



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Александар З. Николић

ЕФЕКТИ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА У МИШЉЕМ МОДЕЛУ АКУТНОГ  
ЗАПАЉЕЊА ДЕБЕЛОГ ЦРЕВА ИЗАЗВАНОГ ДЕКСТРАН НАТРИЈУМ СУЛФАТОМ

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Ментор: др сци.мед. Миодраг Стојковић, редовни професор

Крагујевац, 2018. година

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I Аутор</i></b>	
Име и презиме: Александар Николић	
Датум и место рођења: 05.01.1986. године, Лесковац	
Садашње запослење: незапослен	
<b><i>II Докторска дисертација</i></b>	
Наслов: Ефекти мезенхималних матичних ћелија у мишјем моделу акутног запаљења дебелог црева изазваног декстран натријум сулфатом	
Број страница: 103	
Број слика: 12	
Број библиографских података:	
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Крагујевац	
Научна област (УДК): Матичне ћелије у биомедицинским наукама	
Ментор: др сци. мед. Миодраг Стојковић, редовни професор	
<b><i>III Оцена и одбрана</i></b>	
Датум пријаве теме: 26.02.2016. године	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-919/6 од 05.10.2016.г.	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: 1. Доц. др Владислав Воларевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, председник, 2. Доц. др Биљана Љујић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, члан, 3. НС Сергеј Томић, научни сарадник Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Природно-математичке науке, Биологија, члан.	
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: 1. Проф. др Владислав Воларевић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Микробиологија и имунологија, члан, 2. Доц. др Биљана Љујић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, члан, 3. НС Диана Бугарски, научни саветник Института за медицинска истраживања Универзитета у Београду за ужу научну област Експериментална хематологија и матичне ћелије, члан.	
Датум одбране дисертације:	

## САЖЕТАК

Мезенхималне матичне ћелије (енгл. *Mesenchymal stem cells*-MSC) имају терапеутски потенцијал у многим стањима, укључујући гастроинтестиналним болестима. Њихов ефекат на супресију патогене улоге дендритских ћелија (енгл. *dendritic cells*-DC) у оштећењу дебелог црева није откривен. У овом истраживању су по први пут описани ефекти MSC на DC у колитису изазваним декстран натријум сулфатом, који представља добар модел за истраживање улцерозног колитиса. Два милиона MSC су интраперитонеално апликоване дневно подељених у три дневних доза. Оцењивање знака развоја болести, анализирање ћелија имунског система које су инфилтрисале *lamina propria* дебелог црева и продукције системских цитокина је коришћено за процену ефеката MSC. Додатно је спроведена деплеција макрофага и пасивни трансфер *in vivo* стимулираних DC, као и култивисање MSC и DC, одређивање продукције цитокина и промене фенотипа DC. Апликоване MSC су позитивно утицале на смањење развоја колитиса. Апликације су значајно смањиле прогресију болести, смањиле продукцију системских проинфламацијских цитокина (IL-1 $\beta$ , IL-12 и IL-6) и редуковале процентуалну заступљеност инфилтрисаних проинфламацијских ћелија имунског система у *lamina propria*. Њихов позитиван ефекат на ублажавање знакова колитиса је био евидентан чак и након деплеције макрофага. Пасивни трансфер *in vivo* MSC стимулираних DC ублажио је озбиљност колитиса. MSC паракриним начином, продукцијом Галектина 3 смањиле су продукцију проинфламацијских цитокина (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 и IL-6) у DC и умањиле експресију CD86, CD80 и I-A молекула на њиховој мембрани укључених у презентацији антигена. Све заједно, ови резултати указују да апликоване MSC позитивне ефекте на смањење колитиса изазваног декстран натријум сулфатом постижу супресијом DC.

**Кључне речи:** мезенхималне матичне ћелије, колитис изазван декстран натријум сулфатом, дендритске ћелије.

## **ABSTRACT**

Mesenchymal stem cells (MSC) have therapeutic potential in many conditions, including gastrointestinal diseases. Their effect on suppression of pathogenic role of dendritic cells (DC) in colon injury is not revealed. Here, for the first time is described the effects of MSC on dendritic cells in dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis, used as a well-established model of ulcerative colitis. Divided in three doses, two million MSC were intraperitoneally administered daily. Assessing signs of disease development, analysis of infiltrated of immune cells in colon *lamina propria* and production of systemic cytokines were used to evaluate effects of MSC. Additionally, depletion of macrophages and passive transfer of *in vivo* primed DC was performed, as well as co-culture of DC and MSC, measurement of cytokines production and phenotype changing of DC. Administered MSC positively affects the decreased development of colitis. The administration of MSC significantly reduced progression of disease, decreased the production of systemic proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-12, and IL-6), and reduced percentage of infiltrated proinflammatory immune cells in *lamina propria*. Their effect was evident even after depletion of macrophages. Passive transfer of *in vivo* MSC-primed DC reduced severity of colitis. MSC in paracrine manner, by increased production of Galectin 3, down-regulated the production of proinflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, and IL-6) in DC, and attenuated expression of CD86, CD80 and I-A, molecules on their membranes involved in antigen presentation. Taken together, these results indicate that applied MSC achieve positive effects on attenuation of DSS-induced colitis by suppressing DC.

**Keywords:** mesenchymal stem cells, dss-induced colitis, dendritic cells

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. МЕЗЕНХИМАЛНЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. ПЛАСТИЧНОСТ И ПОТЕНТНОСТ .....	3
1.1.2. РЕГЕНЕРАТИВНИ ПОТЕНЦИЈАЛ.....	4
1.1.3. ИМУНОМОДУЛАТОРНЕ ОСОБИНЕ MSC.....	6
1.1.3.1. Макрофаге.....	6
1.1.3.2. Дендритске ћелије .....	7
1.1.3.3. Т лимфоцити .....	7
1.1.3.4. В лимфоцити.....	8
1.1.3.5. НК и NKT ћелије.....	8
1.1.4. ЗНАЧАЈ MSC КАО ПОТЕНЦИЈАЛНОГ АГЕНСА У ТЕРАПИЈИ .....	9
<b>1.2. УЛЦЕРОЗНИ КОЛИТИС</b> .....	<b>11</b>
<b>1.3. АНИМАЛНИ МОДЕЛИ ЗАПАЉЕЊА ДЕБЕЛОГ ЦРЕВА</b> .....	<b>18</b>
<b>1.4. АНИМАЛНИ МОДЕЛ ЗАПАЉЕЊА ДЕБЕЛОГ ЦРЕВА ИЗАЗВАНОГ ДЕКСТРАН НАТРИЈУМ СУЛФАТОМ</b> .....	<b>20</b>
<b>1.5. АПЛИКАЦИЈА MSC У МИШЈЕМ МОДЕЛУ ЗАПАЉЕЊА ДЕБЕЛОГ ЦРЕВА ИЗАЗВАНОГ DSS-ОМ</b>	<b>26</b>
<b>2. ЦИЉ РАДА</b> .....	<b>28</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	<b>29</b>
3.1. ЛАБОРАТОРИЈСКЕ ЖИВОТИЊЕ .....	29
3.2. ИЗАЗИВАЊЕ АКУТНОГ ЗАПАЉЕЊА ДЕБЕЛОГ ЦРЕВА ДЕКСТРАН НАТРИЈУМ СУЛФАТОМ .....	29
3.3. ПРОЦЕНА РАЗВОЈА СИМПТОМА БОЛЕСТИ И ОДРЕЂИВАЊЕ КЛИНИЧКОГ СКОРА .....	29
3.4. ПАТОХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА ОШТЕЋЕЊА ДЕБЕЛОГ ЦРЕВА .....	30
3.5. АПЛИКАЦИЈА МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА .....	31
3.6. АНАЛИЗА ПРОДУКЦИЈЕ ЦИТОКИНА И ФАКТОРА .....	32
3.7. ИЗОЛАЦИЈА ЋЕЛИЈА ИЗ <i>LAMINAE PROPRIAE</i> ДЕБЕЛОГ ЦРЕВА .....	33
3.8. АНАЛИЗА ЋЕЛИЈА ПРОТОЧНОМ ЦИТОМЕТРИЈОМ .....	33
3.9. ДЕПЛЕЦИЈА МАКРОФАГА.....	36
3.10. ИЗОЛАЦИЈА ДЕНДРИТСКИХ ЋЕЛИЈА.....	36
3.11. ПАСИВНИ ТРАНСФЕР ДЕНДРИТСКИХ ЋЕЛИЈА .....	37
3.12. КОКУЛТИВАЦИЈА ДЕНДРИТСКИХ ЋЕЛИЈА И MSC.....	38
3.13. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА .....	38
<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b> .....	<b>39</b>
4.1. MSC СМАЊУЈУ ЗНАКЕ КОЛИТИСА ИЗАЗВАНОГ DSS-ОМ.....	39
4.2. MSC СМАЊУЈУ ПРОДУКЦИЈУ СИСТЕМСКИХ ПРОИНФЛАМАЦИЈСКИХ ЦИТОКИНА .....	41
4.3. АПЛИКАЦИЈЕ MSC СУ УТИЦАЛЕ НА СМАЊЕЊЕ ПРИСУСТВА ПРОИНФЛАМАЦИЈСКИХ ЋЕЛИЈА ИМУНСКОГ СИСТЕМА.....	41

<b>4.4. MSC су ублажиле колитис након деплеције макрофага.....</b>	<b>46</b>
<b>4.5. MSC <i>IN VITRO</i> смањују продукцију проинфламацијских цитокина DC на паракрини начин .....</b>	<b>48</b>
<b>4.6. Пасивни трансфер <i>IN VIVO</i> стимулираних DC мишевима на третману DSS утиче на знаке колитиса.....</b>	<b>52</b>
<b>5. ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>54</b>
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>62</b>
<b>7. РЕФЕРЕНЦЕ.....</b>	<b>63</b>
<b>БИОГРАФИЈА .....</b>	<b>78</b>
<b>БИБЛИОГРАФИЈА .....</b>	<b>78</b>
<b>8. ПРИЛОГ .....</b>	<b>80</b>
<b>8.1. Кључна документацијска информатика .....</b>	<b>80</b>
<b>8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>84</b>

## 1. УВОД

У уводном делу објашњени су појам и могућности мезенхималних матичних ћелија њихова потентност, пластичност, регенеративни капацитет и способност имуномодулације. Објашњена је етиологија и патогенеза улцерозног колитиса људи, као и најчешће коришћени анимални модели у истраживању овог процеса. На крају овог поглавља приказани су познати ефекти мезенхималних матичних ћелија у имуномодулацији и њихов терапеутски потенцијал у запаљењу дебелог црева миша изазваног декстран натријум сулфатом.

### 1.1. Мезенхималне матичне ћелије

Мезенхималне матичне ћелије (енгл. *Mesenchymal Stem Cell*-MSC) су хетерогена популација нехематогених ћелија које имају способност самообнављања, клоногености и диференцијације [1,2]. Откривене су радом *Friedenstein* и сар.[3] 1966. године када је у хетерогеној популацији коштане сржи, узгајаних у присуству 10% серума фетуса говеда (енгл. *Foetal bovine serum* - FBS), детектована група ћелија високе митотске активности која је имала особине да се лепи за пластичне подлоге, формира колоније, подржи хематопоезу и диференцира у остеобласте формирајући коштане структуре. Те колоније су настајале од само једног типа ћелија названог *colony forming unit fibroblasts* (CFU-Fs), јер су појединачно личиле фибробластима [4]. Даљим истраживањима и развојем техника изолација ћелија, крајем 80-их и почетком 90-их година прошлог века показало се да се та група ћелија може усмерити у настајање других ћелија мезенхималног порекла (хондробласти, адипоцити), па их је *Caplan* [5] назвао мезенхималним матичним ћелијама [6]. Данас је познато да се налазе и могу се изоловати из великог броја феталних и адултних ткива и органа мезенхималног порекла како код животиња тако и човека [7–9], у којима служе као извор ћелија за регенерацију, али и као регулатори имунолошких процеса у тим органима [2,9]. Анатомска локализација MSC је околина васкуларног система, у близини базалне мембране и различита је од хематопоетских матичних ћелија (енгл. *hematopoietic stem cell* - HSC), које су ближе ендостоуму и које стварају ћелије крви [2,10]. Сматра се да воде порекло од перицита, периваскуларних ћелија које окружују капиларе са којима деле неке карактеристике [11,12], али тачно место њиховог порекла до данас није откривено [13]. Приликом оштећења или запаљења крвног суда перицити се одлепљују од крвног суда и диференцирају у MSC, након чега почињу да секретују

спектар биоактивних трофичких молекула, који служе као баријера против прекомерно стимулираних ћелија имунског система, спречавајући на тај начин даља оштећења [12]. Оне не стварају ћелије крви, али значајно доприносе убрзавањем процеса, нарочито при стварању мијелоидних ћелија, не само директним начином и контактом са HSC, него и ангажовањем околних ћелија и представљају круцијалну компоненту нише матичних ћелија [14–17]. Ова чињеница је веома значајна нарочито због повећања успешности калемљења хематопоезних ћелија, јер је показано да се истовременом трансплантацијом успешност калемљења знатно повећава [14,15]. За истраживања, али и као обећавајући кандидати за терапију, MSC се најчешће изолују из коштане сржи у којој су веома слабо присутне (0,001-0,01% једарних ћелија), чак и 10 пута мање у односу на HSC и са старашћу тај број значајно опада [4,18–20]. Због изолације из гребена бедрене кости која представља болан процес по пацијента, масно ткиво представља алтернативни богатији извор лако доступних ћелија [4,21]. Оно садржи и преко 100 пута више ћелија које се изолују из масног ткива издвојеног приликом биопсија или козметичких интервенција, као што је липосукција [4]. Поред ових ткива оне се могу изоловати и из крви и везивног ткива (Вартонове пихтије) пупчане врпце, зубне пулпе, периостеума, синовијалне мембране и течности, зглобне хрскавице, феталних ткива, амнионске течности, плаценте, периферне и менструалне крви [8,9,15]. С обзиром на разноликост ткива и врсте животиња из које се изолују, оне показују и различите биолошке, фенотипске, регенеративне (потентне) и имуномодулаторне особине, јединствене и специјализоване функције [2,8,22,23]. Због тога је Комитет за MSC Међународног друштва за ћелијску терапију (енгл. *The International Society for Cellular Therapy-ISCT*) 2006. године донео минималне критеријуме које морају да се испуне за карактеризацију хуманих MSC, а то су: лепљивост за пластику, способност да се њихово диференцирање усмери у најмање три типа ћелија мезодермалног порекла (остеобласте, хондробласте и адипоците) у лабораторијским условима и да испољавају маркере CD105, CD73 и CD90, а не испољавају маркере HSC (CD45, CD34, CD11b, CD19, CD31, CD79 $\alpha$  и молекуле главног комплекса ткивне подударности (енгл. *Major histocompatibility complex*–MHC) II класе) [24]. Заједничко за све MSC, без обзира на извор, је да засејане у пластичним посудама у *in vitro* условима образују брзорастуће колоније чије ћелије имају вретенаст изглед, налик фибробластима (енгл. *spindle shape*), показују генетску стабилност при дуготрајним култивисањем и да су имунопривилеговане приликом трансплантације [21]. Изолација MSC почиње након издвајања ткива са жељеним ћелијама, а пре започињања култивисања, оно се може подвргнути деловању ензима, али и коришћењем разних



техника раздвајања, пречистити [4,25]. У основи, ћелије се пречишћавају на основу њихове особине да се лепе за подлогу, где се остале нежељене ћелије са променама хранљивог медијума одстрањују, а са пресејавањима елиминишу из културе [4,25]. Значај истраживања MSC као потенцијалног терапеутског агенса, осим у хуманој популацији, битан је и за ветеринарску медицину [26]. *Carrade* и *Borjesson* су у свом раду сумирали податке студија које су испитивале ефекте MSC апликованих другим животињама осим лабораторијских и подједнако показали значајну потенцијалну ефективност, али и ризике [26].

### **1.1.1. Пластичност и потентност**

Иако се сматра да имају могућност стварања неколико типова ћелија истог клициног листа (мултипотентност) [7], у лабораторијским условима се могу усмерити (диференцирати) у ћелије и друга два клицина листа (плурипотентност), као што су олигодендроцити (ектодерм) и хепатоцити (ендодерм) [15]. Савременим приступом култивације и усмеравања могу се добити велики број типова (пластичност) соматских ћелија. Досадашња истраживања су показала веома лако усмеравање у ћелије коже, нервне ћелије,  $\beta$  ћелије гуштераче, хепатоците [27]. Усмеравања у нове типове крајњих ћелија се може извршити помоћу спољних и унутрашњих фактора, употребом механичких сигнала и разних молекула. Овај веома сложени процес и комплексни однос између ћелија и супстрата или матрикса у коме се налазе утиче на понашање ћелија, делујући на мембранске протеине и компоненте ћелијског скелета, као и на процесе синтезе разних компоненти ћелија неопходних за њено нормално функционисање [28]. Сви ови процеси утичу на промену брзине умножавања ћелија и последично на даљу диференцијацију. Позната је улога густине ћелија, односно, њихов облик у супстрату и спољних механичких сигнала (осцилаторни проток течности, хидростатски притисак, компресија и тензија) као кључних регулатора за одређивање ћелијске судбине [28]. Механички сигнали, преко бројних протеина ћелијске мембране (интегрини, кадхерини, катенини), који заједно са унутарћелијским компонентама образују места за везивање бројних протеина укључених у одржавање ћелијског скелета и сигналну каскаду преноса сигнала у једру, утичу на експресију гена и синтезу протеина [28]. Од бројних протеина који су у вези са механичким стимулусима, а који утичу на судбину ћелије, су RhoA GTPаза и ROCK киназе, који имају улогу у регулацији контрактилности и фосфорилације нисходне каскаде [28]. MSC прилагођавају фенотип који одговара ткиву показујући ткивно-зависну ћелијску морфологију, експресију гена, активацију транскрипционих фактора и

производњу протеина [28]. Од услова културе које имају селективни ефекат, концентрација кисеоника има критични значај, јер се са смањењем атмосферске концентрације на хипоксију постиже позитиван ефекат на умножавање и диференцијацију мишјих MSC [16].

Поред механичких (нерастворљивих), на усмеравање ћелија имају утицај и хемијски (растворљиви) стимулуси [29]. Ти растворљиви (фактори, цитокини) стимулуси учествују у одлучивању пута диференцијације MSC тако што утичу на ензимске и унутарћелијске сигналне путеве [29]. MSC имају велику потентност која се карактерише способношћу да се добије жељени ефекат (диференцијација или имуносупресија), што је показано у различитим експерименталним условима [30]. Претходно публиковане студије показале су веома успешно добијање функционалних миобласта, тетива и лигамената, неуронима и олигодендроцитима сличним ћелијама, епителних ћелија,  $\beta$  ћелија панкреаса и хепатоцита [27,31–34].

### **1.1.2. Регенеративни потенцијал**

Ефекти MSC се огледају и у смањењу оштећења и повећању регенерације ткива приликом и након повреда или болести, обезбеђујући замене за ћелије које се не обнављају и учествујући у подршци динамике обнове ткива [6,15]. Механизам којим MSC учествују у обнављању ткива може да зависи од типа оштећења [19]. За разлику од аутоимунских болести, у којима учествују модулацијом функција ћелија имунског система, код оштећења коштаног-зглобног и мишићног система, диференцијација и замена оштећених ћелија је вероватно главни механизам деловања, док је код обнове других ткива он вероватно посредован секрецијом разних фактора којима утичу на настајање и развој фибробласта и ендотелних ћелија, главних типова ћелија укључених у процесе репарације [19]. Након трансплантације, оне селективно мигрирају у та подручја где испољавају регенеративне особине, што их чини атрактивним кандидатом за терапију специфичног места (енгл. *site-specific therapy*) [15]. Augello и сар. су анализирали претходно публиковане податке и показали да свеже изоловане, некултивисане MSC мигрирају у коштану срж и слезину након системске трансплантације у мишјим моделима, док култивисане немају ту способност [8]. Ове разлике у потенцијалу за миграцију се могу објаснити разним експерименталним условима, који утичу на обрасце миграције, али и поред тога се сматра да MSC могу да стигну у оштећено ткиво [8]. Примећено је да у патолошким условима може доћи до мобилизације и повећања ендогених, циркулишућих MSC као одговор на ослобођене високе концентрације инфламацијских хемокина након

оштећења ткива [9]. Такође, присутне ћелије имунског система и хемокини које секретују те ћелије у оштећеном ткиву имају важну улогу за регенеративни потенцијал MSC у већини случајева, јер оне радије мигрирају у ткива са инфламацијом и то повећаном експресијом хемокинских рецептора. Такође, њихов имуносупресивни потенцијала је зависан од секреције прозапаљењских фактора [19]. Сам начин доласка у промењено ткиво и изласка из крвних судова није до краја разјашњен, иако се сматра да у том процесу учествују механизми посредовани селектинима и интегринима, које користе леукоцити у трансмиграцији, или бивају једноставно задржани у крвним судовима малих промера [35,36]. Постоји могућност да се применом техника генетског инжењеринга или претретманом проинфламацијским цитокинима поправи калемљење, а самим тим и терапеутски ефекат [19,37,38]. Такве модификоване ћелије имале би велики значај у многим моделима болести, укључујући туморе у којима би MSC инхибирале раст тумора и ангиогенезу [37]. Међутим, на ефекте трансплантираних MSC утичу начин и услови култивације, начин, време, место и количина ћелија за трансплантацију као и потенцијални механизам за њихово калемљење [35]. Поред особина да одговарају на стимулусе и диференцирају MSC, имају способност да секретују велики број фактора раста и цитокина којима делују и аутокринно и паракринно [6]. Секретовани биомолекули утичу директно, индиректно или на оба начина, мењањем интрацелуларне сигнализације или подстичући циљане ћелије на секрецију функционалног активног молекула, делујући ангиогено и антиапоптозски, ограничавајући оштећења ткива и успостављајући поново снабдевање крвљу [6,39]. MSC имају особине да након активирања организују регенеративно микроокружење секрецијом биомолекула и регулисањем имунског одговора, што указује да *in vivo* служе као ткивно-локална „апотека“ [2]. Активности имуномодулације су посредоване секрецијом биоактивних молекула или директним ћелијским контактом између MSC и ћелија имунског система. Док трофички или регенеративни ефекат MSC остварују секрецијом молекула који инхибирају апоптозу и формирање ожиљака, митогена који утичу на правилну деобу и диференцијацију ћелија и молекула који стимулишу ангиогенезу [2,22]. Да би MSC биле терапеутски делотворне оне не само да морају да смање запаљењски одговор или аутоимунску активност, него морају и да стимулишу диференцијацију и ткивно-специфичне функције ћелија локалног ткива [2], што је показано након апликације MSC код кардиоваскуларних оштећења, фиброзе плућа, повреда кичмене мождине и повреда костију и хрскавице [36]. Поред ових особина, MSC секретују протеине са антибактерицидним дејством (пептид LL37), које не само да убијају бактерије, већ и стимулишу макрофаге да фагоцитују токсине и

деструктивне елементе, чиме се смањују штетни ефекти [2,22,40]. Због наведеног, *Caplan* је предложио да се MSC уместо мезенхималних матичних ћелија назову медицинске сигналне ћелије и задржи исти акроним (енгл. *Medicinal Signaling Cells-MSC*) [12,41].

Поред директне апликације и самосталне трансплантације, а нарочито у ткивном инжењерству, MSC се могу користити у комбинацијама са разним носачима (енгл. *scaffolds*) који им омогућавају лакшу адхезију, преживљавање и развој ка ћелијама калемљеног ткива [9].

