, Casar JC, Brandan E. Inhibition of extracellular matrix assembly induces the expression of osteogenic markers in skeletal muscle cells by a BMP-2 independent mechanism. *BMC Cell Biol* 10:73, 2009.
- Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 22(3):377-384, 2004.
- Owen, M., Friedenstein, A.J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 136:42-60, 1988.
- P**ages G, Brunet A, Allemain GL, Pouyssegur J. Constitutive mutant and putative regulatory serine phosphorylation site of mammalian MAP kinase kinase kinase. *Recherche* 13(13):3003-3010, 1994.
- Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing Interleukin 17. *Nat Immunol* 6:1133-1141, 2005.
- Parker MH, Seale P, Rudnicki MA. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat Rev Genet* 4(7):497-507, 2003.
- Patel-Hett S, D'Amore PA. Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. *Int J Dev Biol* 55(4-5):353-363, 2011.
- Pickens SR, Volin MV, Mandelin AM 2nd, Kolls JK, Pope RM, Shahrara S. IL-17 contributes to angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 184(6):3233-3241, 2010.
- Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther* 17(6):939-946, 2009.
- R**ahman MS, Yamasaki A, Yang J, Shan L, Halayko AJ, Gounni AS. IL-17A induces eotaxin-1/CC chemokine ligand 11 expression in human airway smooth muscle cells: role of MAPK (Erk1/2, JNK, and p38) pathways. *J Immunol* 177: 4064-4071, 2006.
- Rifas L, Arackal S, Weitzmann MN. Inflammatory T cells rapidly induce differentiation of human bone marrow stromal cells into mature osteoblasts. *J Cell Biochem* 88(4):650-659, 2003.

- Romero D, Terzic A, Conley BA, Craft CS, Jovanovic B, Bergan RC, Vary CP. Endoglin phosphorylation by ALK2 contributes to the regulation of prostate cancer cell migration. *Carcinogenesis* 31(3):359-366, 2010.
- Roobrouck VD, Vanuytsel K, Verfaillie CM. Concise review: culture mediated changes in fate and/or potency of stem cells. *Stem Cells* 29:583-589, 2011.
- Rouvier E, Luciani MF, Mattei MG, Denizot F, Golstein P. CTLA-8, Cloned from an Activated T Cell, Bearing AU-Rich Messenger RNA Instability Sequences, and Homologous to a Herpesvirus Saimiri gene. *J Immunol* 150(12): 5445-5456, 1993.
- S**alem HK, Thiernemann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 28:585-596, 2010.
- Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)* 121:233–51, 2011.
- Sarig R, Fuchs O, Tencer L, Panski A, Nudel U, Yaffe D. Cloned myogenic cells can transdifferentiate in vivo into neuron-like cells. *PLoS one* 5(1):e8814, 2010.
- Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441(7097):1075-1079, 2006.
- Schwarzenberger P, La Russa V, Miller A, Ye P, Huang W, Zieske A, Nelson S, Bagby GJ, Stoltz D, Mynatt RL, Spriggs M, Kolls JK. IL-17 stimulates granulopoiesis in mice: Use of an alternate, novel gene therapy-derived method for in vivo evaluation of cytokines. *J Immunol* 161:6383–6389, 1998.
- Secco M, Moreira YB, Zucconi E, Vieira NM, Jazedje T, Muotri AR, Okamoto OK, Verjovski-Almeida S, Zatz M. Gene expression profile of mesenchymal stem cells from paired umbilical cord units: cord is different from blood. *Stem Cell Rev* 5(4):387-401, 2009.
- Sera Y, LaRue AC, Moussa O, Mehrotra M, Duncan JD, Williams CR, Nishimoto E, Schulte BA, Watson PM, Watson DK, Ogawa M. Hematopoietic stem cell origin of adipocytes. *Exp Hematol* 37(9):1108-1120, 2009.
- Shen F, Gaffen SL. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine* 41(2):92-104, 2008.
- Shin JH, Shin DW, Noh M. Interleukin-17A inhibits adipocyte differentiation in human mesenchymal stem cells and regulates pro-inflammatory responses in adipocytes. *Biochem Pharmacol* 77(12):1835-1844, 2009.
- Stains JP, Civitelli R. Genomic approaches to identifying transcriptional regulators of osteoblast differentiation. *Genome Biol* 4(7): 222, 2003.
- Subramaniam SV, Cooper RS, Adunyah SE. Evidence for the involvement of JAK/STAT pathway in the signaling mechanism of interleukin-17. *Biochem Biophys Res Commun* 262:14-19, 1999.
- Sumpio BE, Riley JT, Dardik A. Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 34(12):1508-1512, 2002
- T**aghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta*. 32(4):311-315, 2011.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.