### **1.1.3. Имуномодулаторне особине MSC**

Поред потентних особина, MSC испољавају плеотропне имунорегулаторне активности у *in vitro* и *in vivo* условима које инхибирају или промовишу функције различитих субпопулација ћелија имунског система [10]. С обзиром да немају или слабо експримирају молекуле МНС, а не експримирају костимулаторне молекуле, сматра се да су слабо имуногене или имунолошки незреле, имунопривилеговане, одн. невидљиве за ћелије имунског система домаћина [15]. То је веома битно, нарочито због алогених трансплантација ћелија, јер при таквим апликацијама не долази до одбацивања калема [15]. Начини на које MSC делују на ћелије имунског система су примарно секрецијом солубилних фактора, али и директном међућелијском интеракцијом [37,42,43]. Иако је показано да MSC нестају релативно брзо након системске администрације, њихов имunosупресивни ефекат се задржава дуже, стога администрација супернатанта, одн. медијума у коме се узгајају и који садржи факторе које продукују MSC такође може бити потенцијално ефикасан у третману неких болести [44]. Због разлика између врсти животиња и релевантности превођења добијених резултата са анималних модела као модела хуманих болести, применом генетског инжењеринга створени су хуманизовани миши модели у којима се могу испитивати имуномодулаторна својства MSC [23].

#### **1.1.3.1. Макрофаге**

Макрофаге (МФ) су ћелије имунског система које се активирају током ране фазе запаљења и имају неколико различитих функционалних стања, којима учествују у промовисању имунског одговора, регрутовању и активирању инфламацијских ћелија, али и смањењу одговора, секрецијом антиинфламаторних цитокина и повећањем апоптотског потенцијала [45]. MSC имају способност поларизације МФ из класично активiranог (проинфламацијског, М1) ка алтернативно активiranом (антиинфламацијског, М2) фенотипу, који не само да поседује регулаторну активност већ истовремено учествује и у

процесима обнове ткива [46]. Иако се тачан механизам поларизације МФ још увек не зна [47], зна се да је посредован различитим солубилним факторима, што су бројне студије показале коришћењем инхибирајућих агенаса [46,48,49]. Такође, постоје подаци који указују да МФ имају способност да регулишу имуномодулацију MSC [47] и стимулишу инхибирање пролиферације и активације Т лимфоцита и НК (природно убилачке, енгл. *natural killer*-NK) ћелија секрецијом солубилних фактора [46,49,50].

#### 1.1.3.2. Дендритске ћелије

Дендритске ћелије (енгл. *dendritic cell*-DC) представљају главне регулаторе отпочињања и одржавања имунских процеса посредованих активацијом Т лимфоцита и стимулисањем ћелија урођеног имунског система [46,51]. За потпуну активацију DC и промену фенотипа, неопходна је експресија костимулаторних молекула. MSC имају способност смањивања експресије костимулаторних молекула CD40, CD80, CD83 и CD86 на DC и спречавају настајање зрелих из незрелих прекурсора моноцита блокирањем ћелијског циклуса у G<sub>0</sub> фази [19,52]. Иако су доста истраживани, молекуларни механизми нису до краја разјашњени и зависе од фазе матурације DC, као и њиховог међусобног односа и углавном су посредовани солубилним факторима, али и директним ћелијским контактом [19,52–54]. Познато је да DC у присуству MSC смањују секрецију проинфламацијских цитокина (IL-12, TNF $\alpha$ ) након стимулације рецептора сличних Толу (енгл. *Toll-like receptor*-TLR) и експресију MHC молекула II класе, што за последицу има непотпуну активацију DC [10,19]. Поред директног ефекта на матурацију, активацију и презентацију антигена, MSC инхибирају ћелијску пролиферацију заустављањем ћелијске деобе [37]. Поред улоге у презентацији антигена, „едуковане“ DC имају улогу у усмеравању диференцијације наивних Т лимфоцита, тако што спречавају диференцијацију и пролиферацију помоћничких (енгл. *T helper*-Th) и цитотоксичних (енгл. *cytotoxic T lymphocyte*-CTL) Т лимфоцита и стимулишу експанзију регулаторних Т лимфоцита [46].

#### 1.1.3.3. Т лимфоцити

MSC могу да супримирају пролиферацију и активацију Т лимфоцита без MHC рестрикције [10]. MSC показују снажан инхибиторни ефекат на пролиферацију, али релативно слабије ефекте на ефекторске функције Т лимфоцита [52,53]. Механизми којим MSC остварују овај ефекат зависе од солубилних фактора које MSC продукују, али и од директног међућелијског контакта, што је и показано у раличито дизајнираним експериментима [19]. Директни међућелијски контакт између MSC и Т лимфоцита, остварен посредством протеина 1 програмиране ћелијске смрти (енгл. *Programmed cell*

*death protein 1* - PD-1) који индукује апоптозу, као и секреција солубилних фактора, између осталих PGE2 и TGF $\beta$ , учествују у супресији Т лимфоцита [10,19]. Смањењем циклина D2 и одсуством експресије костимулаторних молекула MSC узрокују застој ћелијске деобе Т лимфоцита у G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> фази ћелијског циклуса, изазивајући анергију без апоптозе [10]. Поред застоја у деоби оне утичу на смањену секрецију цитокина и цитотоксичност [37]. Такође, кокултивација MSC са Т лимфоцитима, поларизује одговор у правцу Th2 ћелија и смањује цитотоксичност CTL [10]. Истовремено, MSC индукују и повећавају степен експанзије CD4 и CD8 регулаторних Т лимфоцита [53]. Резултати студија показују да су имуносупресивни ефекти MSC дозно зависни, односно да у зависности од број кокултивисаних MSC, ефекат може бити супресија деобе или пролиферација Т лимфоцита [9, 10].

#### 1.1.3.4. В лимфоцити

Слично Т лимфоцитима, број кокултивисаних MSC може имати различите ефекте на В лимфоците, од индукције анергије ћелијског застоја, смањења пролиферације и продукције антитела до активације и матурације В лимфоцита [10,37,52]. Овакве ефекте MSC остварују делимично директним контактом преко PD-1/PD-L1 и L2 интеракција, а делимично секрецијом солубилних фактора [19].

#### 1.1.3.5. NK и NKT ћелије

MSC инхибирају пролиферацију NK и LAK (енгл. *lymphokine-activated killer cell*-LAK), секрецијом солубилних имуносупресивних фактора (PGE2, TGF $\beta$ , HLA-G, IDO), и/или директним ћелијским контактом [10,19]. MSC спречавају ефекторске функције, као што је цитотоксичност, смањењем експресије активационих рецептора на NK ћелијама [10,19]. Супресијом њихових функција смањује се инфилтрација неутрофила и активација резидуалних макрофага [55]. Обзиром на улогу NK ћелија у регулацији имунског одговора која се огледа у њиховој способности да промовишу или инхибирају сазревање реагујући са DC и да имају могућност да убију DC, али и да подрже њихово сазревање, инхибирање њихових функција може да има велики терапеутски значај [46]. Међутим, свеже изоловане или активирани NK ћелије имају способност да лизирају, одн. убију MSC [10,19]. Поред тога, MSC ћелије делују и на NKT ћелије тако што смањењују њихову цитотоксичност, пролиферацију и продукције IFN $\gamma$  [55].

#### 1.1.4. Значај MSC као потенцијалног агенса у терапији

Поред способности да се диференцирају у различите типове ћелија, MSC секрецијом солубилних фактора активно учествују у регенерацији ткива, што је повезано са потентношћу и ефикасношћу матичних ћелија [30]. Резултати досадашњих студија показују да се чак и донорске MSC које нису високо компатибилне са примаоцем, могу користити у терапији при чему њихова способност имуномодулације и калемљења остаје непромењена [10].

Из резултата бројних студија, може се закључити да на терапеутски потенцијал MSC значајно утичу начин и место изолације као и примена методе за пропацију и диференцијацију [10]. У прилог су и резултати студија у којима је показано да различити услови култивације чак могу и да повећају ризик од појаве нежељених ефеката, што представља велику бојазан и опасност по већ нарушено здравље људи [8,37]. Једна од препрека у терапијској примени MSC су неопластичне трансформације, као и чињенице да могу својим имуносупресивним функцијама након трансплантације да подрже раст тумора, али и могућности преноса инфекција са донора на примаоца [10]. Дуготрајним култивисањем, мишће MSC акумулирају хромозомске абнормалности, могућа је појава малигнух трансформација, док компоненте културе, нпр. FBS, делују не само на ћелије, већ и постоји могућност преноса разних животињских патогена на примаоца [8,37]. Као замена за употребу FBS, постоји неколико доступних модификација медијума које садрже додатке хуманог порекла (серум) или хемијске додатке који у потпуности замењују серум којима би требало да се отклони таква бојазан [56]. Број коришћене пасаже, као и време дуплирања популације ћелија знатно утиче на примену MSC, јер указује на старење ћелија као и потенцијалну ефикасност [55]. Коришћењем криопрезервираних MSC за трансплантацију непосредно после одмрзавања, показан је смањени имуносупресивни ефекат MSC на ћелије имунског система, нарочито ако су трансплантиране у току првих 24 сата након одмрзавања [55]. Такође, у неким патолошким стањима, MSC могу да испоље неочекиване и вероватно нежељене ефекте интеракцијом са другим ћелијама у нефизиолошким ектопичним нишама [37]. Због свега тога неопходно је да се пре било какве клиничке употребе истражи време и дужина, доза и извор MSC, као и начин култивације пре апликације [10]. Због способности да се акумулирају у делове ткива захваћена тумором, MSC представљају одлична средства за пренос антиканцерогених агената, тако што би били носачи гена чијим би се активирањем секретовали молекули у самом ткиву у већој концентрацији и без нежељених ефеката, него да се егзогено апликују

[17]. Поред тога, трансфициране MSC могле би да буду носачи страних гена за ензиме који би се активирали доласком у тумором промењеном ткиву и чијом активношћу би се мање токсичан системски апликован пролек претворио у цитотоксичну супстанцу, која би ефективно убила ћелије тумора које је окружују [57]. Уз то, MSC у том ткиву би индуковале елиминисање тако оштећених ћелија активношћу NK ћелија и Т лимфоцита [57]. Изузетан значај оваквог приступа би био у терапији тумора који су метастазирали [17].

Потенцијална терапеутска корист апликације MSC се годинама уназад испитује на различитим анималним моделима [2]. Поред преклиничких истраживања, спроведен је и велики број регистрованих клиничка истраживања која су испитивала значај и ефекте MSC за трансплантацију коштане сржи, калем-против-домаћина болести, акутног инфаркта миокарда, можданог удара, повреда кичмене мождине, плућа, акутног отказивање бубрега, фиброзе јетре, дијабетеса, опекотина и повреда коже, мултипле склерозе, остео- и реуматоидни артритиса, лупуса, сепсе и запаљењске болести црева [2,58]. Претраживањем службене интернет странице базе података регистрованих клиничких истраживања у Националној библиотеци медицине Националног института за здравство Сједињених Америчких Држава (*ClinicalTrials.gov*) према термину *mesenchymal stem cell* показано је да постоји 648 регистрованих клиничких истраживања у хуманој медицини [59]. Међутим, и поред свакодневних нових сазнања о начину деловања и корисним ефектима MSC, за велики број стања још увек нису дефинисани количина, дужина, као и начин или место апликације [30]. Присуство MSC на самом почетку запаљења може спречити даљи продор проинфламацијских ћелија имунског система и спречити стварања великих количина везивног ткива на месту оштећења и даље стварање ожиљка [60]. То се нарочито може објаснити са стварањем великих ожиљака код старијих људи, због мањег присуства MSC у локалном ткиву [60]. Количина апликованих ћелија представља критични корак, јер се и након интравенске апликација великих количина ћелија оне некад не могу детектовати у циркулацији [60]. Ово је нарочито видљиво у току хроничних болести где се почетак запаљења са сигурношћу не може одредити, а MSC нису детектабилне у крвотоку [60]. Студије на глодарима су показале да се након системске трансплантације велика количина MSC зауставља у плућима и јетри тако да све MSC немају потенцијал да достигну циљано ткиво [20,61], док један део трансплантованих MSC ипак стигне до оштећеног или тумором промењеног ткива у којима испољавају терапеутски ефекат [23]. Поред тога, место апликације утиче на ефикасност и расподелу MSC, на пример код глодара репном венном се може апликовати



релативно мала количина ћелија, док се апликацијом у аорти заобилазе и јетра и плућа, чиме се повећава могућност доласка до циљаног ткива, чак и са мањом количином ћелија [60]. Директна апликација ћелија у ткиво представља најбољи метод достављања ћелија, међутим за сва ткива она није могућа [35]. Као рута или место за апликацију чији су циљни орган у абдомену, иако недовољно истраживан начин трансплантације [35], перитонеална апликација представља високо ефикасан начин за достављање ћелија [60]. То је изузетно значајно за терапију запаљењске болести црева и улцерозног колитиса, као његову форму. Због својих имуномодулаторних особина, терапеутски потенцијал је нарочито велики у третману аутоимунских болести и болестима посредованим имунским ћелијама, што је и показано на анималним моделима дијабетеса, реуматоидног артритиса, системског лупуса и мултипле склерозе [37].

## 1.2. Улцерозни колитис

Запаљењска болест црева (енгл. *Inflammatory Bowel Disease-IBD*) представља хронично идиопатско понављајуће запаљење дигестивног тракта које обухвата два главна ентитета, улцерозни колитис (енгл. *Ulcerative colitis-UC*) и Кронову болест (енгл. *Crohn's disease-CD*) [62–66]. Ова два ентитета разликују се по локализацији помена и слојевима ткива која захвата, као и озбиљности запаљења [62–64]. Код улцерозног колитиса запаљење се јавља на површинским слојевима (мукоза и субмукоза) и почиње од правог црева (ректум) и са временом континуирано проксимално напредује захватајући дебело црево (колон) све до предњег дела [63,64], док се код Кронове болести повремено запаљење јавља на свим слојевима и може да захвати све делове дигестивног тракта [65]. Поред ова главна ентитета постоје још и микроскопски колитис и неодређени колитис (енгл. *indeterminate colitis*), кога одликује запаљење дебелог црева са карактеристикама и Кронове болести и улцерозног колитиса, али и микроскопског колитиса и који због нејасних знакова болести, обухвата 10-15% случајева IBD [65,66]. Микроскопски колитис представља заједнички термин две форме веома сличног запаљења, колагенозни и лимфоцитни колитис, релативно честе болести пацијената са воденастим дијарејама без крварења (узрок непознат), која се дијагностикују хистопатолошким прегледом узорака узетим приликом дијагностичке колоноскопије [67,68]. Главни симптоми активног UC су промене у понашању црева са појавом грчева и трбушних болова у доњој левој четвртини стомака са хитним позивима за дефекацију и појавом пролива и крварењима из ануса [66,69]. Промене на епителу црева код UC су ограничене на мукози и субмукози са

појавом криптитиса и криптних апсцеса, док се код CD јављају истањење субмукозе, трансмуралне инфламације, фисуре и грануломи. Дијагноза се поред процене клиничких симптома, поставља на основу типичних налаза хистопатолошког прегледа узорака биопсије узетих приликом колоноскопије и методама стандардног и савременог радиолошког и ултразвучног прегледа [66,69,70]. Неколико светских удружења гастроентеролога дала су смернице за класификовање клиничке активности улцерозног колитиса на благи, средњи и озбиљно стање, која су углавном базирана на знаке и симптоме болести без обзира на друге аспекте болести [71]. Поред ових смерница, за процену стања UC користе се и неколико других инструмената за класификовање болести, као што су Мејо скор (назван по *Mayo Clinic*, кога су *Schroeder* и *Martin* [72] развили 1987. год. за потребе клиничког истраживања) и индекс активности болести улцерозног колитиса (енгл. *UC Disease Activity Index (DAI)*; кога су за потребе свог истраживања 1987. год. развили *Sutherland* и сар.[73]) [69,71]. Ове две методе, због објективности процена, су најчешће коришћена и обухватају сабирање нађених вредности четири компоненти прегледа: учесталост столице, присуство ректалног крварења, ендоскопска процена и општи лекарски преглед [69,71]. Покушавано је да се са различитим серолошким тестовима побољша дијагностика IBD и разликовање UC од CD [74]. Коришћена су антитела за различите учеснике у настајању или одржавању болести, али су због мале сензитивности и специфичности имали слабу предиктивну вредност [74]. Иако не постоји јединствен специфични макрер за процену стања, за лабораторијску дијагностику користи се С-реактивни протеин, брзина седиментације, фекални калпротектин, неоптерин и лактоферин [69,71,74]. Налази ендоскопије показују велику значајност, јер показују високу корелацију са симптомима крварења и учесталости столица које је пријавио пацијент, а да при томе ти подаци не утичу на налаз ендоскопије [75]. Резултати фекалног капротектина и ендоскопије се сматрају објективнијим налазом за потврђивање присуства болести [66,76].

Улцерозни колитис је првобитно био описан у Европским државама за време индустријских револуција [77]. *Molodecky* и сар. [78] су анализирали инциденце и преваленце за UC и CD досадашњих публикованих студија од 1930 до 2008 године за Европу, 1950-2008 за Азију и Блиски исток и за Северну Америку за период 1920-2004. година (Табела 1) и дошли до закључка да дијагноза IBD није толико везана за пол, али јесте за старост пацијента. Иако је код одраслих UC учесталији код мушкараца него код жена, код деце је учесталији код девојчица [79]. Пик инциденце за UC је у трећој деценији

[78], док је око 25% свих пацијената са IBD дијагностиковано у току првих двадесет година живота [62].

Табела 1. Приказ инциденци и преваленци према *Molodecky* и сар.[78]

	Европа		Северна Америка		Блиски исток и Азија	
	Улцерозни колитис	Кронова болест	Улцерозни колитис	Кронова болест	Улцерозни колитис	Кронова болест
инциденца	0,6-24,3/ 100.000	0,3-12,7/ 100.000	0-19,2/ 100.000	0-20,2/ 100.000	0,1-6,3/ 100.000	0,04-5,0/ 100.000
преваленца	4,9-505/ 100.000	0,6-322/ 100.000	37,5-248,6/ 100.000	16,7-318,5/ 100.000	4,9-168,3/ 100.000	0,88-67,9/ 100.000

Иако је широко истраживана претходних неколико деценија, етиологија IBD још увек је недовољно разјашњена [65,78]. Сматра се да је мултикаузалне етиологије, а у литератури се налазе подаци да у њеном настајању имају улогу скуп генетских фактора и фактора средине, од којих важну улогу има дисбаланс бактерија дигестивног тракта (микробиом) и неправиланог одговора ћелија имунског система на те бактерије [63,64].

Претходно публиковани резултати показали су потенцијално значајну улогу преко 200 варијанти генских алела који учествују у функционисању мукозне баријере, а чије су промене повезане са настајањем овог стања [80]. Истраживањем опште популације у Данској показана је наследност IBD, нарочито међу браћама и сестрама у првом степену сродства чије мајке имају дијагностиковану ову болест [80]. Такође, ова студија је показала да ризик наслеђивања зависи од старости рођака, па је код рођака млађих од 20 година нарочито изражен, док са протеком година и повећању степена сродства тај ризик опада [80]. Али и поред познавања ове чињенице у свега 8,2-13,1% болесника настајање болести се може објаснити генетским варијацијама, што указује учешће епигенетских и фактора окружења у настајању овог стања, тако да познавање породичне историје болести само по себи није довољно као прогностички фактор [80]. Иако због малог броја студија које су укључивале људе других боја коже сем беле популације, досадашњи резултати показују да нехиспано белци имају 3 пута већи ризик у односу на друге етничке групе [80]. Такође, постоје битне разлике између појединих група једне популација, па тако припадници Ашкенази Јеврејске етничке групе имају већу вероватноћу развијања ове болести од Сефардских, али и укупне популације Јеврејске етничке групе [80]. Интересантно је и да Ашкенази који живе у државама Европе и Америке показују већу инциденцу у односу на Ашкеназе који живе у Израелу [80]. Због прилива великог броја становника рођених у другим државама, Канада има највећу стопу преваленце и

инциденце у свету, иако стопе код домородачког становништва веома мале [80]. Иако је и инцидентца код потомака имиграната мања, ризик добијања IBD је исти као код немигрантских потомака нарочито ако су рођени у Канади или су се населили као деца, што указује на улогу раног живота у патогенези болести. Ту тврдњу поткрепљују чињенице да на појаву овог стања има начин рађања детета (вагинално насупрот царски рез), начин исхране и подоја (подој на сиси насупрот исхране базиране на вештачким формулама млека), лечење антибиотцима у првим данима живота, као и присуство старије браће и сестре [81]. Касни или одложени контакт са патогеним инфективним и инвазивним агентима након рођења може да води до развоја промењеног и неефикасног запаљењског процеса, вероватно чак и IBD [82]. Такозвану хигијенску теорију, коју је *Strachan* [83,84] првобитно повезао са повећаном појавом алергијске астме, као удружену групу фактора која има велики потенцијални значај у објашњењу настајања IBD, анализирали су *Koloski* и сарадници [82]. Значај ове хипотезе повезује се са чињеницом да се инцидентца појаве IBD повећава са побољшавањем социоекономског статуса, а самим тим и хигијене у земљама у развоју [82].

Поред резултата који повезују настајање и предложене друге факторе средине (исхрана, стрес, (зло)употреба лекова), конзумирање цигарета и апендектомија имају добро документовани значај у настајању CD, али не и UC [62,79,82]. Изненађујући је податак да пушење има протективни ефекат на настајање, а код пацијената са већ дијагностикованим UC почетак пушења има утицаја на смањење ризика од компликација болести, колостоме и хоспитализацијама [85]. *Kuenzig* и сар. су анализирали податке претходно публикованих студија и показали да бивши пушачи, одн. престанак пушења повећава ризик за колектомију, као компликације UC у поређењу са тренутним пушачима, чак и годинама након престанка [86]. Међутим, овај протективни ефекат је примећен код пушача који су у тренутку дијагнозе имали мање од 40 година, одн. чија је старост износила између 17 до 40 година [86]. Иако је ефекат пушења значајан, у поређењу са стандардном терапијом није показао значајнију корист, већ троструко повећану појаву других штетних ефеката, па се стога не препоручује код пацијената са UC [85]. *Radford-Smith* и сар. су показали да рана апендектомија има веома протективни ефекат, нарочито ако је извршена пре 20-е године у односу на старије пацијенте [87]. Међутим, недавно објављена студија *Perian* и сар. је показала да апендектомија у било ком периоду живота није повезана са смањењем озбиљности болести, док је чак апендектомија након постављања дијагнозе повезана са већим ризиком од колостомије [88].

Постоје студије које указују да начин исхране има значајан утицај, ако не на само настајање, онда сигурно у одржавање и/или смањења симптома болести [62,85,89,90]. Дуготрајна савремена (западна) исхрана (енгл. *westernized diet*) која се заснива на употреби висококалоричних намирница („брзе хране“, енгл. *Fast-food*) богатим мастима и угљеним хидратима, а сиромашним у протеинима, полинезасићених  $\Omega$ -3 масних киселина, витаминима, минералима и биљним влакнима нарушава нормално функционисање дигестивног система и повезана је са настајањем IBD, а њена популаризација код људи у земљама у развоју у складу је са повећаном инциденцом у тим земљама [62]. Утицај савремене исхране на појаву UC, *van der Logt* и сар. су експериментално показали на животињском моделу колитиса изазваног декстран натријум сулфатом [91]. Они су код мишева показали да исхрана богата мастима, нарочито ако је суплементирана и са црвеним месом (у студији коришћен хем, састојак црвеног меса, као индикатор за процену штетног ефекта) има изузетан адитивни ефекат на настајање и озбиљност колитиса [91]. На истом моделу *Cheng* и сар. су показали да исхрана са високим процентом масти појачава запаљење не само повећавајући инфилтрацију прозапаљењских ћелија и губитак архитектуре ткива колона, већ и нарушавајући пропорцију хематопоезе [92]. Иако је познато да уношење биљних влакана има значајну физиолошку и протективну улогу, *Ananthkrishnan* и сар. су показали да само влакна из воћа и вероватно из поврћа имају то својство и то само у превенцији Кронове болести, док влакна из житарица, легуминоза, као и целог зрна ни код Кронове болести ни код улцерозног колитиса не умањују ризик [90]. Поред употребе биљних влакана, неколико витамина (витамин D<sub>3</sub>, витамин B<sub>12</sub>) и минерала (цинк, гвожђе), одн. њихово недовољно уношење су повезани са настајањем и озбиљношћу UC [89]. Додатно, „брза исхрана“ обухвата и употребу разних конзерванаса и емулгатора у комерцијалној храни, који јој дају боље особине, али чије уношење изазива гастроинтестинална запаљења [89].