- Tartour E, Pere H, Maillere B, Terme M, Merillon N, Taieb J, Sandoval F, Quintin-Colonna F, Lacerda K, Karadimou A, Badoual C, Tedgui A, Fridman WH, Oudard S.. Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Rev* 30(1):83-95, 2011.
- ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(11):857-869, 2007.
- Tepper OM, JM Capla, RD Galiano, DJ Ceradini, MJ Callaghan, ME Kleinman and GC Gurtner. Adult vasculogenesis occurs through in situ recruitment, proliferation, and tubulization of circulating bone marrow-derived cells. *Blood* 105:1068–1077, 2005.
- Thomson J. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282(5391):1145-1147, 1998.
- Till JE, McCulloch EA, Siminovitch L. A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *PNAS* 51(1):29-36, 1964.
- Tournadre A, Lenief V, Miossec P. Expression of Toll-like Receptor 3 and Toll-like Receptor 7 in Muscle Is Characteristic of Inflammatory Myopathy and Is Differentially Regulated by Th1 and Th17 Cytokines. *Arthritis Rheum* 62(7):2144–2151, 2010.
- Tournadre A, Miossec P. Interleukin-17 in inflammatory myopathies. *Curr Rheumatol Rep* 14(3):252-356, 2012.
- Toy D, Kugler D, Wolfson M, Vanden Bos T, Gurgel J, Derry J, Tocker J, Peschon J. Cutting edge: interleukin 17 signals through a heteromeric receptor complex. *J Immunol* 177(1):36-39, 2006.
- Trounson A, Thakar RG, Lomax G, Gibbons D. Clinical trials for stem cell therapies MSC Clinical Trials by Disease. *BMC Medicine* 9:52, 2011;
- Troyer DL, Weiss ML. Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26(3):591-599, 2008.
- V**alenti MT, Dalle Carbonare L, Donatelli L, Bertoldo F, Zanatta M, Lo Cascio V. Gene expression analysis in osteoblastic differentiation from peripheral blood mesenchymal stem cells. *Bone* 43(6):1084-1092, 2008.
- W**ada MR, Inagawa-Ogashiwa M, Shimizu S, Yasumoto S, Hashimoto N. Generation of different fates from multipotent muscle stem cells. *Development*. 129:2987-2995, 2002.
- Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 33(11):1402-1416, 2005.
- Wang H-S, Hung S-C, Peng S-T, Huang C-C, Wei H-M, Guo Y-J, Fu YS, Lai MC, Chen CC. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 22(7):1330-1337, 2004.
- Watabe T, Nishihara A, Mishima K, Yamashita J, Shimizu K, Miyazawa K, Nishikawa S, Miyazono K. TGF-beta receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Biol* 163(6):1303-1311, 2003.

- Wu KH, Zhou B, Lu SH, Feng B, Yang SG, Du WT, Gu DS, Han ZC, Liu YL. In vitro and in vivo differentiation of human umbilical cord derived stem cells into endothelial cells. *J Cell Biochem* 100(3):608-616, 2007.
- Xiao G, Jiang D, Thomas P, Benson MD, Guan K, Karsenty G, Franceschi RT. MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem* 275: 4453-4459, 2000.
- Xu S, Cao X. Interleukin-17 and its expanding biological functions. *Cell Mol Immunol* 7:164-174, 2010.
- Xu, Q, Wu Z. The insulin-like growth factor-phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling pathway regulates myogenin expression in normal myogenic cells but not in rhabdomyosarcoma-derived RD cells. *J Biol Chem* 275(47):36750-36757, 2000.
- Yamamoto N, Akiyama S, Katagiri T, Namiki M, Kurokawa T, Suda T. Smad1 and Smad5 act downstream of intracellular signalings of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 238(2):574-580, 1997.
- Yamashiro T, Wang X-P, Li Z, Oya S, Aberg T, Fukunaga T, Kamioka H, Speck NA, Takano-Yamamoto T, Thesleff I. Possible roles of Runx1 and Sox9 in incipient intramembranous ossification. *J Bone Miner Res* 19(10):1671-1677, 2004.
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K, Nishikawa S. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* 408(6808):92-96, 2000.
- Yang W, Chen Y, Zhang Y, Wang X, Yang N, Dahai Z. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinase pathway is involved in myostatin-regulated differentiation repression. *Cancer Res* 66:1320-1326, 2006.
- Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK, Armitage RJ. Human IL-17: A novel cytokine derived from T cells. *J Immunol* 155:5843-5846, 1995.
- Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J, Shellito JE, Bagby GJ, Nelson S, Charrier K, Peschon JJ, Kolls JK. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and IL-17 and its biological functions granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 194:519-527, 2001.
- Yi C, Liu D, Fong CC, Zhang J, Yang M. Gold nanoparticles promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway. *ACS Nano* 4:6439-6448, 2010.
- Zhang H, Saeki K, Kimura A, Saeki K, Nakahara M, Doshi M, Kondo Y, Nakano T, Yuo A. Efficient and repetitive production of hematopoietic and endothelial cells from feeder-free monolayer culture system of primate embryonic stem cells. *Biol Reprod* 74(2):295-306, 2006.
- Zhang X, Schwarz EM, Young DA, Puzas JE, Rosier RN, O'Keefe RJ. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest* 109:1405-1415, 2002.