Предложено је да стрес има важну улогу у започињању, одржавању или чак у поновном јављању запаљења, због активације аутономног и ентеричког нервног система, који контролише секреторну и моторичку функцију црева [62,70,93,94]. Такозвана „мозак-црево оса“ обухвата аутономни и централни нервни и стрес-систем (осу хипотеламус-хипофиза-надбубрежна жлезда) са гастроинтестиналним кортиктропним системом и интестиналним одговором и има улогу у повезивању гастроинтестиналног интегритета и функционисања са нервним системом [94]. Стресогином активирањем ове осе модификује се покретљивост, секреција, цревна пропустљивост и локални имунски одговор (имунских ћелија) у цревима [70,93,94]. То омогућава пенетрирања бактерија у епител црева,

активацију имунског одговора и даљу транслокацију у лимфне органе у којима стимулишу ћелије урођеног имунског система, а због појаве медијатора запаљења јавља се висцерална осетљивост и бол [70,93,94]. То потврђује податак да је више од половине пацијената са IBD имало епизоду депресије више од 2 године пре дијагнозе и да апликација антидепресива редукује стопу поновног јављања болести и употребу кортикостероида након њиховог увођења у терапију [94]. Употреба (и претерано коришћење) лекова, нарочито антибиотика и неселективних нестероидних антизапаљењских лекова могу да повећавају ризик за настајање УС [62,85]. Иако употреба аспирина није повезана са настајањем УС, употреба других нестероидних против запаљењских лекова јесте [79,85].

Поред генетских фактора и фактора из окружења, у литератури се помињу и бројни други фактори који потенцијално учествују у настајању ове болести [85]. Дужина и квалитет сна су удружени са настајањем УС, тако што продужено или скраћено спавање повећава ризик [85]. Такође, помињу се да гојазност и коришћење контрацептивних пилула имају значај у настајању CD, иако њихов негативан ефекат за настајање УС није доказан [85].

Иако је познато да микробиом има улогу у настајању, ниједан инфективни микроорганизам није идентификован као узрочник ове болести [65]. Тренутни докази указују да дефекти у урођеном имунском систему омогућавају бактеријама да инвадирају мукозу црева појачавајући одговор ћелија стеченог имунског система и на тај начин оштећујући црева [65]. Епителна баријера служи као функционални еквилибријум између луминалних бактерија и њихових продуката и ресорпције материја и очувању хомеостазе [77]. Стога је очување ове баријере функционалном неопходно за очување нормалне физиологије баријере [77]. Поред ћелија које врше ресорпцију материја постоји група интестиналних епителних ћелија које чувају баријеру и секретују регулаторне молекуле, које оркестрирају одговарајући одговор ћелија урођеног и стеченог имунског система у *lamina propria* [77,95]. Поред њих важну улогу у настајању и одржавању стања имају макрофаге, дендритске ћелије, урођене лимфоидне ћелије и неутрофили, које стварају велике количине прозапаљењских цитокина [96]. Такође, поред ових ћелија постоји и група мирујућих интестиналних мезенхималних ћелија, која у ствари представља главни ћелијски чинилац, како нормалног црева, тако и тумора црева [97]. Ту групу чине различите врсте ћелија које воде порекло од висцералног мезодерма и чија је улога да подржавају цревну структуру и одржавају ткивну хомеостазу [97,98]. Нарочито важну улогу имају у регулисању имунског одговора, учествујући у њему као ћелија која

презентује антиген и у одржавању „нише“ матичних ћелија ткива [97,98]. Поред тога, оне имају способност „едукације“ ћелија имунског система у мукози, какве су дендритске ћелије и мастоцити [98]. Свако нарушавање хомеостатске равнотеже између регулаторних и ефекторских ћелија може узроковати запаљење, као што се дешава у IBD [63,77,95]. Ако се то деси, долази до испољавања цитотоксичних функција против епителних ћелија изазивајући апоптозу и промену протеинског састава међућелијских веза [63]. Такође, промена на неком од гена који је неопходан за функционисање ћелија које учествују у одржавању баријере, може водити у неправилан одговор ћелија имунског система према бактеријама које се нормално и налазе у дигестивном тракту [99]. У основи настајања улцерозног колитиса лежи нарушена равнотежа између свих чинилаца и немогућности одржавања равнотеже, због које долази до неадекватног одговора регулаторних Т лимфоцита и веома бујног одговора атипичних помоћничких Т лимфоцита типа 2 (Th2 лимфоцити) [63,64,77]. Иако је присуство неутрофила главно обележје активне форме УС, који се из циркулације усмеравају у запаљењска подручја, разлике у присуству еозинофила код активне и неактивне форме нема [100]. Макрофаге у овој болести имају важну улогу, што су *Danese* и сар. описали [101]. Класично активирани макрофаги учествују у егзацербацији болести, док алтернативно активирани макрофаги имају значај у резолуцији болести [101]. Они су указали да резолуција болести зависи од успостављања нормалне функције лимфног система и правилне активације макрофага, који ће одржавати нормални проток и помоћи у уклањању инфламаторних ћелија, медијатора и антигена бактерија из места запаљења [101]. Поред макрофага и дендритске ћелије имају значајну улогу, одржавајући цревну баријеру функционалном.

Смртност пацијената са улцерозним колитисом је мања него са Кроновом болешћу. Разлог овоме није познат, али се сматра да је пушење од значаја, јер је број пушача већи код пацијената са CD, а што у том случају представља фактор који дуплира ризик [62]. Међутим, код пацијената са дијагностикованим УС постојање је дуготрајно повезано са повећаним ризиком од настајања компликација, али и неких других екстраинтестиналних поремећајима, као што су промене на очима, кожи, устима, зглобовима, хепатобилијарном систему (примарни склерозирајући холангитис), поремећајима коагулације [63,64,66,102]. Веома често као компликација УС је неопходност хируршких интервенција на дебелом цреву, које се не тако ретко завршавају колостомом, нарочито у првим годинама након дијагностике [103]. Такође, услед повећане активности болести појављују се абнормалности у обнављању ћелија у виду дисплазија и регенеративне хиперплазије епитела дебелог црева са појавом псеудополипа, а код неких пацијената се након 10

година од постављања дијагнозе јавља и колоректални карцином, који представља један од водећих узрока смрти широм света [66,97,103,104]. Код пацијената са хроничним УС и примарним склерозирајућим холангитисом постоји повећани кумулативни ризик за настајање колоректалног карцинома и других компликација у односу на сам УС [102]. Стога је озбиљност овог обољења много већа него код Кроне болести.

### 1.3. Анимални модели запаљења дебелог црева

С обзиром да тачна етиологија IBD, а самим тим и УС није разјашњена, у последњих неколико деценија развијен је велики број анималних модела у циљу њеног истраживања [105–108]. Одговарајући анимални модел треба да показује кључне карактеристике са УС људи, као што су: симптоми и знаци, патофизиологија и ток болести, морфолошке и хистопатолошке промене и запаљење на дебелом цреву треба да буду сличне или идентичне са УС људи [106]. Анимални модели запаљења дебелог црева се развијају и користе више од 6 деценија [109]. Први модели користили су за изазивање ове болести разне лабораторијске животиње које су храњене екстрактима морских трава, док савремени модели укључују употребу генетског инжењеринга превасходно на мишевима и пацовима [109]. Фенотип сличан УС код животиња може се лако изазвати администрацијом хемијских средстава или бактеријском инфекцијом [110]. Иако је већина студија урађена на мишевима, и други нижи организми, као што су зебра рибице, винске мушице или *Caenorhabditis elegans*, до виших организама, какви су пацови и свиње, се могу користити у зависности од питања које студија треба да да одговор [110]. Нижи организми представљају одличан модел за проучавање микробног одговора, као и за разумевање сигналних путева или интестиналне физиологије, који се након открића могу превести и пренети за истраживање на мишевима или другим вишим организмима, као што су свиње које због велике сличности са људима могу дати детаљније и прецизније одговоре [110]. Заједничко свим овим моделима је да су испољавају клиничке и патолошке знаке болести у великој сличности са оним који се јављају код људи, дајући велике могућности проучавања не само патогенетских фактора, већ и неких специфичних ефеката (метаболизам протеина, системске компликације), као и ефеката потенцијалних терапија [105].

Поред модела који подразумевају употребу животиња, за испитивање IBD се могу користити један или више различитих типова ћелија и ћелијских култура [109]. Ови *in vitro* модели су релативно економични и лаки за коришћење, нарочито при испитивању



фармакокинетики, токсичности и ефикасности нових лекова [109]. У ову сврху користе се ћелије добијене приликом ендоскопских прегледа, што представља идеалну комбинацију ћелија које се већ налазе *in vivo* у цревима, ћелијске линије, углавном добијене из карцинома, као и комерцијално доступне ћелије [109].

На основу начина изазивања патолошких промена сви анимални модели се могу поделити на: 1) моделе изазване излагањем егзогеним средствима (хемијска средства, бактерије), 2) моделе изазване адоптивним трансфером одређеног типа ћелија имунског система, 3) моделе настале применом генетског инжењеринга и 4) код којих спонтано долази до појаве колитиса [99,106,108,111]. Иако ови модели не репрезентују сложеност болести која се јавља код људи, ипак представљају вредан и незамењив алат за различита истраживања [108,111]. У хемијски изазване моделе сврставају се модели који користе хемијска средства, као што су караген, сирћетна киселина, јодоацетамид, натријум хидроксид, индометацин, оксазолон, динитробензенсулфонска киселина, 2,4,6-тринитробензенсулфонска киселина (енгл. *2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid-TNBS*) и декстран натријум сулфат (енгл. *Dextran Sodium Sulfate-DSS*) [105,107]. Због својих предности, представљају групу најчешће коришћених модела јер се одликују високом репродукцибилношћу и лакоћом изазивања, као и контролом почетка, трајања и озбиљности запаљења [107,108]. Заједничко за ове моделе је да без присуства непатогених бактерија у цревима, нема развијања болести, што показује и чињеница да се апликацијом антибиотика болест може модулирати [109]. Од бактерија за изазивање колитиса могу се користити Грам негативне бактерије из рода *Salmonella* (*S. typhimurium*, *S. dublin*) и адхерентне инвазивни сојеви *Escherichia coli*, чији ефекти се могу очекивати након претретмана мишева антибиотцима [110]. Применом техника генетског инжењеринга могу се добити животиње са недостатком или прекомерном експресијом, па чак и експресијом гена којег та врста иначе нема (трансгеном) [99,105]. Карактеристично за ове мишеве је да они спонтано развијају колитис, без потребе за додатним изазивачем. Од свих набројаних модела најчешће и ширококоришћени су модели изазваних применом TNBS-а (за Кронову болест) и DSS-а (за улцерозни колитис) на мишевима [107,108,111]. Иако се најчешће користе за изазивање колитиса на мишевима, поред њих се могу успешно подесити и изазвати на другим животињама, као што су пацови [112].

Значај ових модела је да се поред нових знања и увида у патофизиологију улцерозног колитиса, обезбеди дуготрајна ефикасна и безбедна потенцијална терапија за људе [107,109,110,113]. Главни циљ терапије UC-а је увођење, а након успешног увођења пацијента у стање ремисије, њено дуготрајно одржавање, без употребе стероида и

минимизирања хируршких интервенција [64,65,70]. Досадашња терапија има ефикасност код мање од половине пацијената и то са средњим до озбиљним симптомима, док код већине или не долази до одговора или са временом изостаје одговор [76,110,114]. Конвенционална терапија УС-а подразумева коришћење антиинфламаторних лекова, кортикостероида, имуносупресива, биолошких агената и антибиотика, а често и комбинације ових лекова [70,115], који имају доста нежељених ефеката, па због тога нису прихватљива за дуготрајно лечење [116]. Који ће се лекови користити, треба да прати правилан избор након систематског приступа процене симптома и знакова болести [117]. Због потенцијално мале токсичности, прихватљиви кандидати за терапију су дијететски додаци, компоненте хране и деривати биљака [116,118]. Новији лекови подразумевају биолошке агенте који циљају и блокирају инфлукс и функционисање леукоцита из периферне циркулације, инхибирају TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1, компоненти које изграђују мукозну баријеру, одржавају епителне ћелије, трансплантацијом фекалних бактерија од здравих донора, инфестацијом хелминтима [65,76,118,119]. Потенцијални биолошки агенти су и антитела за IL-12, IL-23, IFN $\gamma$ , апликација рекомбинантног IL-10, блокатори активације Т лимфоцита, правилни стимулатори ћелија урођеног имунског система, као и фактори раста и мали молекули који циљају специфичне сигналне путеве укључених у функционисање ћелија имунског система [65]. Иако потенцијално представљају веома корисна средства у терапији, употребу ових агената прате бројна ограничења и проблеми, од кумулативне токсичности и реактивације опортунистичких инфекција и омогућавања малигнитета до развоја антитела на биолошке агенте [65]. Као алтернатива досадашњем лечењу представља и терапија заснована на употреби матичних ћелија [110,120].

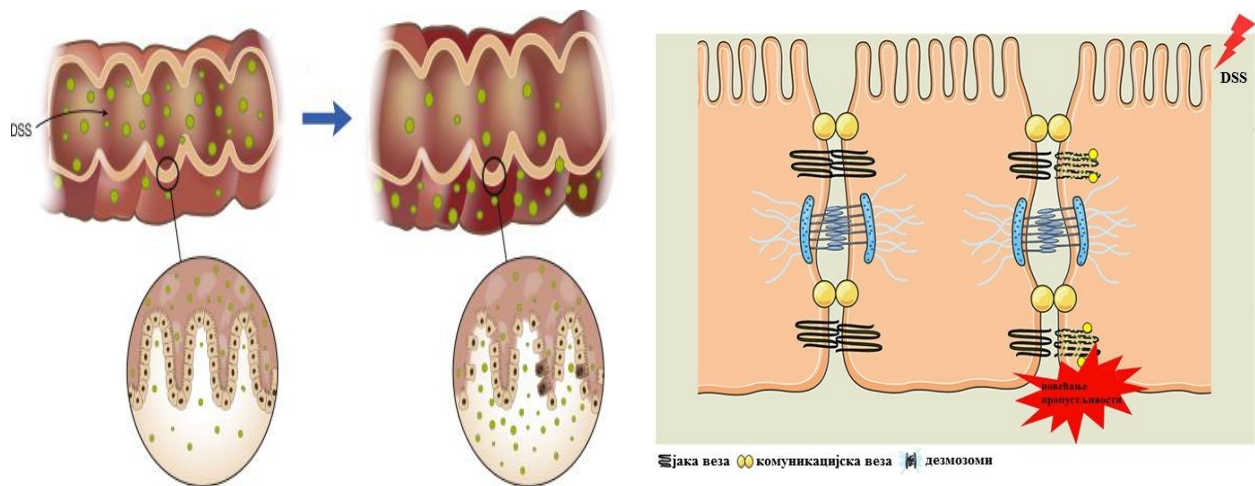
#### **1.4. Анимални модел запаљења дебелог црева изазваног декстран натријум сулфатом**

Првобитно описан пре више од 3 деценија када је *Ohkusa* публиковао рад у коме је показао могућност и ефекте изазивања експерименталног УС на хрчцима коришћењем DSS-а [121], да би касније је у тиму са *Okayasu* и сар.[122], метод био адаптиран за мишеве. Данас представља најчешће коришћен модел за испитивање колитиса, јер показује високу сличност са хуманом етиологијом, патологијом, патогенезом и терапеутским одговором [105,111,123]. Карактерише се једноставношћу и јефтиним изазивањем, високом репродуцибилношћу, као и могућности да се у зависности од концентрације, дужине и учесталости апликације добију различита жељена стања за испитивање (запаљење, фаза репарације или карциногенеза удружена са колитисом)

[108,110,123]. Такође, постоји могућност адаптирања на различитим лабораторијским животињама, због чега је и најчешће коришћени модел за испитивање улцерозног колитиса [108,110,123].

DSS је синтетски комплексни полианјонски сулфатирани хепарину сличан полисахарид састављен од декстрана и сулфатских анхидроглукозних јединица [105,123,124]. Добија се естерификацијом хлоросулфонске киселине и декстрана, кога из сукрозе синтетишу неколико врста бактерија [123]. Тако добијени дериват представља бели прах, високо растворљив у води, молекулске масе од 5 до 1.400kDa и који садржи око 17% сумпора (две сулфатне групе по резидуи глукозе) [123]. За изазивање модела користи се раствор DSS у води који се животињама даје *ad libitum* [108,123]. Његова ефикасност за изазивање промена зависи од неколико фактора који подразумевају процентуалну заступљеност (1-5%), дужину и учесталост апликације (акутна, фаза репарације, хронична), сој и пол животиња (мушкарци су осетљивији), окружења, одн. присуства бактерија у цревима [104,105,110]. У акутној фази, која се добија континуираном апликацијом релативно високих концентрација DSS у кратком периоду, мишеви клинички испољавају губитак телесне масе, појаву дијареје и окултног крварења, појаву анемије, пилоерекције, скраћења црева, појаве улцера и инфилтрације неутрофила у епителу и евентуално смрт, док у хроничној фази, углавном не испољавају озбиљно запаљење и хистопатолшке промене на дебелом цреву [105,106,108,123]. Предност овог модела је и то што се поред ових фаза може користити и за истраживања карцинома дебелог црева [125], нарочито ако се поред DSS-а апликује и неки познати карциноген [123]. Акутни колитис се сматра да је посредован ћелијама урођеног имунитета, што се може потврдити чињеницом да се може изазвати и на мишевима са озбиљном комбинованом имунодефицијенцијом (енгл. *severe combined immunodeficiency-SCID*), док је хронични колитис посредован лимфоцитима активираним цитокинима које су секретовале макрофаге [106]. Најчешћи приступ је изазивање акутног колитиса мишевима коришћењем 2-5% (m/w) раствора DSS-а у трајању од 4-9 дана [108,126]. Такав раствор пролази целим дигестивним трактом без деградације, па након ресорпције воде у дебелом цреву остаје виша концентрација него што га је било у раствору [126]. Иако је BALB/c често коришћени сој у истраживањима, овај сој мишева је мање пријемчив за DSS у односу на C57BL/6 [127], који се након уклањања DSS-а скоро у потпуности опоравља од колитиса, док C57BL/6 наставља прогресивно да развија симптоме ка хроничном облику [108].

Начин деловања DSS-а на епител црева и изазивање запаљења до краја није разјашњен, иако постоје неколико хипотеза [108,123]. DSS сам по себи директно не изазива запаљење црева, већ оштећује ћелије епитела, *lamina propria* и субмукозе и излаже их антигенима и бактеријама из лумена црева, што изазива запаљење [110]. DSS смањује концентрацију нуклеозида у ћелијама и нарушава метаболизам фосфолипида, што смањује концентрацију фосфохолина и глицерофосфохолина, главних компоненти ћелијских мембрана [107]. Досадашња истраживања су показала да DSS смањује дебљину мукозне мембране, мењајући биофизичку структуру и повећавајући пропустљивост површине црева, али да не утиче на стварање новог мукуса [126]. Ово почиње да се дешава већ током првих 15 минута након излагања епитела DSS-у, након чега он бива пропустљив за честице величине 2  $\mu\text{m}$ , која је величина бактерија [126]. Након 4h поједине бактерије су способне да пенетрирају унутрашњи мукозни слој, док након 12h излагања DSS-ом мукозни слој више није слободан од бактерија, праћен видљивом пенетрацијом бактерија и не показује добру слојевиту организованост, карактеристичну за мукус.[126] Након 24h унутрашњи мукозни слој је скоро нестао, док се након 120h не примећује [126]. Један од могућих механизма ефекта DSS-а на црева је и директна промена на пропустљивости црева [123]. Присуство DSS-а у епителу прати пропадање мукозног слоја и његово продирање, па се након 12h може запазити количина која је стигла до епителних ћелија [126]. Већ од првог дана, DSS редукује протеине који учествују у јаким међућелијским везама (*zona occludens-1*) [123]. Таквим деловањем омогућава бактеријама да пенетрирају у ткиво пре него што било који знаци запаљења буду примећени [123,126,128]. Међутим, како DSS пролази кроз ћелије епитела (трансцелуларно или парацелуларно) још увек је нејасно [108]. *Laroui* и сар. су предложили модел по коме се DSS електростатички повезује са масним киселинама из хране посредством дикатјонима или позитивно наелектрисаним молекулима у везикуле које се хидрофобним доменом спајају са ћелијском мембраном и последично уноси у ћелије [129]. Једном кад уђе у цитоплазму DSS активира проинфламацијску каскаду, али и ремети биолошке механизме транскрипције и инхибира активност рибонуклеаза, што је одавно описано [129]. *Araki* и сар. су показали да DSS веома снажно и брзо инхибира интрацелуларни метаболизам енергије епителних ћелија са смањењем учесталости митозе, застојем у  $G_0$  и повећањем апоптозе и апоптотских тела на врховима ресица [124].



**Фигура 1. Ефекат DSS-а на епител дебелог црева.**

Након апликације, DSS оштећује ћелије епитела дебелог црева (лево, адаптирано према *Kiesler* и сар. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcmgh.2015.01.006>) и раскида јаке везе између њих (десно, адаптирано према *Chelakkot* и сар. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01797-y>) повећавајући пропустљивост и омогућавајући лакшу пенетрацију бактерија, а самим тим резултујући запаљење.

Сва ова патолошка својства се заснивају на високој сулфатираности DSS-а због чега је високо растворљив у мукусу [126]. Због тога молекулска маса DSS-а који се користи за изазивање модела има велики значај, јер утиче на његову способност да пенетрира мукус [126]. У сврху изазивања најчешће се користи DSS молекулске масе око 40kDa, због могућности брзог пенетрирања [108]. Нискомолекуларни DSS ( $M_r=5kDa$ ) ће изазвати мања оштећења, док високомолекуларни ( $M_r=500kDa$ ) неће изазвати никакво запаљење, јер неће ни дифундовати у мукусни слој [108,126,130]. *Kitajima* и сар. су поредбено анализирали хистопатолошке ефекте DSS-а разних молекулских тежина на колоне и потврдили да је оштећење колоне при примени DSS чија је молекулска тежина 40kDa статистички значајније у односу на примену 5kDa [130].

Поред ефекта DSS-а на мукусну баријеру и епител црева, за изазивање овог модела неопходно је присуство бактерија, јер се болест не јавља или се јавља у веома благом облику када се животиње држе у стерилним условима, када немају бактерије у цревима (енгл. *germ-free mice*) [105,108,109], што је довело до теорије „нема бактерија, нема IBD“. Такви мишеви развијају знаке слабог запаљења, а одсутне су и хистопатолошке промене у цревима [108]. Међутим, применом нижих концентрација и у таквим условима се колитис може изазвати [108]. Због веома танке или одсуства било какве мукусне мембране DSS ће пре појаве знака запаљења изазвати акутна и масивна крварења, али и промене какве се јављају у хроничном облику за само неколико дана [108,126]. Могући разлог овоме је токсични ефекат DSS-а који функционише као хелатор калцијумских јона и који у таквим

условима [126]. Ово показује да се промене услед деловања DSS-а јављају и без утицаја цревне микрофлоре, али да она ипак има модификујућу улогу у пријемчивости и одговору [108].

Хистопатолошке промене на цревима у овом моделу су углавном ограничене на ткиво колона и показује промене какве се јављају код пацијената са UC [108,123]. Колитис изазван DSS-ом почиње од ректума и последично се шири кранијално [124]. Макроскопски се уочава скраћење и оток колона са хеморагичним и улцерозним површинама [123]. Микроскопски се у акутном колитису осим деплације мукуса и дегенерације са отоком епитела запажају и некозе које воде у нестајање епителних ћелија (пехарастих ћелија) које касније воде у формирању криптитиса и криптних апсцеса, као последицу миграција неутрофила, макрофага, плазма ћелија и неколико лимфоцита што је заједничка карактеристика за UC људи [105,108,123].

Акутни колитис представља веома значајан модел за истраживања догађаја који прате оштећења хомеостазе мукозе након деструкције епитела и губитка интегритета баријере, као и механизма који учествују у поправљању ткива након оштећења [113]. У акутном моделу колитиса изазваног DSS-ом мишевима главну улогу имају ћелије урођеног имунског система, какве су макрофаге, дендритске ћелије и неутрофили, док се за лимфоците сматра да не учествују у патогенези, нарочито због чињенице да се колитис може изазвати и на SCID мишевима [108].

Неутрофили су прве ћелије које у значајној мери учествују у патогенези модела, након чега патогену улогу преузимају МФ и DC и под чијим контролама су промена функција и инфилтрација [131]. Неутрофили производе велике количине реактивних кисеоничних група и антибактеријских молекула који уништавају патогене, али оштећују и ткиво [131].

Макрофаге представљају главне учеснике урођеног имунског одговора на инфективне агенсе, започињањем урођеног и усмеравањем стеченог имунског одговора, док њихова дисфункција води у неправилном одговору [132]. У зависности од микроорганизма и медијатора запаљења домаћина, поред антибактеријске улоге важну улогу имају и у одржавању хомеостазе баријере, смањењем запаљења алтернативном активацијом и регулисањем неадекватног имунског одговора на бактерије [133]. Симовић Марковић и сар. су показали да у овом моделу макрофаге имају значајну патогену улогу у почетној фази колитиса секрецијом IL-1 $\beta$ , али и да се њихова улога може модификовати [48,134]. Познато је и да недостатак M2 макрофага води у појачавање болести, због

неконтролисане активности неутрофила, али и да спречава развијање хронично колитиса [133].

У зависности од времена њихове активације, дендритске ћелије имају двоструку улогу [135–138]. Мукоза црева садржи бројне дендритске ћелије, чија локализација у *lamina propria* и организованим лимфним органима црева, омогућава да служе као круцијални регулатори имунског одговора, а у зависности од антигена штите организам од инфективних агената или изазивају толеранцију [138,139]. Поред тога, оне имају значајну улогу у активацији и поларизацији Т лимфоцита и комуникацији са цревним епителним ћелијама, са којима образује баријеру и утичу на очување хомеостазе и исход болести [138,139]. Неколико студија је објаснило значај и улогу DC у цревима у експериментално изазваном колитису [135–139]. Њихова деплеција пре почетка изазивања модела води у појачаном одговору имунских ћелија и последично томе јачем запаљењу и симптомима болести, док њихова деплеција у току модела смањује болест [135–139]. Такође, додавање нових DC у виду пасивног трансфера значајно погоршава болест [137,139]. Ову улогу оне остварују регулисањем привлачења неутрофила и моноцита и њихове активности у колону и указује да имају протективну улогу у почетној фази болести, али да касније добијају патогену улогу [138]. Ову каснију улогу DC, *Rescigno* и *Di Sabatino* су објаснили доласком неправилно активираних резидентних DC и регрутовањем нових које нису биле изложене локалном толерогеном окружењу и нарушеном њиховом односу [138]. Стога DC представљају одлично средство и мету за циљану терапију UC [139].

Као што је напоменуто, НК ћелије имају важну улогу у системском имунском надзору у циљу заштите организма од заражених или туморских ћелија [133]. У епителу црева заједно са другим интраепителним ћелијама учествује у очувању хомеостазе, тако да свако нарушавање броја и односа између субпопулација НК ћелија резултује појачавањем имунског одговора и запаљења [133,140]. У моделу колитиса изазваног DSS-ом НК ћелије имају протективну улогу [140], а њихова деплеција резултује драстичним оштећењем ткива колона, узрокована инфилтрацијом неутрофила и повећаном секрецијом проинфламацијских цитокина и смањеним преживљавањем [140,141]. Група Т лимфоцита која испољава инхибиторне рецепторе НК ћелија (NKT ћелије) укључена је у регулацији имунског одговора смањеном регулацијом ефекторских функција Т лимфоцита (цитолитичке активности) и ослобађања цитокина [142]. Њихова активација зависи од DC, макрофага или епителних ћелија [143]. Током активне фазе колитиса изазваног DSS-ом број NKT ћелија расте, да би се са смањењем активности болести број смањио на

вредности пре почетка [142]. Такође, оне су важне у ограничавању регрутације и улоге неутрофила [142,143]. Иако се сматра да имају протективну улогу јер се њиховим регрутовањем спречава масиван имунски одговор и оштећења црева [142,144], ту улогу су показале само инваријантне или тип I NKT (iNKT) ћелије, док колонски тип II NKT ћелија имају патогену улогу [143,144]. Међутим, поред њихове појединачне улоге у колитису важан је и њихов однос, јер је показано да тип II NKT ћелија има могућност регулисања функција типа I NKT ћелија [145]. Код људи са активном формом колитиса, број тип I NKT ћелија у мукози је смањен, а њихов однос нарушен у корист тип II NKT ћелија и као одговор на приказане антигене веома брзо секретују велике количине IL-13, који изазива оштећења ћелија епитела, што указује на ограничену протективну улогу [133,142,145].

### **1.5. Апликација MSC у мишијем моделу запаљења дебелог црева изазваног DSS-ом**

DSS се користи за изазивање колитиса са улцерацијама који личи на UC људи, коришћењем мишева, пацова, гвинејског прасета и то коришћењем различитих концентрација [104,146], најчешће се за испитивање акутне форме UC користи следећи модел/протокол: 3% раствор DSS у води за пиће апликован C56BL/6 мишевима у трајању од 7 дана. Овај протокол доводи до запаљење дебелог црева чије су хистолошке промене у великој сличности са променама код људи [105,106,108,123]. Такође, клиничке манифестације које прате овај модел су у великој мери сличне са оним код људима и карактеришу се прогресивним губитком телесне масе, појавом неформираних фецеса са појавом крварења [105,106,108,123].

Резултати претходно публикованих студија показале су терапијску ефикасност апликација MSC у колитису мишева изазваног DSS-ом [48,120,147–154], оне још увек нису откриле прецизне податке о неопходној количини и дужини апликација. Студије су показале ефикасност нетретираних [150,153,154], као и непосредно пре апликације MSC кондиционираних са IFN $\gamma$  [147,148], IL-1 $\beta$  [149] или фармаколошком инхибицијом Галектина 3 [48], које регрутовањем макрофага и њиховом поларизацијом ка M2 фенотипу умањују симптоме болести. Група аутора је показала да је тај ефекат посредован MSC индукцијом секреције TGF $\beta$  у поларизованим макрофагама [151,152]. Wang и сар.[154] су поредбено анализирали терапеутске ефекте различитих рута апликација и показали да је интраперитонеална апликација супериорнија у односу на интравенску и интрааналну, док су Sala и сар.[153] показали да тако апликоване MSC редукују знаке колитиса независно од своје локализације у цревима. Процена позитивног терапеутског ефекта апликованих



MSC у овом моделу, у претходно публикованим студијама извршена је на основу одређивања разлика у смањењу продукције, експресије и присуству појединих гена проинфламацијских цитокина, као и имунофенотипском одређивању присуства ћелија од интереса (макрофага и Т лимфоцита) у *lamina propria*. Широка анализа присуства већег броја фенотипа ћелија у *lamina propria* до сада није спроведена.

Претходно публиковане студије [48,151,152] су показале да MSC свој терапеутски ефекат остварују деловањем на макрофаге, али ниједна није показала њихов утицај на дендритске ћелије у овом моделу. С обзиром да је позната улога DC у овом моделу и на чињеницу да имају важну улогу у регулацији имунског одговора, као и да нису познати ефекти MSC на DC у овом моделу, након деплеције макрофага у овом раду спроведена су истраживања у циљу испитивања специфичних ефеката. Извршен је трансфер *in vivo* стимулираних дендритских ћелија, као и *in vitro* испитивање интеракције MSC и DC.

## 2. ЦИЉ РАДА

Циљ ове студије је био да се испита да ли примена MSC у мишјем моделу акутног запаљења дебелог црева изазваног DSS-ом мења фенотип и функције ћелија имунског система које инфилтрирају и оштећују ткиво дебелог црева.

Испитивање имуномодулаторног потенцијала MSC спроведено је:

1. одређивањем клиничког скорa,
2. одређивањем патохистолошког скорa,
3. одређивањем фенотипа ћелија имунског система,
4. одређивањем концентрације цитокина,
5. деплецијом макрофага,
6. пасивним трансфером *in vivo* стимулираних дендритских ћелија и *ex vivo* култивацијом дендритских и MSC и упоређивањем насталих разлика између експерименталних и контролних група.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. Лабораторијске животиње

У експериментима коришћени су мишеви дивљег соја (енгл. *wild type*-WT) C57BL/6, који су рођени и одгајани у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Коришћени мишеви били су мушког пола, сличне старости (6-8 недеља) и приближне телесне тежине (19-21g).

Након експеримента мишеви су жртвовани на хумани начин. Све експерименталне процедуре над мишевима одбрила је Етичка комисија за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (број 01-1277 од 12.02.2016. године).

#### 3.2. Изазивање акутног запаљења дебелог црева декстран натријум сулфатом

Због великих сличности са улцерозним колитисом код људи, акутно запаљење дебелог црева мишева изазвано је коришћењем 3% раствора прашка DSS ( $M_r \approx 40kDa$ ; TdB Consultancy, Uppsala Sweden, DB001-500g) у води за пиће који је апликован мишевима у трајању од 7 дана. Непосредно пре почетка експеримента животиње су случајним узорком сврставане по групама. У току трајања експеримента, све јединке су имале приступ води *ad libitum*, с тим што експерименталне животиње нису имале приступ чистој води, док су јединке из контролних група добијале чисту воду. Јединке из свих група, током трајања експеримента храњене су *ad libitum* стандарном комерцијалном храном за мишеве, коју су добијале и пре укључивања у експеримент.

#### 3.3. Процена развоја симптома болести и одређивање клиничког скорa

Као поредбена варијабла за процену развоја симптома и одређивање тежине болести коришћен је клинички скор. Процена развоја симптома обухватала је свакодневно мерење телесне масе, праћење конзистенције столице и појаве крварења кроз анус. Појава сваког понаособ параметара бодована је према табеларним вредностима (Табела 2), према претходно публикованим радовима [48,134]. Након 7 дана, сабирањем бодова сваког од параметра на дан жртвовања добијен је клинички скор.

Табела 2. Табеларни приказ вредности параметара за одређивање клиничког скорa

Бод	Губитак телесне масе	Конзистенција столице	Присуство крварења
0	Нема губитка	Нормана конзистенција	Нема крварења
1	1-5%	Житка конзистенција, благо слузава	Веома слабо видљиво крварење
2	6-10%	Ретка, присуство слузи	Слабо крварење
3	11-15%	Веома ретка, слузава	Видљиво крварење
4	>15%	Дијареја	Огромно крварење

Највећа могућа вредност клиничког скорa је 12, што би значило да је таква јединка изгубила више од 15% од своје тежине на почетку експеримента, да има присутну дијареју и огромно крварење кроз чмар. Са друге стране, најмања вредност скорa је 0, која подразумева да јединка није значајно губила на тежини и није развила симптоме болести.

### 3.4. Патохистолошка анализа оштећења дебелог црева

Након жртвовања животиња, издвојено дебело црево је полагано на бели чисти папир због мерења његове дужине. Дужина црева служи као поредбена варијабла која је у директној вези са тежином болести, при чему постоји однос између степена јаче развијен болести и мање дужине дебелог црева. Измерена дебела црева су опрана под млазом раствора фосфатног пуфера (енгл. *phosphate buffer saline-PBS*), исечена по дужини и уролована по методи "*Swiss rolls*". Тако уролована црева су, због фиксације, урањана у епруветама са раствором формалдехида у трајању од најмање 24 часа и чувана на собној температури. Фиксирани узорци су по стандардној хистопатолошкој процедури обрађени и калупљени у парафинске калупе, од којих су прављени пресеци дебљине 4  $\mu\text{m}$ . Добијени исечци су за потребе бојења депарафинисани и то загревањем на температури од 56°C и потапањем у растворе ксилола и алкохола, након чега су бојени раствором хематоксилина, а потом раствором еозина (*Haematoxyllin&Eosin-H&E* техника). Узорци су даље дехидратисани и просветљавани, прекривени *Canada* балзамом и покровном лъуспицом и остављени на сушење. Осушени микроскопски препарати су посматрани под микроскопом (*Olympus, Japan*) како би се одредило хистопатолошко оштећење ткива. Посматрањем је одређивано оштећење структуре епитела, као и инфилтрација ћелија имунског система. Свака од тих промена је бодована на основу претходно публикованим студијама [48,134], према вредностима приказаним у Табели 3, а сакупљањем бодова добијен је патохистолошки скор.

Табела 3. Табеларни приказ вредности параметара за одређивање хистолошког скорa

Бод	Структура епитела	Инфилтрација ћелија имунског система
0	Нормална структура	Нема инфилтрације
1	Мање изражени губици епителних ћелија	Слабо изражени инфилтрат
2	Већи губици епителних ћелија	Изражени инфилтрат
3	Губитак крипти	Инфилтрат захвата <i>lamina muscularis mucosae</i>
4	Већи губици крипти	Инфилтрат захвата <i>laminae submucosae</i>

Максималан скор 8 значи да је дошло до екстензивних промена и у структури епитела са појавом деплеције епитела и инфилтрације ћелија имунског система, док скор 0 показује одсуство било каквих промена.

### 3.5. Апликација мезенхималних матичних ћелија

У раду су коришћене комерцијалне сингене мезенхималне матичне ћелије из коштане сржи мишева (Gibco, (сада *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA) кат.бр. S10502-01). Ћелије су култивисане у инкубаторима са контролисаном влагом у атмосфери на температури од 37°C и додатком 5% CO<sub>2</sub> у пластичним фласковима у комплетном медијуму који садржи Дулбекову модификацију (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle Medium-DMEM*), 10% топлотом инактивисани FBS, 2 mmol/L L-глутамина, 100 IU/mL пеницилина и 100 µg/mL стрептомицина.

MSC су интраперитонеално апликоване у количини од 2,0x10<sup>6</sup> подељене у 3 дневне доза растворене у 0,3ml PBS-а, свакодневно током трајања експеримента. Прва доза ћелија мишевима је апликована 12 сати након почетка експеримента. Непосредно пре сваке апликације, ћелије су коришћењем 0,25% раствора трипсина у PBS-у са додатком EDTA одвајане из флашкове, а затим је дејство трипсина неутралисано додавањем комплетног медијума. Такав раствор одвојених ћелија је центрифугиран на 300g у трајању од 5 минута, а добијени седимент растворен DMEM-ом и из кога је узето 10 µL ћелија за бројање и одређивање вијабилности коришћењем трипан плавог. Потребан број ћелија је растваран у довољну количину PBS-а и као свеж раствор бризгалицама и иглама за инсулин апликован мишевима.

### 3.6. Анализа продукције цитокина и фактора

Након жртвовања животиња, отворен је абдомен и крв је бризгалицама и иглама узета из абдоминалне аорте за анализу продукције системских цитокина и фактора. Након узимања крв је пребачена у епруветице, остављена 0,5-1 сат на собну температуру, а након тога центрифугирана на 14000 rpm у трајању од 10 минута на температури +4°C. Након центрифугирања, издвојен је серум који је замрзнут на температури -20°C до анализирања.

За анализу продукције цитокина и фактора коришћени су комерцијални комплети за анализу ELISA (енгл. *Enzyme linked immunosorbent Assay*-ELISA) методом према упутству произвођача. Коришћене су микротитар плоче са 96 отвора (бунарчића) у којима је сипано по 100 µL раствора везујућих антитела, које су након тога затваране фолијом и остављене на инкубирање током ноћи на собној температури. Сутрадан су бунарчићи испрани пуфером за испирање, након чега је у свим бунарчићима додат блокирајући пуфер, у којима је он остављен у трајању од 1 сата. Након тога су плоче поново испране пуфером за испирање, а у бунарчиће су сипани раствори стандарда и испитивајући материјал, поклопљени фолијама и инкубирани у трајању од два сата. У првом реду сваке плоче направљена су седам серијски двоструких разблажења почетног раствора стандарда. Те осам опадајуће концентрације стандарда служиле су за формирање стандардне криве и образовање једначине помоћу које је израчунавана продукција анализираних цитокина и фактора. Након инкубације бунарчићи су испрани и додато је по 100 µL раствора антитела за детекцију. Плоче су поново поклопљене фолијом и остављене на инкубацију у трајању од 2 сата на собној температури. Након инкубације, плоче су испране и у бунарчићима је додато по 100 µL раствора *Streptavidin horseradish peroxidase* (*Streptavidin*-HRP). Плоче су инкубиране на тамном месту на собној температури у трајању од 20 минута, након чега су оне испране и у бунарчићима је сипано по 100 µL раствора супстрата и поново инкубиране на тамном месту у трајању од 20 минута. Након инкубације у бунарчиће је додато по 50 µL раствора за прекидање реакције, а плоче краткотрајно постављене на апарат за лагано мешање након чега је мерена оптичка густина узорака на апарату *MicroplateReader* (*Zenyth*, *Anthos*, Велика Британија). Коришћењем једначине из стандардне криве и измерених вредности анализираних узорака одређене су вредности продукције цитокина и фактора.

За анализу серумске продукције IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-10 и PGE2 коришћени су комерцијални комплети R&D (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN) док је за анализу продукције IDO коришћен комплет произвођача Neobiolab (Neobiolab, Cambridge, MA).

### 3.7. Изолација ћелија из *laminae propriae* дебелог црева

Изолација ћелија имунског система вршена је према претходно публикованим протоколима[48,134] из *lamina propria* издвојених колона непосредно после жртвовања и мерења. Издвојена црева су након прања пресечена по дужини, а затим маказама додатно уситњена попречним пресецањем на мање парчиће и испрана Хенковим избалансираним раствором соли (енгл. *Hank's balanced salt solution*-HBSS) без магнезијума и калцијума. Испрани парчићи ткива су затим стављени у епрувете са раствором за дигестију (20 mL HBSS, 10% FBS, 15 mL HEPES, 5 mM EDTA) у воденом купатилу на 37°C уз повремено протресање у трајању од 30 минута. Овим поступком одвајају се епителне ћелије од осталог ткива у коме се налазе жељене ћелије. Након дигестије, парчићи су испрани HBSS-ом, маказицама уситњени на што мање парчиће и третирани додавањем колагеназе D и DNase и то 60 минута у воденом купатилу на 37°C уз повремено протресање. Након тога, дигестирани парчићи су у циљу бољег пасирања, уз помоћ клипа бризгалке, притискивани и пропуштани кроз сита ситних пора (ћелијска сита) промера 100  $\mu$ m, а затим 40  $\mu$ m, да би добијени садржај био центрифугиран на 450g у трајању од 10 минута. Добијени талог је након центрифугирања ресуспендован 30% *Percoll*-ом, у којем је затим низ зидове епрувете додаван 70% *Percoll* и центрифугиран на 1100g у трајању од 20 минута. Жељене ћелије су се након центрифугирања издвајале у виду прстенастог слоја на средини епрувете, који је пажљиво извучен пипетом, пребачен у нову епрувету, а затим ресуспендован у комплетном медијуму.

### 3.8. Анализа ћелија проточном цитометријом

Анализа изолованих ћелија из *lamina propria* извршена је проточном цитометријом коришћењем моноклонских антитела за мишје ћелије. Коришћена су моноклонска антитела за површинске белеге макрофага, дендритске ћелија, NK и NKT ћелија, неутрофила, еозинофила, мастоцита и В лимфоцита, као и унутарћелијских продуката тих ћелија (Табела 5).

Потребна количина изолованих ћелија је била ресуспендована у пуферу за бојење, а затим и одговарајућа количина примарно конјугованих моноклонских антитела

специфичног за маркер жељене популације ћелија. Упоредо са њима, једна количина ћелија је инкубирана са изотипским контролама за жељена антитела. Листа коришћених антитела за изотипске контроле приказана је у Табели 4.

Табела 4. Листа коришћених изотипских контрола

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

Ћелије су са антителима инкубиране 30 минута у фрижидеру на температури +4°C, након чега су пране додавањем 2 ml хладног пуфера за бојење и центрифугиране на 250g у трајању од 5 минута. Након центрифугирања одливен је супернатант, а добијени седимент ресуспендован у 250 μL пуфера за бојење, након чега је анализирана експресија површинских белега коришћењем проточног цитометруа BD FACSCalibur (BD Biosciences).

За анализу продукције цитокина одређених популација, ћелије су подвргнуте интрацелуларном бојењу. Процедура бојења је извршена према упутству произвођача антитела BD Cytofix/Cytoperm™ (BD Cytofix/Cytoperm™, BD Biosciences) [155]. Пре самог поступка бојења, ћелије су стимулисане РМА (*Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*, Sigma), јономицином и BD GolgyStop/GolgyPlug, у трајању од 4 часова, чија је улога у појачавању експресију цитокина претходно *in vivo* стимулисаних ћелија. Након инкубације и површинског бојења ћелије су опране са 2 mL пуфера за бојење и центрифугиране на 250g у трајању од 5 минута. Добијени ћелијски седимент је ресуспендован у 250 μL раствора BD Cytofix/Cytoperm™ и инкубиран на +4°C у трајању од 20 минута. Након инкубације ћелије су опране са 1 mL Perm/Wash™ пуфера и центрифугиране на 250g у трајању од 5 минута. Након центрифугирања супернатант је одливен, а додат је раствор антитела за интрацелуларно бојење који је инкубиран у



фрижидеру на +4°C у трајању од 30 минута. Инкубирани ћелије су опране са 2 mL пуфера за бојење, затим центрифугиране на 250g у трајању од 5 минута, а након тога добијени седимент је ресуспендован у 250 µL раствора за бојење и анализирани на проточном цитометру на истом начину као и само површински обојене ћелије. Листа коришћених антитела приказана је у табели 5.

Табела 5. Листа коришћених моноклонских антитела

Антитело	Обележивач	Клон	Изотип	Произвођач	CAT или REF
F4/80	FITC	BM8	Rat IgG2a	Invitrogen	MF48020
CD11b	PerCp	M1/70	Rat IgG2b	Molecular probes	A14787
I-A	PE	AF6-120.1	IgG2a, κ	BD Pharmingen	553552
CD206	APC		Goat IgG	RnDSystems	FAB2535A
CD80	PE	16-10A1	Armenian Hamster IgG2, κ	BD Pharmingen	553769
CD11c	PE	N418	Hamster IgG	Molecular probes	MCD11c04
CD11c	PerCp	N418	Armenian Hamster IgG	Molecular probes	A14788
CD8a	APC	53-6.7	Rat (LOU) IgG2a, κ	BD Pharmingen	553035
CD19	PE	1D3	IgG2a, κ	BD Pharmingen	553786
CD5	PE	53-7.3	Rat (LOU) IgG2a, κ	BD Pharmingen	553023
CD3	PerCp	145-2C11	Armenian Hamster IgG1 κ	BD Pharmingen	553067
NK1.1.	FITC	PK136	Mouse IgG2a, κ	eBioscience	11-5941-81
FcεRI	PerCp	MAR-1	Armenian Hamster IgG	BioLegend	134319
SiglecF	PE	E50-2440	Rat (LOU) IgG2a, κ	BD Pharmingen	552126
CD45	APC	30-F11	Rat (LOU) IgG2b, κ	BD Pharmingen	559864
Ly6G	PerCp	RB6-8C5	Rat IgG2a, κ	eBioscience	45-5931-80
CD117	FITC	2B8	Rat IgG2b, κ	BioLegend	105806
IL-4	PE	BVD4-1D11	Rat IgG2b	BD Pharmingen	554389
IL-12	PE	C15.6	Rat IgG1	BD Pharmingen	554479
IL-1β	PE	166931	Rat IgG2b	RnDSystems	IC4013P
IL-10	PE	JES5-16E3	Rat IgG2b	BD Pharmingen	554467
IL-10	APC	JES5-	IgG2b	BD Pharmingen	554468

IFN- $\gamma$	PE	16E3 BM8	Rat IgG2a, $\kappa$	eBioscience	12-4801
TNF- $\alpha$	PE	MP6- XT22	Rat IgG1	BD Pharmingen	554419
TGF $\beta$	APC	860206	Rat IgG2a	R&D System	FAB8118A
IL-17	PE	TC11- 18H10	Rat IgG1, $\kappa$	Biotec	130-102-344

Број догађаја, одн. количина жељених ћелија које ће се користити за даљу анализу, унешена је у рачунар преко програма BD CELLQUEST у оквиру региона (енгл. *gate*) жељених ћелија приликом добијања података на проточном цитометру. Најмањи број догађаја за даљу анализу је 10.000 у задатом региону, а анализа популација ћелија из добијених података извршена је помоћу програма *Flowing Software 2.5.1. (Cell Imaging Core, Turku Centre for Biotechnology, Финска)*.