- Zhu F, Wang Q, Guo C, Wang X, Cao X, Shi Y, Gao F, Ma C, Zhang L. IL-17 induces apoptosis of vascular endothelial cells: a potential mechanism for human acute coronary syndrome. *Clin Immunol* 141(2):152-160, 2011.
- Zilberberg L., ten Dijke P, Sakai LY, Rifkin DB. A rapid and sensitive bioassay to measure bone morphogenetic protein activity. *BMC Cell Biol* 8:41, 2007.

PRILOG – SPISAK SKRAĆENICA

Act1 (engl. NF-kB activator 1) – aktivator 1 NF-kB; adaptor protein

AU (engl. *adenine-uracil*) – adenin-uracil (odnosi se na sekvence RNK bogate AU ponovcima, povezane sa nestabilnošću RNK – karakteristika iRNK citokina)

ALK (engl. Activin-like kinase) – kinaza slična aktivinu

ALP (engl. *alkaline phosphatase*) – alkalna fosfataza

ACV (engl. *Activin*) – aktivin

ADM – adipogeni diferencijacioni medijum

Ann V – Annexin V

BCA (engl. *Bicinchoinic Acid*) - bicinhoninična kiselina

BFU-E (engl. *Burst forming unit – erythroid*) – primitivnija kategorija opredeljenih matičnih ćelija u pravcu razvoja eritrocita

BMP (engl. *Bone Morphogenetic Proteins*) – morfogenetski proteini kosti

BSA (engl. *Bovine serum albumine*) – goveđi serum albumin

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

CBAD (engl. *C-terminal C/EBP β -activation domain*) – C-terminalni C/EBP β -aktivacioni domen; motiv karakterističan za IL-17RA

CB-MSC (engl. *Cord blood mesenchymal stem cells*) – mezenhimske matične ćelije izolovane iz krvi iz pupčanika

CD (engl. *cluster of differentiation*) – klaster diferencijacije; oznaka za međunarodnu klasifikaciju membranskih antigena

cDNK - DNK komplementarna molekulu RNK, najčešće stvorena *in vitro* pomoću enzima reverzne transkriptaze

C/EBP (engl. *CCAAT-enhancer-binding proteins*) – familija transkripcionih faktora koji se vezuju za CCAAT sekvencu pojačivača gena

CFU-E (engl. *Colony forming unit – erythroid*) – zrelija kategorija opredeljenih matičnih ćelija u pravcu razvoja eritrocita

CFU-F (engl. *Colony forming unit – fibroblastic*) – stromalna matična ćelija

CFU-GM (engl. *Colony forming unit – granulocyte – macrophage*) – bipotentna opredeljena matična ćelija u pravcu razvoja granulocita i makrofaga

Cox-2 (engl. *Cyclooxygenase 2*) – ciklooksigenaza 2

CTLA (engl. *Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen*) – antigen citotoksičnih T limfocita

CXC – C-X-C hemokin

DM – dermatomiozitis, inflamatorno oboljenje mišića

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

dNTP – deoksiribonukleotid trifosfat

DAB – di-amino-benzidinom

ECL (engl. *Enhanced Chemiluminescence*) – pojačana hemiluminiscencija

EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) – etilendiamintetrasirćetna kiselina

eNOS – endotelska NOS

ERK (engl. *Extracellular Signal-Regulated Kinases*) – kinaza regulisana ekstracelularnim signalima; signalni molekul

ESC (engl. *Embryonic stem cells*) – embrionalne matične ćelije

EDM – endotelski diferencijacioni medijum

EACA (engl. *Epsilon-aminocaproic acid*) – epsilon aminokaproična kiselina

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

FGF (engl. *Fibroblast growth factor*) – faktor rasta fibroblasta

FITC – fluorescein izotiocijanat

Fsc - fluorescein

G-CSF (engl. *Granulocyte colony-stimulating factor*) – faktor stimulacije rasta granulocitnih kolonija

GM-CSF (engl. *Granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) – faktor stimulacije rasta granulocitno-makrofagnih kolonija

HA – hemaglutinin

HLA (engl. *Human leukocyte antigen*) – humani leukocitni antigen

HRP (engl. *Horse radish peroxidase*) – peroksidaza rena

HSC (engl. *Hematopoietic stem cells*) – hematopoetske matične ćelije

HUVEC (engl. *Human umbilical vein endothelial cells*) – humane endotelske ćelije izolovane iz umbilikalne vene

HDM – hondrogeni diferencijacioni medijum

IFN – interferon

IL – interleukin

iNOS – inducibilna NOS

iPS (engl. *induced pluripotent stem cells*) – indukovane pluripotentne matične ćelije

iRNK – informaciona RNK

IBMX (engl. *isobutyl-methylxanthine*) – izobutil metilksantin

JAK - Janus kinaza; signalni molekul

JNK - *c-Jun NH₂*-terminalna kinaza; signalni molekul

LB – Luria Bertani medijum za kultivaciju bakterija

MAPK (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) – mitogenom aktivirane protein kinaze

MEK - kinaze MAPK

MHC (engl. *Major Histocompatibility Complex*) – glavni kompleks tkivne podudarnosti

MIP-2 (engl. *Macrophage-inflammatory protein-2*) – makrofagni inflamatorni protein 2

MMP - matriks metaloproteinaze

MRF (engl. *Myogenic Regulatory Factors*) – regulatorni faktori miogeneze

MSC (engl. *Mesenchymal Stem Cells*) – mezenhimske matične ćelije

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

Myf5 (engl. *Myogenic factor 5*) – miogeni faktor 5

Mrf4 (engl. *Muscle-specific regulatory factor 4*) – regulatorni faktor 4 specifičan za mišiće

MyoD (engl. *Myoblast determination protein*) – protein za determinaciju mioblasta

MyHC (engl. *Myosin Heavy Chain*) – teški lanac miozina

MDM – miogeni diferencijacioni medijum

NFκB – nuklearni faktor κB; transkripcioni faktor

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

NO – azot monoksid

NOS – NO sintaza

nNOS – neuronska NOS

ORF13 (engl. *Open reading frame 13*) – otvoreni okvir čitanja (odnosi se na sekvencu genoma virusa *Herpesvirus saimiri* kojom je kodiran virusni homolog IL-17)

ODM – osteogeni diferencijacioni medijum

Pax3, Pax7 (engl. *Paired box*) – transkripcioni faktori uključeni u regulaciju miogene diferencijacije

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

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

PM – polimiozitis, inflamatorno oboljenje mišića

PMSF (engl. *phenylmethanesulphonylfluoride*) – fenilmetansulfonilfluorid

PE (engl. *Phycerythrin*) – fikoeritrin

PI (engl. *Propidium Iodide*) – propidijum jodid

PEG – polietilen glikol

PDT (engl. *Population doubling time*) – vreme dupliranja ćelijske populacije

R - receptor

RANKL (engl. *Receptor activator of Nuclear factor κ B Ligand*) – ligand za receptor aktivator *NF κ B*

RNK – ribonukleinska kiselina

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

RT – reverzna transkripcija

Osx (engl. *Osterix*) – transkripcioni faktor uključen u osteogenu diferencijaciju

SCF (engl. *Stem cell factor*) - faktor stimulacije matičnih ćelija

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

SDS-PAGE (engl. *Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) poliakrilamid gel elektroforeza u prisustvu deterdženta SDS

SE – standardna greška

SEFIR (engl. *Similar Expression to Fibroblast growth factor genes and IL-17 Receptors*) - motiv u intraćelijskom domenu IL-17R, homolog TIR familiji receptora

α SMA (engl. *Alpha smooth muscle actin*) – alfa aktin glatkih mišića

STAT (engl. *Signal Transducer and Activator of Transcription*) – prenosnik signala i aktivator transkripcije; transkripcioni faktor