### 3.9. Деплеција макрофага

У циљу истраживања значаја макрофага и имуносупресивног утицаја накнадне апликације MSC у овом моделу, макрофаги су деплетирани употребом липозома који садрже клодронат (*Standard macrophage depletion kit, Encapsula NanoSciences LLC*). Према претходно публикованом протоколу [132,134], јединкама су липозоми, апликовани 5 пута (4 дана пре почетка експеримента, 0, 2, 4 и 6-ог дана) у количини од 200  $\mu$ L, док су једној групи поред липозома свакодневно апликоване MSC према претходно описаном распореду. Процена и одређивање степена болести и оштећења ткива дебелог црева извршени су на већ описани начин.

### 3.10. Изолација дендритских ћелија

За потребе испитивања значаја дендритских ћелија и њихове интеракције са MSC у колитису изазваном DSS-ом, дендритске ћелије су изоловане из слезине јединки. Из жртвованих јединки слезине су подвргнуте механичкој обради и пропуштане кроз ћелијска сита. Добијена ћелијска суспензија је центрифугирана на 250g током 5 минута, након чега је супернатан одливан, а седимент третиран са 5 mL раствора за лизирање преосталих еритроцита у трајању од 5 минута на +4°C. Након третмана додато је 5 mL комплетног медијума у циљу прекидања даљег лизирања, а добијени раствор је центрифугиран на 250g у трајању од 5 минута. После центригуирања супернатант је одливан, а седимент са жељеним ћелијама је растворен у 1 mL комплетног медијума.

Добијени раствор представља ћелијску суспензију појединачних ћелија слезине (спленоцита), који служи за даљу изолацију дендритских ћелија на колонама.

Процес изолације на колонама се заснива на имунолошки посредованом везивању суперпарамагнетних честица гвожђа (магнетних микро зрна) за ћелије које испољавају жељене белеге, у овом случају CD11c и последичним пропуштањем кроз магнетне сепараторе (колоне) у којима оне бивају задржане. На овај начин добија се високи проценат жељених ћелија.

Из претходно добијеног седимента, избројане су ћелије слезине након чега је седимент центрифугиран на 200g у трајању од 10 минута. Добијени талог је резблажен у 400  $\mu\text{L}$  раствора EDTA и BSA у PBS-у (пуфер), након чега је у њему додато 100  $\mu\text{L}$  раствора магнетних микрозрна, добро измешан пипетирањем и остављен на инкубацију у фрижидеру у трајању од 15 минута. Инкубираним ћелијама је додат пуфер, након чега су центрифугиране на 200g у трајању од 10 минута. Добијени талог је ресуспендован у 500  $\mu\text{L}$  пуфера, након чега је пребачен у припремљене колоне. Колоне су припремљене тако што су магнетни сепаратори постављени у магнетне држаче (MidiMACS, Miltenyi Biotec) и опрани пропуштањем 3 mL пуфера кроз њих. Проласком пренетог талоба кроз колону у њој се задржавају само ћелије које испољавају CD11c белег, а за које су се везали магнетна микрозрна, док остале ћелије са раствором излазе напоље. Преко пренетог талоба додато је 5 mL пуфера, након чега су брзим притиском клипа колоне, задржане ћелије избачене у епрувету. Истиснуте ћелије представљају жељене ћелије, CD11c+ дендритске ћелије које су даље коришћене у експерименте.

### **3.11. Пасивни трансфер дендритских ћелија**

У циљу испитивања *in vivo* улоге дендритских ћелија, оне су изоловане из јединки које су биле на третману DSS-а или DSS-а и MSC у трајању од два дана. Јединке су жртвоване након два дана, након чега су на колонама изоловане дендритске ћелије по претходно описаном поступку. Изоловане дендритске ћелије су интраперитонеално апликоване двома групама мишева који су већ били на 5-одневном третману DSS-а у количини од  $2 \times 10^5$  растворених у 200  $\mu\text{L}$  PBS-а, према претходно публикованој студији [137]. Једна група мишева примила је DC из мишева третираних DSS-ом (DSS+DC<sup>DSS</sup>), а друга DSS-ом и MSC (DSS+DC<sup>DSS+MSC</sup>). Животиње су праћене свих 7 дана експеримента, а процена и одређивање степена болести и оштећења ткива дебелог црева извршени на већ описани начин. У циљу испитивања разлика у продукцијама системских цитокина животињама је након жртвовања узета крв из абдоминалне аорте и издвојен серум.

### 3.12. Кокултивација дендритских ћелија и MSC

У циљу испитивања паракриног ефекта MSC, DC су изоловане из слезине здравих јединки и култивисане у кокултури и *transwell* систему у односу 10:1, при чему су дендритске ћелије засејане у доњој, а MSC у горњој комори и стимулисане LPS-ом (1 ng/mL), DSS-ом (3%) и комбинацијом LPS и DSS. Ћелије су култивисане у пластичним плочама са 24 отвора у комплетном медијуму. За култивисање ћелија у индиректном контакту коришћен је адекватан пандан *transwell* систем са 24 отвора (0,4  $\mu\text{m}$ ; *Corning Incorporated, Life Sciences*, Француска) Након 48 часова инкубације, супернатанти ћелија су сакупљени и замрзнути на  $-20^{\circ}\text{C}$  до анализирања, док су DC сакупљене и анализирани методом проточне цитометрије. Коришћењем ELISA методе према упутству произвођача анализирани је продукција цитокина (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-12, IL-10), фактора (PGE и IDO) и Галектина 3 у супернатанту, док су DC, према претходно описаном поступку обојене за површинске маркере и интрацелуларне цитокине и помоћу проточне цитометрије, анализиран је њихов фенотип.

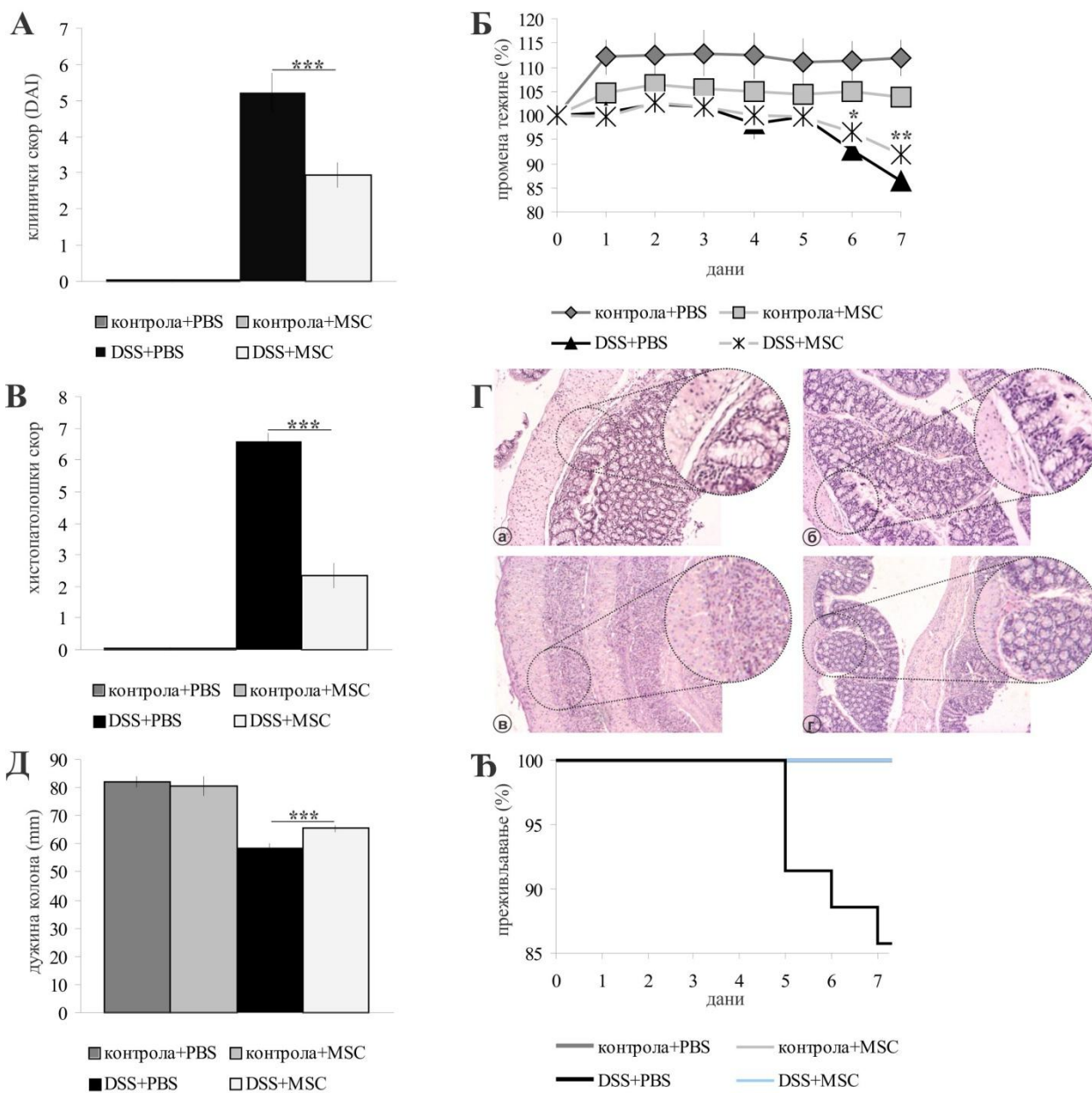
### 3.13. Статистичка обрада

Сви добијени подаци су приказани као аритметичка средина са стандардном грешком ( $\bar{x} \pm \text{SE}$ ). Добијени подаци су обрађени коришћењем статистичког програма за обраду података *Statistical Package for Social Sciences (ver 20.0)* за *Windows* оперативни програм. На основу нормалности расподеле коришћени су параметријски (*Student's t*) или непараметријски (*Mann-Whitney U*) тест. За процену разлике у преживљавању између група коришћен је *Kaplan-Meier* тест, а за анализу варијабилности између група коришћен је ANOVA тест. Програм *Microsoft Excel* је коришћен за креирање графикона. Најмања статистички значајна разлика је подразумевана вредност  $p \leq 0,05$ .

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. MSC смањују знаке колитиса изазваног DSS-ом

Свакодневне апликација  $2 \times 10^6$  MSC подељених у три дневних доза значајно ( $p < 0,001$ ) је утицала на смањење клиничког скорa јединки које су биле на третману DSS-а (Фигура 2А). То смањење се огледало, како у смањеном појављивању крвавих дијареја, тако и на умањену промену тежине. Дневно праћење јединки показало је да јединке из DSS+PBS групе развијају знатно јаче знаке болести са појавом дијареја са обилним крварењем без или са присуством слузи. Прво појављивање крви у фецесу таквих јединки је примећено од 4-ог дана, док код јединки којима су апликоване MSC дијареје или обилно крварење нису примећени до краја експеримента. Значајне разлике у променама тежине између ових двеју група запажене су 6-ог ( $p < 0,05$ ) и 7-ог ( $p < 0,01$ ) дана (Фигура 2Б). Хистопатолошком анализом Н&Е обојених препарата дебелог црева показана су широка оштећења ткива са акумулирањем ћелија имунског система, која су статистички високо значајна ( $p < 0,001$ ) између јединки DSS+PBS и DSS+MSC група (Фигура 2В). Апликације PBS-а (Фигура 2Га) и MSC-а (Фигура 2Гб), као што је очекивано нису показале никаква штетна дејства на ткиво колона. Док су оштећења код јединки на DSS третману (Фигура 2Гв) била екстензивна са појавама великих поља деплетираниог епитела и масовном инфилтрацијом ћелија имунског система, таква оштећења нису запажена код јединки на DSS третману којима су апликоване MSC (Фигура 2Гг). Код таквих јединки оштећења су била веома блага са слабом инфилтрацијом ћелија, која имају морфологију нормалног епитела. Такве промене на дебелом цреву су у складу са знацима клиничке прогресије болести. Скраћење дужине колона (Фигура 2Д) код јединки са DSS третманом је било статистички значајно веће ( $p < 0,001$ ) у односу на јединке којима су апликоване MSC. То указује да су промене скраћења црева последица оштећења ткива и појаве ожиљака. Иако је преживљавање (Фигура 2Ђ) било евидентно веће код јединки којима су апликоване MSC оно није достигло статистичку значајност ( $p > 0,05$ ). Током експеримента ниједна животиња којој су биле апликоване MSC није угинула, на супрот јединкама из DSS+PBS групе код којих је било угињавања. Ови резултати указују да апликације MSC нису у потпуности спречиле или зауставиле развој болести, већ да су значајно ублажиле пратеће симптоме.

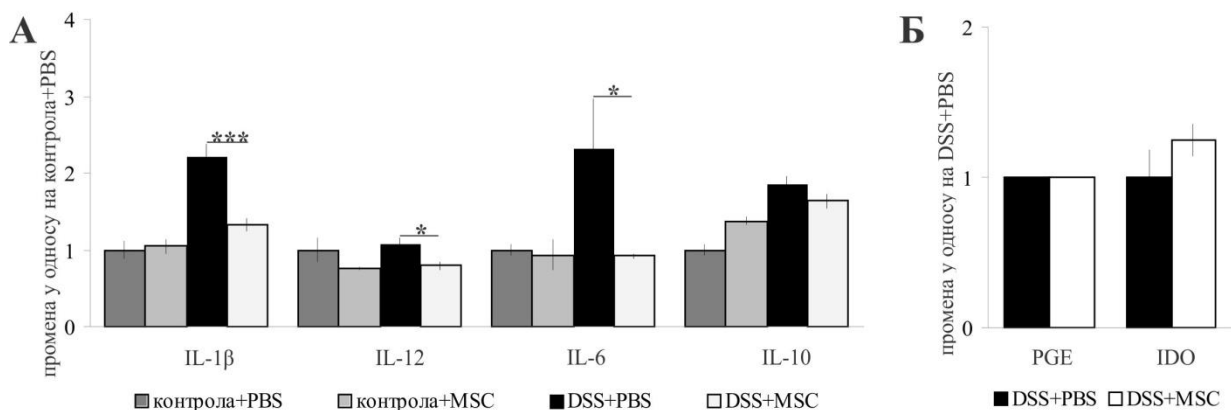


**Фигура 2.** Апликације MSC смањују знаке болести и повећавају преживљавање.

Апликације MSC смањује клинички скор (А), губитак тежине (Б) и хистопатолошки скор (В) јединки на DSS третману, што се може видети на репрезентативним сликама хистопатолошких препарата (Г) (контрола+PBS (Га); контрола+MSC (Гб); DSS+PBS (Гв); DSS+MSC (Гг)). Скраћење колоне је мање код таквих јединки (Д). Иако статистички није значајно, преживљавање је било веће код јединки на DSS третману које су примале MSC (Е). Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$  из 4 експеримената;  $n=8-35$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

## 4.2. MSC смањују продукцију системских проинфламацијских цитокина

Апликације MSC су статистички значајно утицале на смањену продукцију проинфламацијских цитокина. Ово смањење је забележено код свих анализираних цитокина. Статистички високо значајно смањење ( $p < 0,001$ ) је виђено у продукцији IL-1 $\beta$  (Фигура 3А) између DSS+PBS и DSS+MSC група у поређењу са јединкама које из контролне групе. Смањења су примећена и у продукцијама IL-12 ( $p < 0,05$ ; Фигура 3А) и IL-6 ( $p < 0,05$ ; Фигура 3А). Такође је примећено да апликације MSC нису повећале продукцију антиинфламацијског цитокина IL-10 ( $p > 0,05$ ; Фигура 3А). Поред продукције IL-10, анализирани су и разлике у продукцијама антиинфламацијских фактора PGE ( $p > 0,05$ ; Фигура 3Б) и IDO ( $p > 0,05$ ; Фигура 3Б) између група које су биле на третману DSS-а. Примећено је да апликације MSC нису довеле до статистички значајног повећања разлика у продукцијама између тих група. Ови резултати указују да MSC свој терапеутски ефекат вероватно постижу продукцијом неког другог фактора или цитокина.



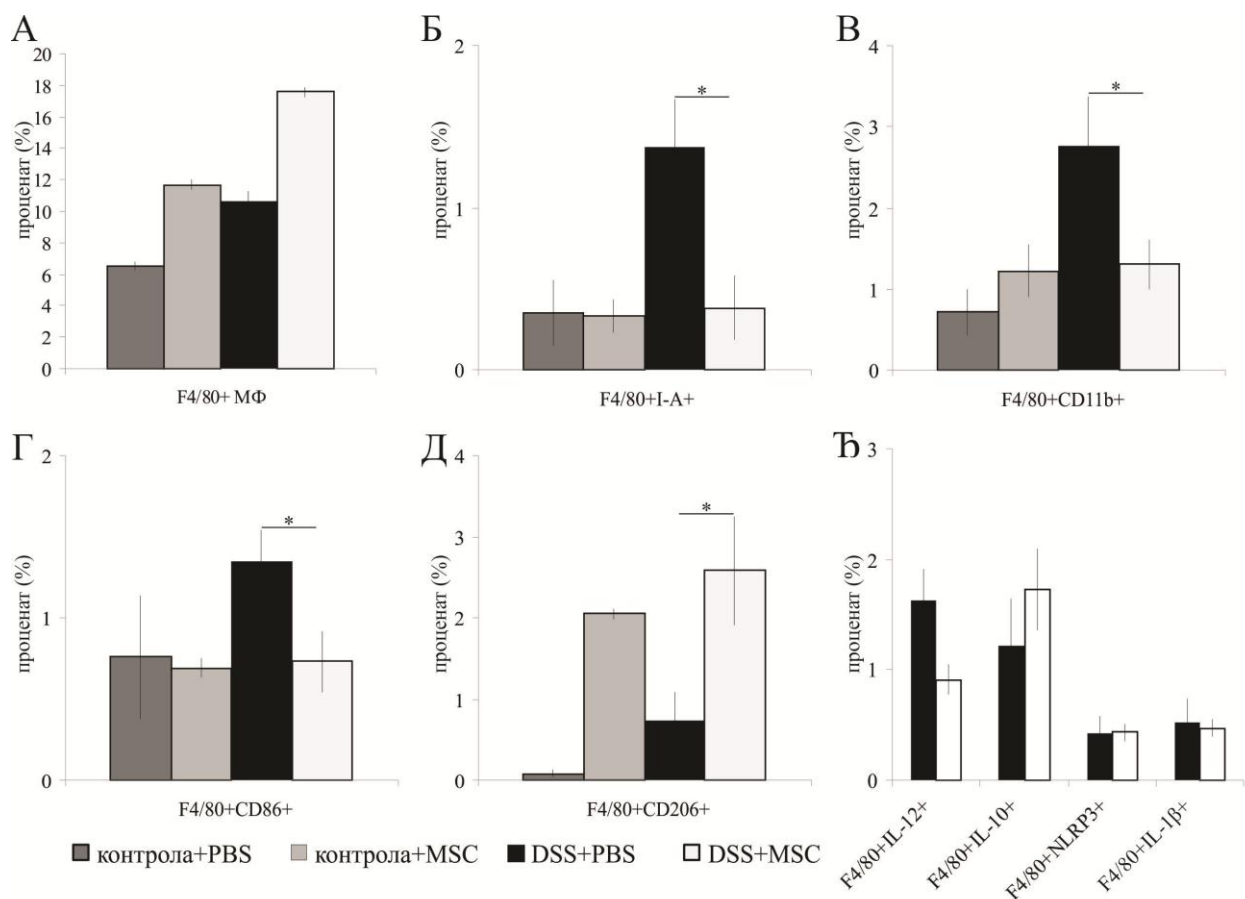
**Фигура 3. Апликације MSC су смањиле продукције проинфламацијских цитокина.**

Апликације MSC статистички значајно утицале на смањење IL-1 $\beta$  (А први графикон), IL-12 (А други графикон) и IL-6 (А трећи графикон). MSC нису утицале на повећање продукције цитокина IL-10 (А четврти графикон) и фактора PGE (Б леви графикон) и IDO (Б десни графикон). Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=4-12$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$

## 4.3. Апликације MSC су утицале на смањење присуства проинфламацијских ћелија имунског система

Апликације MSC су утицале на смањење инфилтрације и присуства ћелија имунског система са проинфламацијским фенотипом у *lamina propria* дебелог црева мишева на третману DSS-а.

У популацији изолованих ћелија, примећена је нестатистички значајано повећана процентуална заступљеност макрофага који експримирају F4/80 површински белег у *lamina propria* дебелог црева. Даљом анализом појединих популација макрофага примећено је статистички значајно смањење ( $p < 0,05$ ) процентуалне заступљености макрофага који експримирају I-A белеге за МНС молекула II класе (Фигура 4Б), CD11b (Фигура 4В) и костимулаторни молекула CD86 (Фигура 4Г). Поред тога, примећено је статистички значајно повећање заступљености алтернативно активираних (антиинфламацијских, M2) макрофага који експримирају CD206 белег (Фигура 4Д). Иако статистички незначајно ( $p > 0,05$ ), примећена су смањења процентуалне присутности макрофага која продукују IL-12, IL-1 $\beta$  и NLRP3, док је примећено повећање инфилтрације макрофага која продукују IL-10 (Фигура 4Ђ).

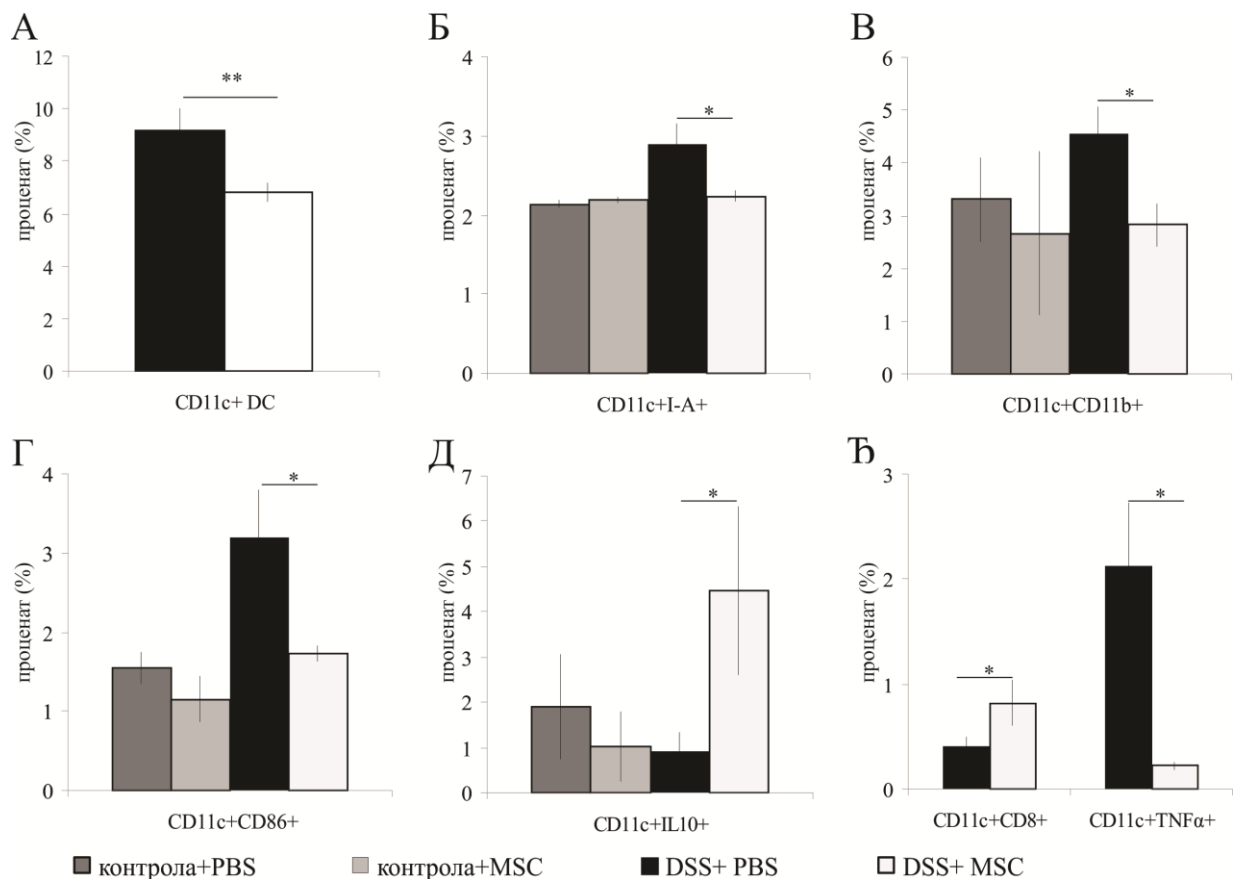


**Фигура 4.** Апликације MSC су смањиле инфилтрације проинфламацијских макрофага.

MSC су утицале на повећано присуство укупних макрофага које експримирају F4/80 (А) белег док су смањиле оне које експримирају I-A (Б), CD11b (В) и CD86 (Г), док је повећање примећено код CD206+ макрофага (Д). Смањена инфилтрација је примећена и код макрофага који продукују IL-12, IL-1 $\beta$  и NLRP3, а повећано код IL-10 (Ђ) продукујућих макрофага. Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=4-12$ ; \*  $p < 0,05$



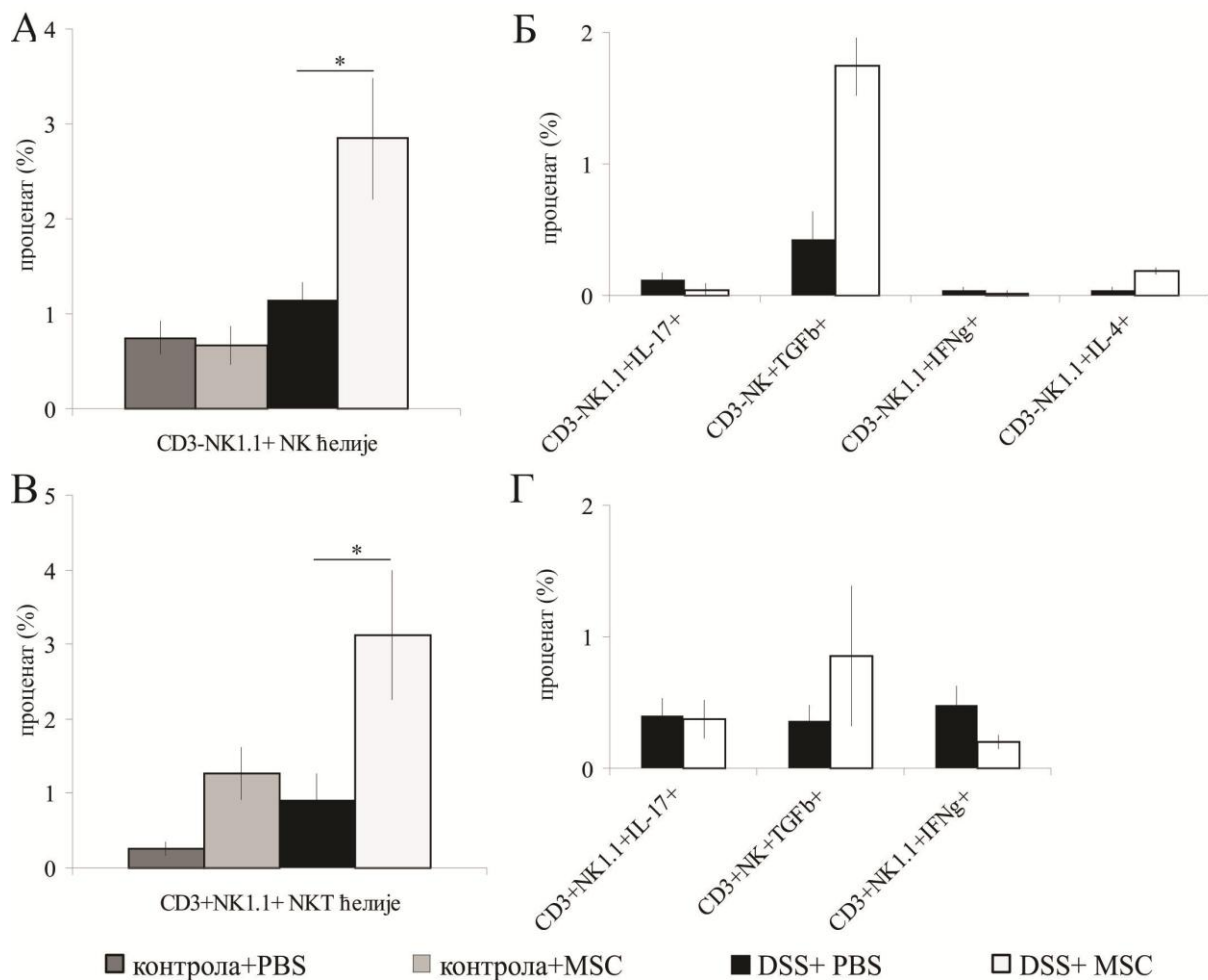
Апликације MSC су у статистички значајно ( $p < 0,01$ ) утицале на смањење процентуалне заступљености дендритских ћелија које експримирају површински CD11c (Фигура 5А) белег. Поред тога, MSC су утицале на смањење процентуалне заступљености DC које експримирају проинфламацијски фенотип. Статистички значајно смањење ( $p < 0,05$ ) је примећено у популацији DC које експримирају белег I-A (Фигура 5Б), CD11b (Фигура 5В) и CD86 (Фигура 5Г). Поред утицаја на заступљеност проинфламацијског фенотипа DC, MSC су утицале на статистички значајно повећање ( $p < 0,05$ ) DC које продукују антиинфламацијски цитокин IL-10 (Фигура 5Д) и експресију толерогеног белега CD8 (Фигура 5Ђ). Такође, MSC су утицале на статистички значајно ( $p < 0,05$ ) смањење присуства DC које продукују TNF $\alpha$  (Фигура 5Ђ).



**Фигура 5. Апликације MSC су утицале на инфилтрацију проинфламацијских дендритских ћелија.**

MSC су смањиле инфилтрацију дендритских ћелија које експримирају CD11c белег (А), као и I-A (Б), CD11b (В) и CD86 (Г). MSC су повећале инфилтрацију IL-10 (Д) продукујућих дендритских ћелија и оних које експримирају CD8 белег (Ђ леви графикон). Такође, MSC су смањиле продукцију TNF $\alpha$  (Ђ десни графикон) у дендритским ћелијама. Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=4-12$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$

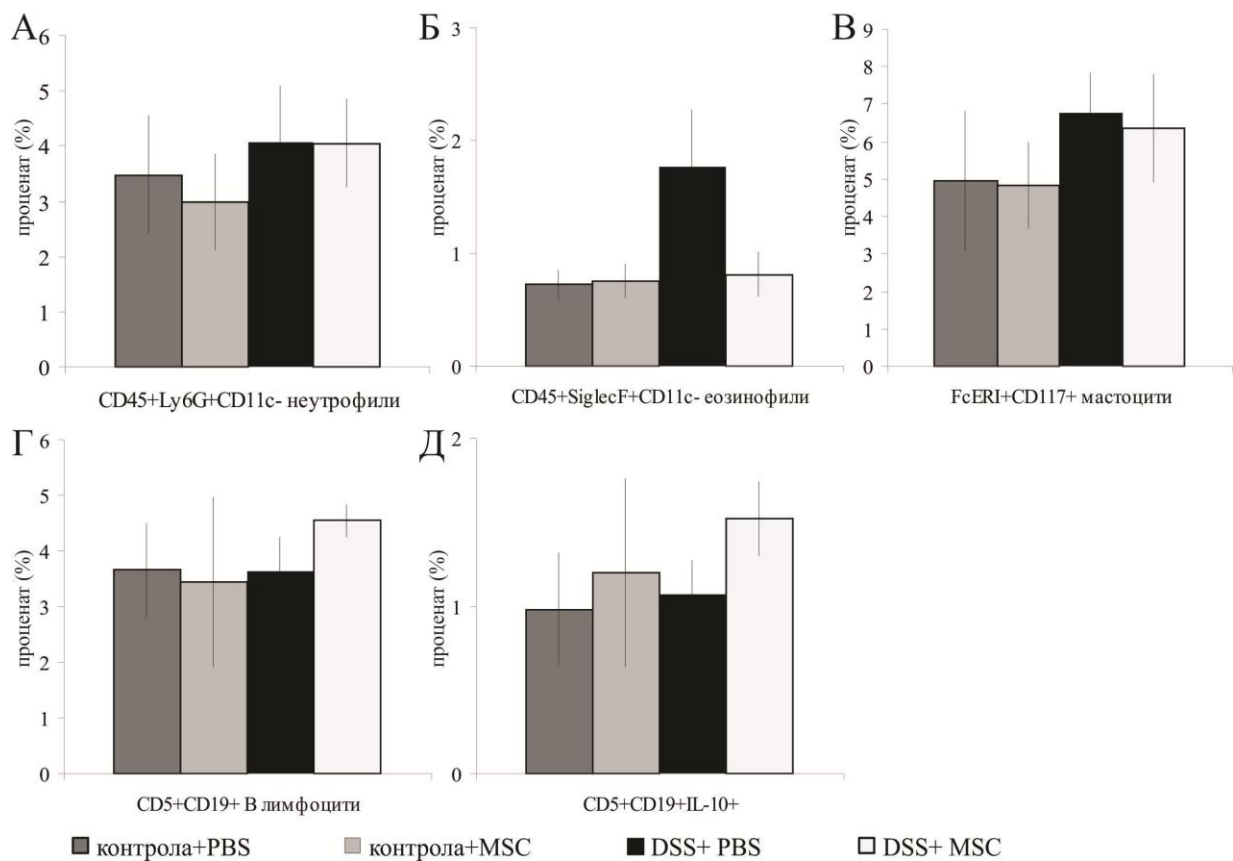
Поред утицаја на главне чиниоце запаљењског одговора, MSC су значајно утицале на повећану процентуалну заступљеност NK и NKT ћелија и њихове протективне улоге. MSC су статистички значајно ( $p < 0,05$ ) утицале на повећање NK ћелија које експримирају NK1.1, а не експримирају CD3 белеге (Фигура 6А). Осим на укупно присуство, оне су статистички незначајно утицале на смањење заступљености популација NK ћелија које продукују проинфламацијске цитокине IL-17 и IFN $\gamma$ , а повећале заступљеност оних које продукују TGF $\beta$  и IL-4 (Фигура 6Б). Такође, апликације MSC су статистички значајно ( $p < 0,05$ ) повећале заступљеност NKT ћелија које експримирају CD3 и NK1.1 белег (Фигура 6В). Поред утицаја на укупно присуство NKT ћелија, MSC су статистички незначајно ( $p > 0,05$ ) утицале на повећање процентуалне заступљености NKT ћелија које продукују TGF $\beta$ , а смањење оних које продукују IFN $\gamma$  и IL-17 (Фигура 6Г).



**Фигура 6. Апликације MSC су повећале заступљеност NK и NKT ћелија.**

MSC су повећале заступљеност NK ћелија (А). Такође, смањиле су заступљеност NK ћелија које продукују IL-17 и IFN $\gamma$ , а повећале TGF $\beta$  и IL-4 продукујућих NK ћелија (Б). Уједно, MSC су повећале заступљеност NKT ћелија (В) и оних које продукују TGF $\beta$ , а смањиле заступљеност NKT ћелија које продукују IL-17 и IFN $\gamma$  (Г). Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ ;  $n=4-12$ ; \*  $p < 0,05$ .

MSC нису статистички значајно ( $p>0,05$ ) утицале на смањење присуства гранулоцита у *lamina propria* дебелог црева. Иако се неутрофили сматрају главним обележјем активне форме и колитиса изазваног DSS-ом, примећено је смањење њихове процентуалне заступљености (Фигура 7А), као и осталих гранулоцита, еозинофила (Фигура 7Б) и мастоцита (Фигура 7В). Поред ових ћелија, анализирано је присуство укупних В лимфоцита који експримирају CD5 и CD19 белеге (Фигура 7Г) и оних који експримирају те белеге и продукују IL-10 (Фигура 7Д), за које су неколико рада [156–158] показала да имају регулаторну и протективну улогу колитису изазваног DSS-ом. Примећено је статистички незначајно ( $p>0,05$ ) повећање заступљености тих ћелија, нарочито оних који продукују IL-10.

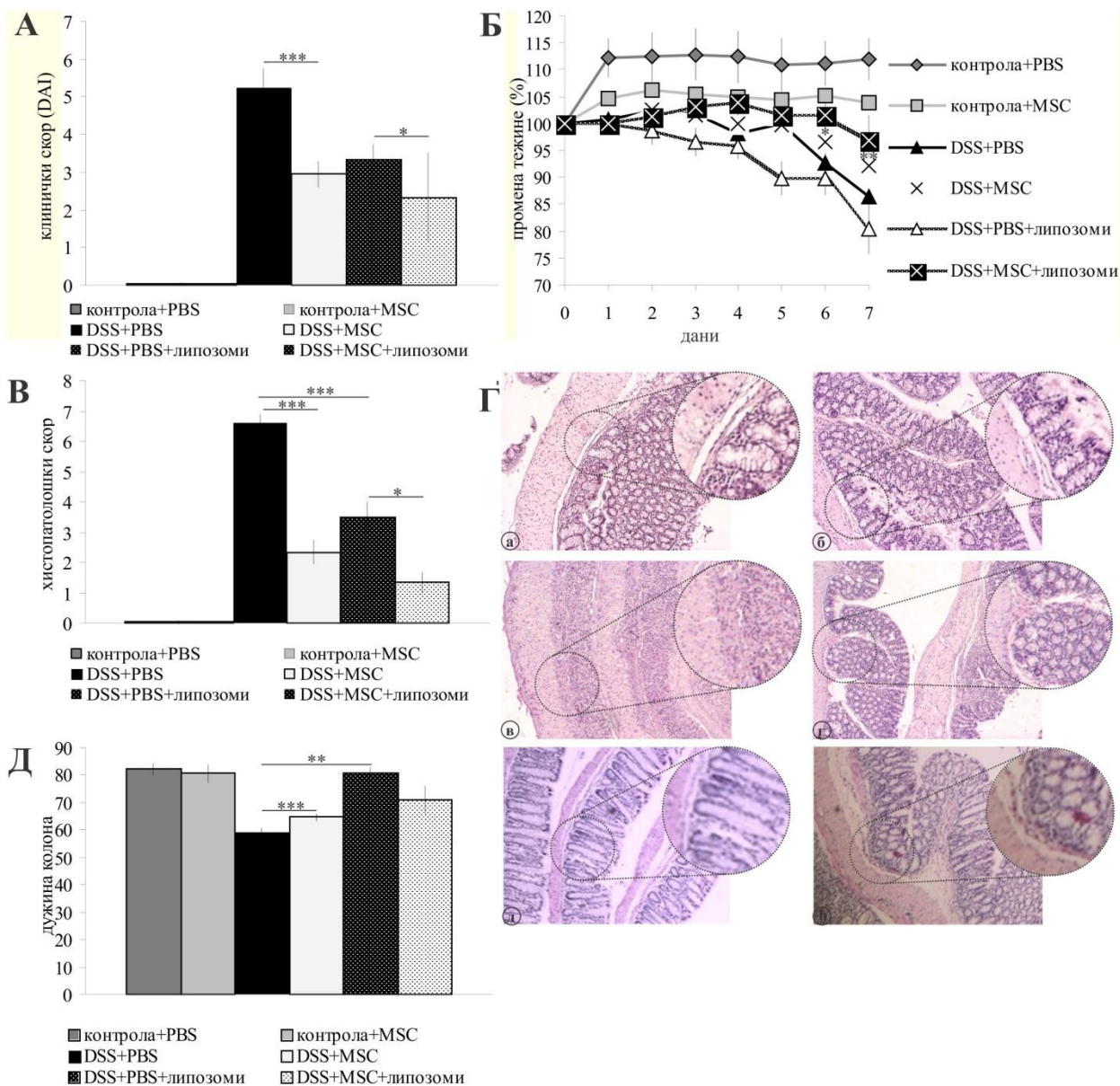


**Фигура 7. MSC смањују присуство гранулоцита, а повећавају присуство В лимфоцита.**

MSC смањиле су присуство неутрофила (А), еозинофила (Б) и мастоцита (В), док су повећале присуство В лимфоцита (Г) и В лимфоцита који продукују IL-10 (Д). Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ ; n=4-12.

#### 4.4. MSC су ублажиле колитис након деплеције макрофага

У циљу испитивања да ли се терапеутски ефекат MSC базира искључиво деловањем на и преко макрофага, извршена је деплеција макрофага липозоима који садрже клодронат и последично томе апликације MSC. Примећено је да је деплеција макрофага смањила клинички скор јединки на третману DSS-а, док су апликације MSC додатно смањиле знаке болести и статистички значајно утицале на смањење клиничког скорa ( $p < 0,05$ ; Фигура 8А). То се нарочито приметило на смањење појаве неформираних фецеса и окултног крварења. Такође, губитак тежине код тих јединки иако статистички незначајан био је мањи ( $p > 0,05$ ; Фигура 8Б). Хистопатолошким анализом Н&Е обојених микроскопских исечака препарата колона тих мишева примећена је статистички значајно смањење скорa између јединки које су примале липозоме ( $p < 0,05$ ; Фигура 8В). На тим посматраним препаратима примећено је смањено оштећење ткива колона, са веома благим променама у архитектури и редукованом инфилтрацијом ћелија имунског система. Ткиво колона јединки које су биле на третману DSS-а и примале липозоме било је благо нарушене структуре, која се огледала у проширењима крипти, али очуване структуре слојева са местимичном и ретком инфилтрацијом ћелија имунског система око крипти (Фигура 8Гд), док је код јединки којима су апликоване MSC ткиво било много боље очувано и наликовало као код здравих јединки (Фигура 8Гђ). Иако је дужина колона била већа код јединки група којима су апликовани липозоми у односу на јединки које су биле само на третману DSS-а, та разлика унутар групе није била статистички значајна ( $p > 0,05$ ; Фигура 8Д).



**Фигура 8.** Апликације MSC након деплеције макрофага липозомима су додатно ублажиле колитис.

Апликације MSC јединкама којима су апликовани липозоми су смањиле клинички скор (А), губитак тежине (Б) и хистопатолошки скор (В). Репрезентативне слике препарата колоне јединки DSS+PBS+липозоми (Гд) и DSS+PBS+MSC+липозоми (Гђ). Јединке којима су апликовани липозоми имале су дужа црева од јединки на третману DSS. Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ ; групе на липозомима  $n=3$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### **4.5. MSC *in vitro* смањују продукцију проинфламацијских цитокина DC на паракрини начин**

С обзиром да је деплеција макрофага показала да имуносупресивни ефекат MSC није ограничен искључиво на деловање макрофага, већ да је посредован деловањем и на друге ћелије имунског система, извршена је култивација MSC и DC. Циљ те култивације је био да се покаже да ли је MSC супримирају функције DC и посредством којег механизма, култивисањем у кокултури или у раздвојеним коморама, *transwell* систему. Резултати култивације MSC и DC у кокултури или у *transwell* систему показала су да MSC утичу на смањење продукције проинфламацијских цитокина у сваком од експерименталних начина култивације, а да је то смањење изражено веће у *transwell* систему у односу на кокултуру.

Одређивањем продукције TNF $\alpha$  (Фигура 9А) у супернатанту култивисаних ћелија показало је смањење у условима индиректне култивације DC и MSC. Након стимулације ниским концентрацијама LPS и DSS продукција је била високо статистички значајно ( $p < 0,001$ ) смањена код DC на које су MSC деловале паракрином секрецијом. Такође, упоређењем продукције овог цитокина између DC стимулираних DSS и DC и MSC у *transwell* систему стимулираних DSS-ом показало је високо значајно статистичко смањење ( $p < 0,001$ ) у паракрином начину.

Одређивањем продукције проинфламацијског цитокина IL-12 (Фигура 9Б) такође је показала смањење продукције овог цитокина у свим условима индиректне култивације. Ово статистички сигнификантно смањење било је видљиво након стимулације DSS-а. Високо статистички значајно ( $p < 0,001$ ) смањење продукције запажено је између група култивације DC и MSC у директном и индиректном начину. Такође, статистички значајно смањење продукције овог цитокина запажено је између DC стимулираних DSS-ом и DC и MSC стимулираних DSS-ом у *transwell* систему.

Одређивањем продукције IL-1 $\beta$  (Фигура 9В) у кокултури и *transwell* систему запажена је статистички значајна разлика ( $p < 0,05$ ) након стимулације ниским концентрацијама LPS. Иако разлике између DC и MSC култивисаних у кокултури и *transwell* систему у присуству DSS није било, статистички значајно смањење ( $p < 0,05$ ) је примећено у поређењу сваких од ова два начина култивације понаособ са DC стимулираних DSS-ом.

С обзиром да је очекивано да адитивни ефекат DSS-а и LPS-а резултује повећаном продукцијом цитокина, анализирани су продукције снажних антиинфламацијских фактора

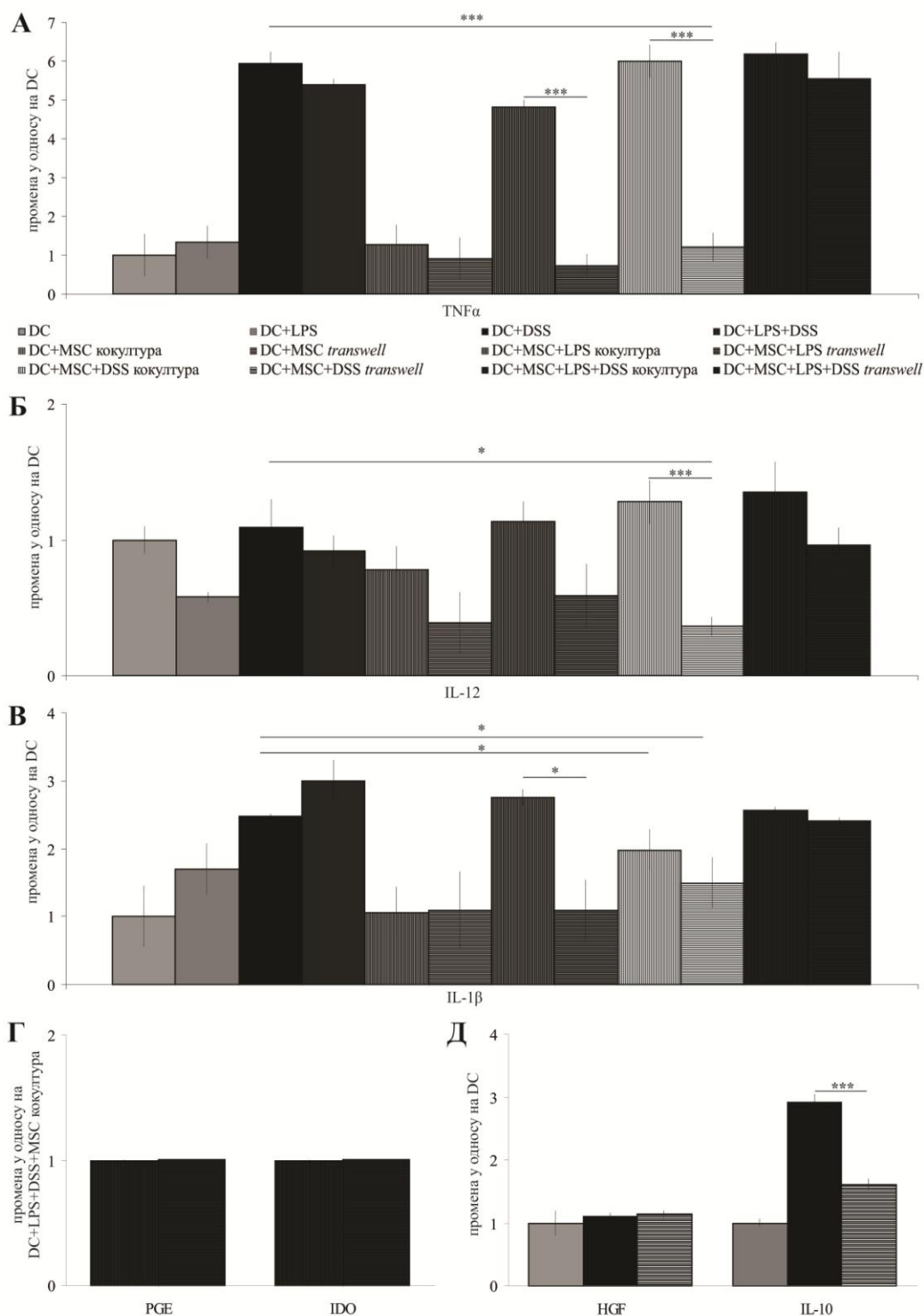
PGE и IDO у култивацији DC са MSC. Поређењем продукције антиинфламацијских фактора PGE и IDO након заједничке стимулације DC и MSC LPS-ом и DSS-ом (Фигура 9Г) запажена је статистички незначајно ( $p > 0,05$ ) повећана продукција ових фактора у *transwell* систему у поређењу са култивацијом у кокултури.