TAE - Tris-acetat-EDTA pufer

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

TGF- β (engl. *Transforming growth factor beta*) – faktor transformacije rasta beta

Th – pomoćničke T ćelije

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

TIR (engl. *Toll-IL-1 receptor*) – familija receptora koja objedinjuje TLR i IL-1 familije

TNF (engl. *Tumor necrosis factor*) – faktor nekroze tumora

TRAF (engl. *TNF-Receptor-associated factor*) – faktor povezan sa TNF receptorom; signalni molekul

Tris – tris(hidroksimetil)aminometan

TRITC – tetrametilrodamin-5-(i 6)-izotiocijanat

TSS (engl. *transformation and storage solution*) – rastvor za transformaciju i čuvanje bakterija

UC-MSC (engl. *Ubilical cord mesenchymal stem cells*) – mezenhimske matične ćelije izolovane iz tkiva pupčanika

VEGF (engl. *Vascular endothelial growth factor*) – faktor rasta endotelnih ćelija

vWf – von Willebrand faktor

BIOGRAFIJA AUTORA

Jelena Kocić rođena je 01. maja 1981. godine u Nišu. Diplomirala je na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu, smer Biologija, aprila 2007. godine, sa prosečnom ocenom u toku studija 9.21. Iste godine upisala je doktorske studije, studijski program Biologija ćelija i tkiva, na matičnom fakultetu. Položila je sve programom predviđene ispite sa srednjom ocenom 10.00. Od školske 2007/08. do juna 2010. godine bila je stipendista doktorand Ministarstva za nauku Republike Srbije, a od juna 2010. je zaposlena u istraživačkom zvanju, prvo kao istraživač pripravnik a potom, od novembra 2010., kao istraživač saradnik na Institutu za medicinska istraživanja u Beogradu.

Od početka doktorskih studija aktivno učestvuje u biomedicinskim istraživanjima i to na više projekata koje je finansiralo Ministarstvo nadležno za nauku: “Regeneracija skeletnih tkiva pomognuta biomaterijalima kao tkivnim matricama – *in vivo* i *in vitro* studija” na Institutu za biomedicinska istraživanja, Medicinski fakultet u Nišu (2007-2008); „Ćelijski i molekularni mehanizmi regulacije hematopoeze“ (2008-2010) i „Regenerativni i modulatorni potencijal adultnih matičnih ćelija“ (od 2011.) na Institutu za medicinska istraživanja, Univerzitet u Beogradu. Angažovana je na dva bilateralna projekta, sa Kraljevinom Španijom i Republikom Portugal.

Boravila je na Institutu za genomiku i bioinformatiku u Gracu, Austrija, u organizaciji World University Service (WUS) i Austrian Exchange Service, 2008. godine u okviru jednomesečnog stručnog usavršavanja. Dobitnik je grupne nagrade za najbolji rad Instituta za medicinska istraživanja u 2010. godini.

Do sada je u saradnji sa drugim autorima objavila osamnaest bibliografskih jedinica: šest radova u vodećim časopisima međunarodnog značaja (M21), jedan rad u istaknutom časopisu međunarodnog značaja (M22), dva rada u međunarodnim časopisima (M23), jedan rad u vodećem časopisu nacionalnog značaja (M24), dva rada u časopisima nacionalnog značaja (M52) i šest saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu (M34).

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана **Јелена С. Коцић**

број уписа **БО 070001**

Изјављујем

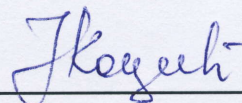
да је докторска дисертација под насловом

Ефекти и механизми деловања интерлеукина-17 на функције мезенхимских и ендотелских ћелија

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

Потпис докторанда

У Београду, 27.08.2012.



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Јелена С. Коцић
Број уписа	БО 070001
Студијски програм	Биологија ћелија и ткива
Наслов рада	Ефекти и механизми деловања интерлеукина-17 на функције мезенхимских и ендотелских ћелија
Ментори	Др Александра Кораћ, редовни професор, Биолошки факултет, Универзитет у Београду Др Диана Бугарски, научни саветник, Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду

Потписана **Јелена С. Коцић**

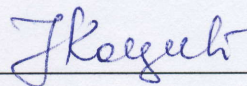
изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

У Београду, 27.08.2012.

Потпис докторанда



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Ефекти и механизми деловања интерлеукина-17 на функције мезенхимских и ендотелских ћелија

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

У Београду, 27.08.2012.

Потпис докторанда