Ови резултати недвосмислено указују да је имуносупресивни ефекат MSC на DC посредован продукцијом неког од антиинфламацијских солубилних фактора. Такође, с обзиром да је у свим анализираним цитокинима дошло до значајнијег ефекта након стимулације DSS-ом, а да у литератури не постоје подаци о деловању MSC у таквом случају, даља анализирања су усмерена ка откривању потенцијалног агента и ефекта супресије MSC на DC у присуству DSS у *transwell* систему.

Анализа продукције антиинфламацијских HGF и IL-10 (Фигура 9Д) показала је да су MSC статистички незначајно ( $p > 0,05$ ) утицале на повећање продукције HGF, док је у продукцији IL-10 дошло до статистички значајног смањења ( $p < 0,001$ ). Ови резултати указују да MSC супресивни ефекат остварују секрецијом неког другог, а неанализираног цитокина или фактора.

Анализирањем фенотипа DC стимулираних DSS-ом у присуству MSC у *transwell* систему показано је статистички значајно смањење CD11c<sup>+</sup> DC које продукују TNF $\alpha$  ( $p < 0,01$ ; Фигура 10А) и IL-6 ( $p < 0,05$ ; Фигура 10Б). Анализа површинских белега DC показала је статистички значајно смањење експресије CD86 ( $p < 0,01$ ; Фигура 10В), CD80 ( $p < 0,05$ ; Фигура 10Г) и I-A ( $p < 0,05$ ; Фигура 10Д).

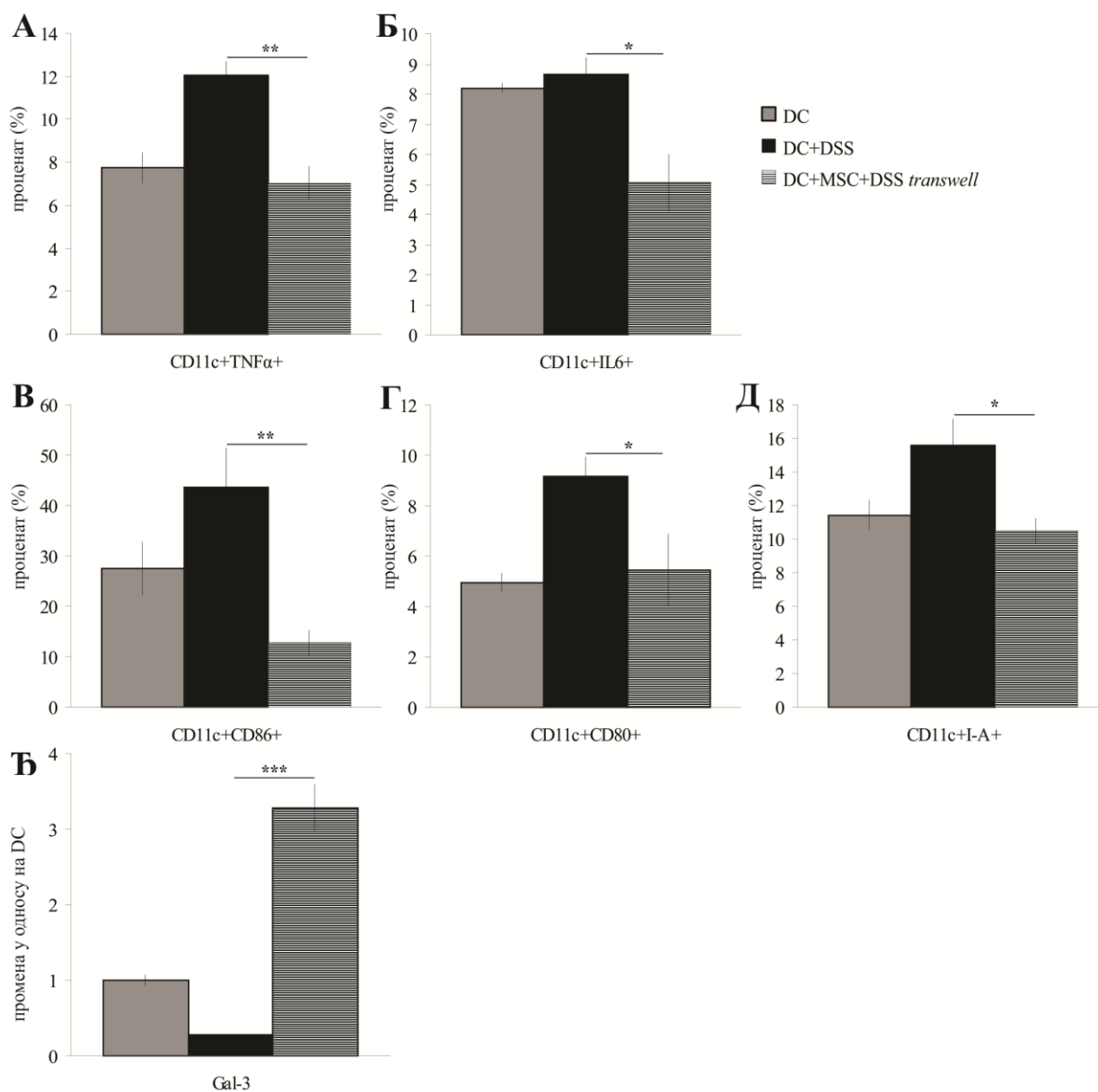
У циљу откривања потенцијалног механизма деловања и агента преко кога MSC делују на DC у присуству DSS, анализирана је продукција Галектина 3. Анализа продукције показала је да MSC продукују статистички значајно веће количине Галектина 3 ( $p < 0,001$ ; Фигура 10Ђ). Неколико претходно публикованих студија [159–162] су показале да MSC продукују Галектин 3 који има имуносупресивни ефекат на DC, као и да у његовом одсуству DC продукују веће концентрације проинфламацијских цитокина. Потенцијални механизам деловања MSC на DC у присуству DSS је управо повећаном продукцијом Галектина 3.



**Фигура 9. MSC смањују продукцију проинфламацијских цитокина у индиректном начину.**

Продукција TNF $\alpha$  (А), IL-12 (Б) и IL-1 $\beta$  (В) је смањена у индиректном начину у свим условима култивације. Продукција антиинфламацијских PGE (Г леви графикон) и IDO (Г десни графикон) је повећана у индиректном начину у присуству LPS-а и DSS-а. Продукција HGF (Д леви графикон) је повећана, док је продукција IL-10 (Д десни графикон) смањена на истом начину у присуству DSS-а. Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ ; n=4; \* p<0,05; \*\*\* p<0,001.





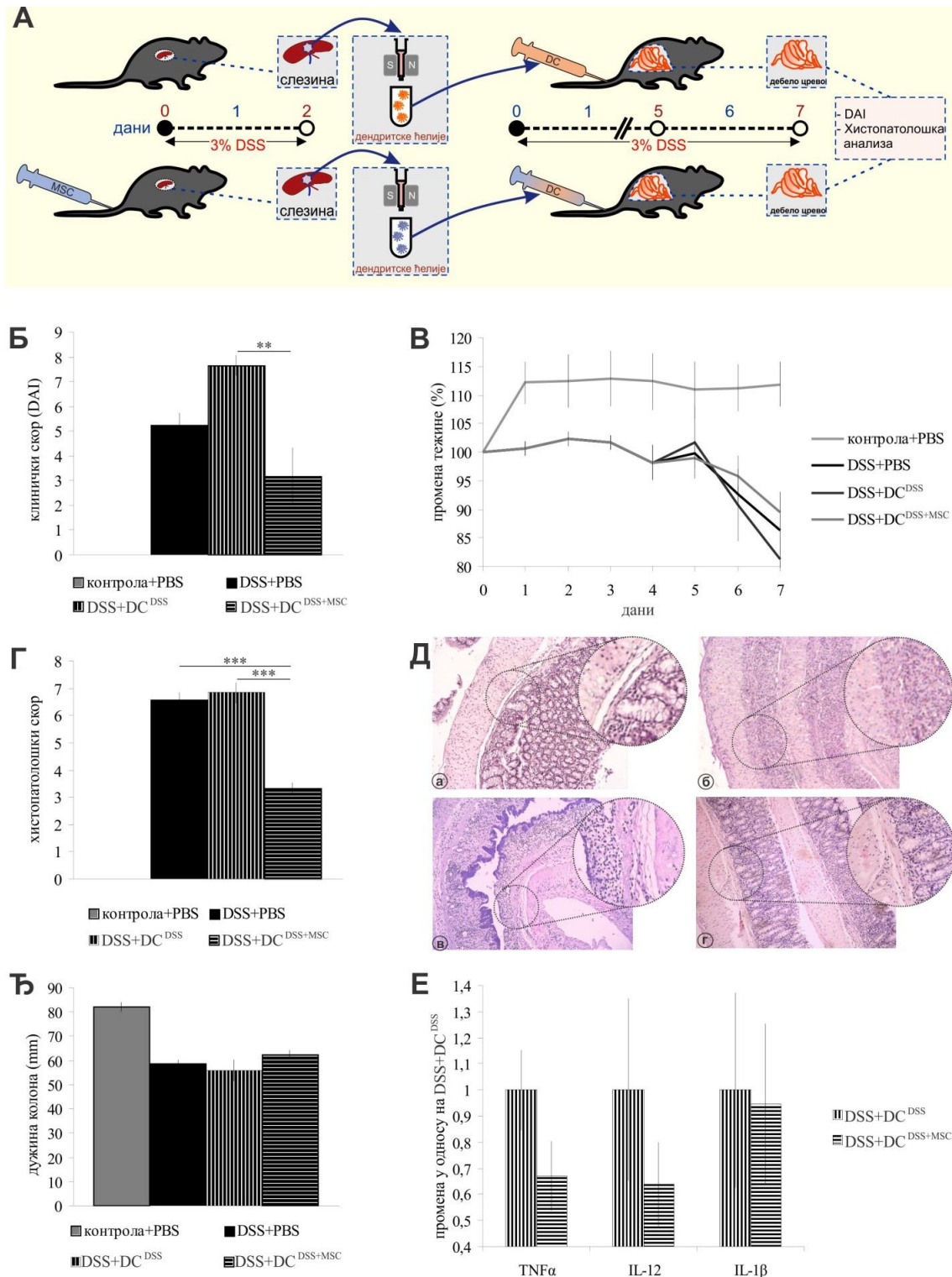
**Фигура 10. MSC смањују проинфламацијски фенотип DC секрецијом Галектина 3.**

MSC смањују продукцију TNFα (А) и IL-6 (Б) и експресију CD86 (В), CD80 (Г) и I-A (Д) белега DC, док је продукција Галектина 3 (Е) је повећана. Резултати приказани као  $\bar{x} \pm SE$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.6. Пасивни трансфер *in vivo* стимулираних DC мишевима на третману DSS утиче на знаке колитиса

У циљу испитивања да ли MSC у *in vivo* условима супримирају функције DC и њихов последично специфични ефекат извршен је пасивни трансфер DC изолованих из слезине мишева које су били на третману DSS-а ( $DC^{DSS}$ ) и DSS-а и MSC ( $DC^{DSS+MSC}$ ). Тако изоловане DC су трансферисане мишевима који су већ били на третману DSS-а (Фигура 11А). Резултати пасивног трансфера су показали да апликација DC из слезине мишева који су били на третману DSS погоршава знаке болести, док је апликација DC стимулираних DSS и MSC смањила знаке колитиса. То се огледало статистички значајним смањењем клиничког скорa између група које су примиле DC ( $p < 0,01$ ; Фигура 11Б). Такође, губитак тежине (Фигура 11В) код јединки које су примиле DC стимулираних DSS био је већи у односу на јединке које су примиле DC стимулиране DSS и MSC. Хистопатолошка анализа препарата колона тих јединки показала је статистички значајно смањење скорa ( $p < 0,001$ ; Фигура 11Г) код јединки  $DC^{DSS+MSC}$ . Док је код јединки које су примиле  $DC^{DSS}$  (Фигура 11Дв) ткиво колона имало широка оштећења епитела са масивним инфилтрацијама, ткиво колона  $DC^{DSS+MSC}$  (Фигура 11Дг) је имало релативно очуванију структуру са редукованом инфилтрацијом ћелијама имунског система, што се може видети на репрезентативни сликама (Фигура 11Д) ткива колона. Поред утицаја на клинички и хистопатолошки скор, иако статистички није имала значаја апликација  $DC^{DSS+MSC}$  је утицала на смањење скраћења дужине колона ( $p > 0,05$ ; Фигура 11Ђ). Ткиво колона тих јединки је било дуже у односу на јединки које су биле на DSS третману. Насупрот овоме, јединке којима су апликоване  $DC^{DSS}$  имале су скраћеније колоне у односу на DSS третиране мишеве.

У циљу потврђивања супресивног *in vivo* ефекта MSC на функције DC, анализирани су продукције проинфламацијских цитокина  $TNF\alpha$ ,  $IL-12$  и  $IL-1\beta$  (Фигура 11Е) између група које су примиле DC. Анализа је показала да је у свим анализираним цитокинима дошло до статистички незначајног смањења ( $p > 0,05$ ) продукције, што указује, поред претходно приказаних резултата, да MSC имају способност да *in vivo* модулирају функције DC уједно смањујући њихову патогену улогу. То такође указује на постојање могућности њихове модулације у циљу одлагања или смањења степена оштећења у акутном колитису, представљајући их погодним циљем за потенцијалну терапију улцерозног колитиса.



**Фигура 11. Апликације *in vivo* стимулираних DC утичу на промену степена колитиса.**

Шема изолације и апликација DC (A). Апликоване DC *in vivo* стимулисане MSC смањују клинички скор (B), промену тежине (B) и хистопатолошки скор (Г). Оштећења колона су била већа код јединки којима су апликоване DC<sup>DSS</sup> (Дв) у односу на оне којима су апликоване DC<sup>DSS+MSC</sup> (Дг). Такође, апликација DC<sup>DSS+MSC</sup> утицала је на смањено скраћење колона (Ђ), као и на продукцију проинфламацијских цитокина у серуму (Е). Резултати су приказани као  $\bar{x} \pm SE$ ; n=6; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001.

## 5. ДИСКУСИЈА

Основни закључак ових истраживања указује да апликација MSC има терапеутски потенцијал у мишјем моделу запаљења дебелог црева изазваног декстран натријум сулфатом паракриним ефектом на промену функција дендритских ћелија.

MSC имају велики потенцијал имуномодулације и регенерације оштећеног ткива, који остварује секрецијом имуномодулаторних и трофичких фактора и међућелијским контактом [6,24,46,51,163–165]. То указује на значајну *in vivo* функцију као регулатора оштећења и запаљења у ткиву [60], као и обећавајућу терапеутску улогу многих болести [163,165], као што је и запаљењска болест црева и њене најчешће форме, улцерозног колитиса [60,166,167]. У циљу истраживања патофизиологије и добијања потенцијално ефикасне терапије улцерозног колитиса, последњих неколико деценија развијен је велики број анималних модела, од којих је најчешће коришћен мишји модел колитиса изазваног декстран натријум сулфатом [105,108,122]. Овај модел представља релевантан модел за превођење добијених резултата са мишева на људе, који се карактерише репродукцибилношћу, лакоћом изазивања и могућности добијања различитих фаза болести у зависности од концентрације, дужине и учесталости апликације [108,122].

Да MSC имају потенцијални терапеуски ефекат у бројним стањима, па тако и у колитису изазваног DSS-ом показале су бројне студије [48,147–154]. Све те студије, због различитих експерименталних услова, нису прецизно одговориле која је количина и дужина, одн. броја понављања апликација ћелија, као и која је рута најподеснија за терапију колитиса. Неке од тих студија су у циљу испитивања повећања терапеутског ефекта, непосредно пре апликације извршили стимулацију MSC цитокинима, као што су IL-1 $\beta$  [149] и IFN $\gamma$  [147], трансфицирали плазмидима за ген IFN $\gamma$  [148] или фармаколошки инхибирали секрецију Галектина-3 [48]. Циљ тих претретмана био је повећање способности њиховог доласка до места запаљења и терапеутског ефекта излагањем MSC проинфламацијском окружењу непосредно пре апликације, прекомерном експресијом или смањењем секреције цитокина. Резултати тих студија су показали ефикасност како претираних, тако и нетретираних MSC. Међутим, ова студија је по први пут показала терапеутску ефикасност два милиона MSC подељених у три дневних доза интраперитонеално апликованих сваког дана током трајања експеримента. Тај терапеутски потенцијал се одразио на побољшање свих мерених параметара (клинички скор, хистопатолошки скор, дужина црева, повећано преживљавање). Иако је

преживљавање било веће код мишева третираних MSC, оно није достигло статистичку значајност, док су ефекти на параметре прогресије болести су били високо значајни (Фигура 1). Такође, ова студија је показала да интраперитонеална апликација представља адекватну руту за апликацију MSC, нарочито ако је потребно да се апликује већа количина ћелија. Сама интраперитонеална рута апликације није до краја истражена, а представља вредан путоказ, нарочито за третман болести абдоминалних органа, као што је улцерозни колитис [60]. У прилог томе су резултати претходних студија који су показали да интравенски апликоване MSC, због своје величине, у великој мери бивају задржане у плућима и јетри [61]. Такође, интравенском апликацијом је због анатомске и физиолошке природе крвних судова и циркулације ограничена количина, волумен и број доза. Недавно публикована студија је поредбено анализирала ефекте различитих рута апликација и показала супериорност интраперитонеалне апликације у односу на интравенску и интрааналну апликацију за терапију колитиса изазваног DSS-ом [154]. Да би потврдила локализацију апликованих ћелија, *Sala* и сар. су користили MSC обележене зеленим флуоресцентним протеином (енгл. *green fluorescent protein-GFP*) [153]. Они су показали да мање од 1% интраперитонеално апликованих MSC доспева до ткива колона под запаљењем и да се већина ћелија задржава у абдоминалној дупљи, у којој заједно са другим ћелијама имунског система формирају агломерате из којих секретују имунорегулаторне молекуле и солубилне факторе којима редукују запаљење [153]. Иако интраперитонеална апликација представља адекватнији начин за апликацију ћелија, *Wang* и сар. су изразили забринутост да би повећање количине коришћених MSC повећала смртност мишева који их примају [154]. Иако је у овој студији коришћена веће количина ћелија ( $2 \times 10^6$  дневно апликованих насупрот  $1 \times 10^6$  једнократно 5-ог дана), она није утицала на смртност мишева прималаца. Ниједан миш који је примао MSC није угинуо током експеримента. Ово се вероватно може објаснити подељеном дневном количином ћелија на три дневне дозе.

MSC имају способност да модулирају одговор ћелија имунског система директним међућелијским контактом или секрецијом бројних солубилних фактора. Претходно публиковане студије су показале да су ефекти MSC углавном посредовани смањењем проинфламацијских и повећањем антиинфламацијских цитокина у серуму. Ова студија је показала да апликације MSC значајно смањују продукцију проинфламацијских цитокина IL-1 $\beta$ , IL-12 и IL-6 у серуму, што је у складу са претходно публикованим студијама. али није повећала антиинфламацијске цитокине IL-10 ни PGE2, док је продукција IDO била статистички незначајно повећана. Ови резултати указују да свој терапеутски ефекат MSC

вероватно остварују посредством неког другог не анализираниог цитокина или солубилног фактора.

До сада ниједна публикована студија није широко анализирана утицај MSC на фенотип инфилтришућих ћелија имунског система у *lamina propria* дебелог црева. С обзиром да је позната скоро свака улога свих ћелија имунског система у овом моделу, ова студија је показала ефекте апликација MSC на њихову заступљеност и фенотип. Резултати су показали да су дневно апликоване MSC смањиле инфилтрацију и проинфламацијски фенотип анализираних макрофага, дендритских ћелија, појединих популација NK и NKT ћелија, а истовремено повећале заступљеност антиинфламацијских ћелија. Иако статистички није постојала разлика између популација неутрофила, еозинофила и мастоцита, апликације MSC су смањиле њихово присуство у *lamina propria*, док су повећале заступљеност В лимфоцита и регулаторних В лимфоцита које продукују IL-10. Ови резултати указују да MSC својим модулаторним деловањем на ћелије имунског система у *lamina propria* директно утичу на смањење њиховог патогене и повећање регулаторне активације, чиме се смањује оштећење дебелог црева, али и сам ток и прогресија болести.

Макрофаге, својим присуством и акумулирањем у *lamina propria* имају значајну улогу у патогенези колитиса, утичући на функционалност и интегритет интестиналне баријере [47,168]. Неколико студија је показало да MSC свој терапеутски ефекат остварују деловањем на и кроз макрофаге, њиховом поларизацијом ка алтернативно активираним (M2) фенотипу и даљим њиховим антиинфламацијским деловањима [48,151,152]. Неколико студија [151,152] је показало да тако активирани макрофаге продукују TGF $\beta$ 1 који је главни супресор проинфламацијских активности ћелија имунског система у колону мишева. Значајну улогу TGF $\beta$ 1, кога продукују алтернативно активирани макрофаге, показали су и Wang и сар. [151] који су коришћењем специфичног инхибитора рецептора I за TGF $\beta$ 1 (SB431542) значајно умањили способност MSC да инхибирају продукцију проинфламацијских цитокина IL-17, IL-6, IFN $\gamma$  и TNF $\alpha$  у колону мишева третираних DSS-ом. Liu и сар. [152] су уклањањем макрофага показали да антиинфламацијски ефекат апликованих MSC изостаје и указали да тај позитивни ефекат зависи од макрофага. Они су такође показали да присуство MSC није неопходно за терапеутски ефекат, већ да је довољна апликација TGF $\beta$ 1, којег продукују макрофаге након што их регрутују MSC [152]. У циљу испитивања да ли је терапеутски ефекат MSC заснован искључиво на модулатији макрофага, извршена је деплеција коришћењем липозома који садрже клодронат. Липозоми представљају двослојне фосфолипидне мембранске везикуле, који

служе као носачи („Тројански коњ“) у чијој унутрашњости се налази клодронат, компонента која има способност да изазове „самоубиство“, одн. апоптозу ћелија [169]. Њихов ефекат се заснива на уношењу и разградњи липозома унутар фагоцита, првенствено, макрофага, при чему се унутар ћелије ослобађа клодронат који изазива смрт ћелије [169]. Липозоми који садрже клодронат представљају често коришћено средство за деплецију макрофага [132,169,170]. Овде приказани резултати деплеције макрофага су показали да је степен оштећења дебелог црева, а самим тим и знака колитиса ублажена, док је апликација MSC додано ублажила болест. То указује да MSC свој терапеутски ефекат не остварују искључиво деловањем на макрофаге, већ да је ефекат посредован деловањем и на другим ћелијама имунског система, као што су дендритске ћелије. Разлика у резултатима ове и претходних студија се може објаснити разликама у дизајнима експеримената. Наиме, претходне студије су користиле једнократну апликацију MSC у току експеримента, док су својој студији *Liu* и сар. [152] користили антители конјугована сапорином против CD11b маркера. У овој студији су коришћени липозоми који садрже клодронат, чији се механизам деловања на макрофаге разликује од сапорина и апликоване су веће количине MSC. Такође, неколико студија је показало да антители конјуговано сапорином није специфично само за макрофаге, већ да га неспецифично могу преузети и друге ћелије [171], али и да се деплецијом макрофага на овај начин не погоршава болест [172]. Иако су *Qualls* и сар. [173] интравектално апликовали липозоме који садрже клодронат и показали протективну улогу интраепителних моноцита, одн. да њихова деплеција погоршава болест, разлика у резултатима наведене и ове студије се може објаснити рутама и ефикасношћу апликација (локална ограничена на ректум и десцендентни колон насупрот системске), као и количинама апликованих липозома. Недавно су *Redhu* и сар. [174] показали да апликације липозома у моделу спонтаног колитиса насталог генетском дефицијенцијом за IL-10 деплетирају макрофаге и смањују оштећења колона и продукцију проинфламацијских цитокина, док су *Lim* и сар. [175] показали протективни ефекат деплеције макрофага у запаљењском одговору у колону изазваним димом цигарета.

ДС имају главну улогу у отпочињању и току у многим болестима, тако и у колитису [137,138]. Њихова значајност се огледа у регулисању имунског одговора или појави и одржавању толеранције, стога представљају циљ потенцијалне имунотерапије у многим стањима, како људи тако и животиња [176]. Њихова локализација у *lamina propria* дебелог црева даје им улогу регулатора функционалности и одржавања хомеостазе епитела утицајем различитим механизмима на интестиналне епителне ћелије, ћелије

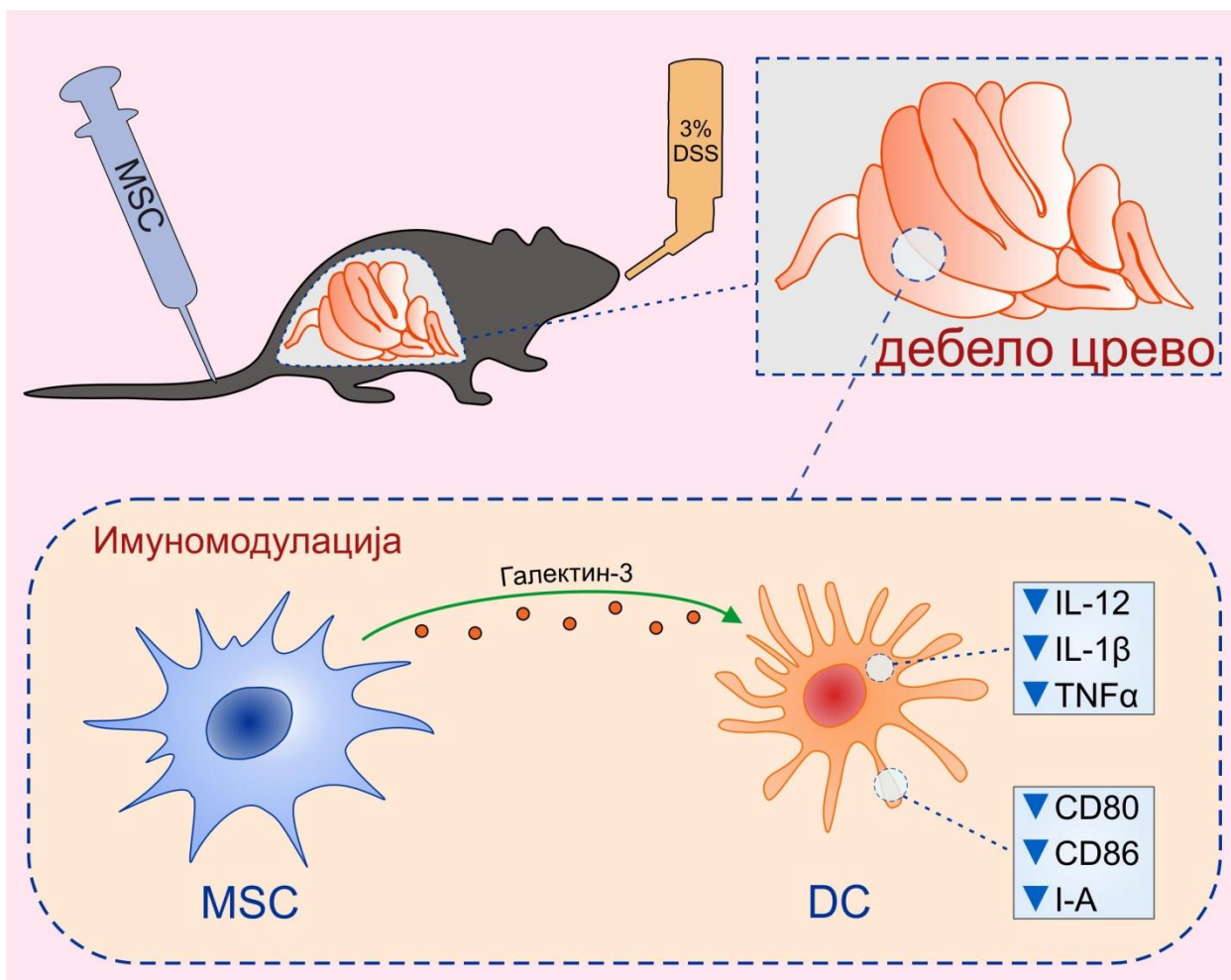
строме и ћелије крви [137]. MSC имају способност модулације функција DC. Начине модулаторних ефеката MSC на DC су показале *in vitro* студије и зависе од подешавања експеримената [177,178]. MSC имају способност да врше супресију DC директним међућелијским контактом и секрецијом бројних цитокина и солубилних фактора [54,167,176–178]. Којим ће механизмом MSC имуномодулирати DC зависи од бројних услова, као што су међусобни однос у култури, степена зрелости DC, дужине култивисања. Висок MSC:DC однос (1:1-10) је неопходан за супресију солубилним фактором/има, док је у ниском односу (>1:10) тај ефекат посредован директним међућелијским контактом [54]. У циљу испитивања механизма којим MSC супримирају функције DC извршена је култивација DC изолованих из слезина здравих мишева у кокултури и у одвојеним коморама (*transwell* систем) у присуству LPS-а, DSS-а, LPS-а и DSS-а. Ова и претходне студије су показале способност супресије продукције проинфламацијских цитокина у присуству LPS и да је тај ефекат значајнији у индиректном контакту посредован секрецијом солубилних фактора. Међутим, ниједна студија до сада није показала супресивни ефекат у присуству DSS-а, стога су даља истраживања усмерена у циљу откривања тих ефеката у паракрином начину. Резултати су показали да MSC у присуству 3%DSS повећавају продукцију HGF, али смањену продукцију IL-10, што указује да је тај супресивни ефекат посредован неким другим солубилним фактором. Истраживањем фенотипа DC на које су MSC деловале солубилним факторима показала је статистички значајну смањену продукцију проинфламацијских цитокина TNF $\alpha$  и IL-6 и експресију CD80, CD86 и MHC молекула II класе. У циљу даљег истраживања посредством којег солубилног фактора MSC остварују тај ефекат, анализирана је продукција Галектина 3 у супернатанту култивисаних ћелија. Галектини представљају велику фамилију лектинских протеина широко распрострањених у животињском царству, коју чине 15 чланова и који су идентификовани као регулатори бројних функција ћелија имунског система [159,179]. Иако немају класичне сигналне путеве и рецепторе за везивање на мембранама, они функционишу путем бројних сигнализација и могу се наћи у свим структурама у ћелији и ван ње [161,179]. Према структури подељени су на три типа: прототип, химера тип и тандем понављајуће галектине [161]. Галектин 3 припада химера типу галектина који формира пентамере у присуству мултивалентних лиганда, а његова способност индукције биолошких функција одређена је бројним унутарћелијским особинама и активацијом гликосилисаних рецептора циљаних ћелија [161,179,180]. Широко је експримиран у ткивима под запаљењем, у којима има значајну улогу у препознавању патогених образаца, у модулацији и развијању



имунског одговора [160]. Експресијом на плаценти, мозгу, репродуктивним органима има улогу у чувању тих органа од оштећења изазваних инфилтришућим Т лимфоцитима [161,162]. Позната је улога Галектина-3 као регулатора активације и функционисања ћелија урођеног и стеченог имунског система у многим болестима [134]. Недавне су неколико студија показале да MSC секретују Галектин 3 помоћу којег инхибирају функције ћелија имунског система и између осталих и дендритских ћелија [159–162]. Утицај Галектина 3 на имуносупресију заснива се на везивању за гликопротеине на мембрани ћелија, што је показано компетитивном инхибицијом  $\beta$  лактозе за те протеине, при чему изостаје инхибиција пролиферације Т лимфоцита [161,162]. Такође, инхибирањем експресије гена за Галектин 3 укида се супресивни ефекат MSC на Т лимфоците [159]. Ефекат MSC на Т лимфоците је посредован директним и/или индиректним деловањем на дендритске ћелије, при чему настају регулаторне дендритске ћелије које индукују стварање толерогених Т лимфоцита [161]. Недавно су *Fermino* и сар. показали да Галектин 3 супримира продукцију IL-12 у DC, као и да смањује продукцију Th1 цитокина и регулише поларизацију помоћничких Т лимфоцита током инфекције [160]. Они су то објаснили високом концентрацијом на месту запаљења, при чему Галектин 3 образује својеврсне решетке, које онемогућавају приступ лиганда рецептору и даљу активацију Notch сигналног пута, што даље резултује супримирањем Th1/Th2 одговора [160]. *Lee* и сар. су показали да као одговор на стимулацију LPS-ом, DC којима је генетски укинута продукција Галектина 3 продукују веће концентрације проинфламацијских цитокина IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-23, при чему је овај ефекат значајнији након стимулације високим концентрацијама LPS-а [181]. Поред тога, они су показали да Галектин 3 негативно регулише поларизацију ка Th17 одговору на стимулацију високом концентрацијом LPS-а, који је уједно и поларизатор Th1 одговора [181]. Уз то посредством Галектина 3 MSC регулишу секрецију проинфламаторних цитокина и експанзију супресорских Т лимфоцита, који продукују IL-10, познатијих као Treg1 ћелије [161]. *Liu* и сар. [159] су показали да је имуносупресивни ефекат MSC значајнији у индиректном у односу на међућелијски контакт. Они су још показали и да је тај ефекат заснован посредством секретованог Галектина 3, а не IL-10, па чак и да TGF $\beta$  и HGF немају никакав утицај и да су непотребни за инхибицију мононуклеарних ћелија периферне крви [159]. Резултати овде приказане студије су показали статистички високо значајно већу продукцију Галектина 3 у *transwell* систему, што указује да је секреција Галектина 3 вероватни механизам посредством којег MSC модулирају функције DC.

Претходне публиковане студије су показале да дендритске ћелије имају дуалну улогу у колитису, у зависности од њихове активације [135,136,138]. У почетној фази акутног колитиса оне имају протективну улогу регулисањем инфилтрације ћелија имунског система и њихових проинфламацијских активности у колону под запаљењем, али кад колитис почне, оне имају патогену улогу због аберантне активације регрутованих имуногених DC, које нису биле изложене супресивном окружењу [135,136,138]. Те студије су показале да пасивни трансфер након почетка модела погоршава болест, док деплеција DC смањује степен оштећења и знаке болести [135,136,138]. Насупрот овоме, деплеција дендритских ћелија пре почетка болести погоршава прогресију болести, повећањем оштећења и знакова болести. С обзиром да MSC имају способност модулације DC, циљ пасивног трансфера *in vivo* стимулираних DSS-ом или DSS-ом и MSC изолованих из слезине био је да се испита да ли тако стимулисане DC задржавају патогену проинфламацијску улогу након трансфера животињама које су већ под запаљењем. Резултати су показали да DC стимулисане само DSS-ом задржавају патогену улогу и погоршавају степен болести, док се након трансфера DC стимулираних DSS-ом и MSC болест значајно смањује, што указује на немогућност да испоље патогену улогу. Ово се огледа статистички значајним смањењем клиничког и хистопатолошког скорa, док је дужина колона била статистички незначајно већа код мишева који су примили DC стимулисане DSS-ом и MSC. Као потврда овог ефекта, анализа продукције проинфламацијских цитокина у серуму мишева који су примили DC стимулираних DSS-ом и MSC је показала статистичко незначајно смањење TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  и IL-12 у односу на мишове који су примили DC стимулираних само DSS-ом. Овај позитиван ефекат MSC на DC указује на могућност модулације болести кориговањем функције и циљањем дендритских ћелија у циљу добијања потенцијалне терапије за лечење колитиса.

Заједно узето, ови резултати снажно указују да су MSC апликоване на овакав начин добар метод за терапију колитиса мишева изазваног декстран натријум сулфатом. Такође, ови резултати указују да MSC свој терапеутски ефекат не остварују искључиво деловањем преко макрофага, већ и деловањем на дендритске ћелије. MSC супримирају функције DC, *in vitro* као и *in vivo* смањењем њиховог проинфламацијског фенотипа и тај ефекат посредован је секрецијом солубилних фактора, вероватно Галектина 3 (Фигура 12).



**Фигура 12. Предложени механизам деловања MSC на DC у моделу колитиса изазваног DSS-ом.**  
 Секретијом Галектина 3, MSC делују на DC смањујући секрецију IL-12, IL-1β и TNFα и експресију CD80, CD86 и I-A маркера.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

Резултати ове студије су показали терапеутски потенцијал MSC из којих се могу извести следећи закључци:

1. Интраперитонеална апликација MSC у експерименталном моделу колитиса значајно ублажава оштећења дебелог црева и знаке колитиса изазваног декстран натријум сулфатом,
2. Интраперитонеално апликоване MSC значајно редукују продукцију проинфламацијских цитокина у серуму оболелих животиња,
3. Мање оштећење дебелог црева резултат је смањеног присуства проинфламацијских макрофага, дендритских ћелија, NK и NKT ћелија, као и већег броја регулаторних ћелија у *lamina propria* дебелог црева,
4. Позитиван ефекат MSC на степен оштећења дебелог црева и знаке колитиса остаје евидентан и након деплеције макрофага, што указује да он није искључиво ограничен деловањем на макрофаге, већ да је посредован ефектима и на осталим ћелијама имунског система,
5. Кључни фактор који продукују MSC и чијом активношћу се модулише фенотип и функције дендритских ћелија је Галектин 3. Галектин 3 на паракрини начин умањује продукцију проинфламацијских цитокина и експресију костимулаторних молекула на дендритским ћелијама,
6. Интраперитонеално апликоване MSC модулишу функцију и фенотип дендритских ћелија *in vivo*. Након пасивног трансфера дендритских ћелија изолованих из мишева који су били на третману DSS-а и којима су апликоване MSC детектовано је значајно мање оштећење дебелог црева.

## 7. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Casiraghi F, Perico N, Remuzzi G. 2018 Mesenchymal stromal cells for tolerance induction in organ transplantation. *Hum. Immunol.* **79**, 304-313. (doi:10.1016/j.humimm.2017.12.008)
2. Caplan AI, Correa D. 2011 The MSC: An injury drugstore. *Cell Stem Cell* **9**, 11–15. (doi:10.1016/j.stem.2011.06.008)
3. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova K V. 1966 Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **16**, 381–90.
4. Bourin P, Gadelorge M, Peyrafitte J-A, Fleury-Cappellesso S, Gomez M, Rage C, Sensebé L. 2008 Mesenchymal Progenitor Cells: Tissue Origin, Isolation and Culture. *Transfus. Med. Hemother.* **35**, 160–167. (doi:10.1159/000124734)
5. Caplan A. 1991 Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **9**, 641–50. (doi:10.1002/jor.1100090504)
6. Caplan AI, Dennis JE. 2006 Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* **98**, 1076–1084. (doi:10.1002/jcb.20886)
7. Vater C, Kasten P, Stiehler M. 2011 Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater.* **7**, 463–477. (doi:10.1016/j.actbio.2010.07.037)
8. Augello A, Kurth TB, de Bari C. 2010 Mesenchymal stem cells: A perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur. Cells Mater.* **20**, 121–133. (doi:10.22203/eCM.v020a11)
9. Baglio SR, Pegtel DM, Baldini N. 2012 Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Front. Physiol.* **3**, 359. (doi:10.3389/fphys.2012.00359)
10. Gebler A, Zabel O, Seliger B. 2012 The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol. Med.* **18**, 128–134. (doi:10.1016/j.molmed.2011.10.004)
11. Crisan M *et al.* 2008 A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301–313. (doi:10.1016/j.stem.2008.07.003)
12. Caplan AI. 2017 New MSC: MSCs as pericytes are Sentinels and gatekeepers. *J. Orthop. Res.* **35**, 1151–1159. (doi:10.1002/jor.23560)
13. Caplan AI. 2008 All MSCs Are Pericytes? *Cell Stem Cell* **3**, 229–230. (doi:10.1016/j.stem.2008.08.008)
14. Trento C, Marigo I, Pievani A, Galleu A, Dolcetti L, Wang C-Y, Serafini M, Bronte V, Dazzi F. 2017 Bone marrow mesenchymal stromal cells induce nitric oxide synthase-

- dependent differentiation of CD11b+ cells that expedite hematopoietic recovery. *Haematologica* **102**, 818-825. (doi:10.3324/haematol.2016.155390)
15. Chen Y, Shao J-Z, Xiang L-X, Dong X-J, Zhang G-R. 2008 Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 815–820. (doi:10.1016/j.biocel.2008.01.007)
  16. Kfoury Y, Scadden DT. 2015 Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell Stem Cell* **16**, 239–253. (doi:10.1016/j.stem.2015.02.019)
  17. Ozawa K *et al.* 2008 Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J. Autoimmun.* **30**, 121–127. (doi:10.1016/j.jaut.2007.12.008)
  18. Roda B *et al.* 2009 A tag-less method of sorting stem cells from clinical specimens and separating mesenchymal from epithelial progenitor cells. *Cytom. Part B Clin. Cytom.* **76**, 285–290. (doi:10.1002/cyto.b.20472)
  19. Shi Y *et al.* 2010 Mesenchymal stem cells: A new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res.* **20**, 510–518. (doi:10.1038/cr.2010.44)
  20. Prockop DJ. 2016 Inflammation, fibrosis, and modulation of the process by mesenchymal stem/stromal cells. *Matrix Biol.* **51**, 7–13. (doi:10.1016/j.matbio.2016.01.010)
  21. Ciuffi S, Zonefrati R, Brandi ML. 2017 Adipose stem cells for bone tissue repair. *Clin. Cases Miner. Bone Metab.* **14**, 217-226. (doi:10.11138/ccmbm/2017.14.1.217)
  22. Caplan AI, Sorrell JM. 2015 The MSC curtain that stops the immune system. *Immunol. Lett.* **168**, 136–139. (doi:10.1016/j.imlet.2015.06.005)
  23. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. 2014 Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat. Immunol.* **15**, 1009–1016. (doi:10.1038/ni.3002)
  24. Dominici M *et al.* 2006 Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317. (doi:10.1080/14653240600855905)
  25. Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. 2017 Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytom. Part A* , 19–31. (doi:10.1002/cyto.a.23242)
  26. Carrade DD, Borjesson DL. 2013 Immunomodulation by mesenchymal stem cells in veterinary species. *Comp. Med.* **63**, 207–217.
  27. Gimble JM, Guilak F, Nuttall ME, Sathishkumar S, Vidal M, Bunnell BA. 2008 In vitro differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Transfus. Med. Hemotherapy* **35**, 228–238. (doi:10.1159/000124281)

28. Steward AJ, Kelly DJ. 2015 Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J. Anat.* **227**, 717–731. (doi:10.1111/joa.12243)
29. Wang Y-K, Chen CS. 2013 Cell adhesion and mechanical stimulation in the regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J. Cell. Mol. Med.* **17**, 823–832. (doi:10.1111/jcmm.12061)
30. DiMarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. 2013 Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front. Immunol.* **4**, 201. (doi:10.3389/fimmu.2013.00201)
31. Al Ghrbawy NM, Afify RAAM, Dyaa N, El Sayed AA. 2016 Differentiation of Bone Marrow: Derived Mesenchymal Stem Cells into Hepatocyte-like Cells. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* **32**, 276–283. (doi:10.1007/s12288-015-0581-7)
32. Sawitza I, Kordes C, Götze S, Herebian D, Haussinger D. 2015 Bile acids induce hepatic differentiation of mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* **5**, 13320. (doi:10.1038/srep13320)
33. Samsonraj RM, Raghunath M, Nurcombe V, Hui JH, van Wijnen AJ, Cool SM. 2017 Concise Review: Multifaceted Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells for Use in Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl. Med.* **6**, 2173–2185. (doi:10.1002/sctm.17-0129)
34. Wang B, Li W, Dean D, Mishra MK, Wekesa KS. 2018 Enhanced hepatogenic differentiation of bone marrow derived mesenchymal stem cells on liver ECM hydrogel. *J. Biomed. Mater. Res. A.* **106**, 829–838. (doi:10.1002/jbm.a.36278)
35. Karp JM, Leng Teo GS. 2009 Mesenchymal Stem Cell Homing: The Devil Is in the Details. *Cell Stem Cell* **4**, 206–216. (doi:10.1016/j.stem.2009.02.001)
36. Law S, Chaudhuri S. 2013 Mesenchymal stem cell and regenerative medicine: regeneration versus immunomodulatory challenges. *Am. J. Stem Cells* **2**, 22–38.
37. Uccelli A, Pistoia V, Moretta L. 2007 Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends Immunol.* **28**, 219–226. (doi:10.1016/j.it.2007.03.001)
38. Oggu GS, Sasikumar S, Reddy N, Ella KKR, Rao CM, Bokara KK. 2017 Gene Delivery Approaches for Mesenchymal Stem Cell Therapy: Strategies to Increase Efficiency and Specificity. *Stem Cell Rev.* **13**, 725–740. (doi:10.1007/s12015-017-9760-2)
39. da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. 2008 In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* **26**, 2287–2299. (doi:10.1634/stemcells.2007-1122)
40. Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, Gupta N, Serikov V, Lee J-W, Matthay MA. 2012 Antibacterial Effect of Human Mesenchymal Stem Cells Is Mediated in Part from Secretion of the Antimicrobial Peptide LL-37. *Stem Cells* **28**, 2229–2238. (doi:10.1002/stem.544)

41. Caplan AI. 2010 What's in a name? *Tissue Eng. Part A* **16**, 2415–2417. (doi:10.1089/ten.TEA.2010.0216)
42. Soleymaninejadian E, Pramanik K, Samadian E. 2012 Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: Cytokines and factors. *Am. J. Reprod. Immunol.* **67**, 1–8. (doi:10.1111/j.1600-0897.2011.01069.x)
43. Fontaine MJ, Shih H, Schäfer R, Pittenger MF. 2016 Unraveling the Mesenchymal Stromal Cells' Paracrine Immunomodulatory Effects. *Transfus. Med. Rev.* **30**, 37–43. (doi:10.1016/j.tmr.v.2015.11.004)
44. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. 2014 Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* **21**, 216–225. (doi:10.1038/cdd.2013.158)
45. Coulson-Thomas VJ, Coulson-Thomas YM, Gesteira TF, Kao WWY. 2016 Extrinsic and Intrinsic Mechanisms by Which Mesenchymal Stem Cells Suppress the Immune System. *Ocul. Surf.* **14**, 121–134. (doi:10.1016/j.jtos.2015.11.004)
46. Maria Spaggiari G, Moretta L. 2013 Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity. *Immunol. Cell Biol.* **91**, 27–31. (doi:10.1038/icb.2012.62)
47. Mao F, Kang J-J, Cai X, Ding N-F, Wu Y-B, Yan Y-M, Qian H, Zhang X, Xu W-R. 2017 Crosstalk between mesenchymal stem cells and macrophages in inflammatory bowel disease and associated colorectal cancer. *Contemp Oncol (Pozn)* **21**, 91–97. (doi:10.5114/wo.2017.68616)
48. Simovic Markovic B, Nikolic A, Gazdic M, Nurkovic J, Djordjevic I, Arsenijevic N, Stojkovic M, Lukic ML, Volarevic V. 2016 Pharmacological Inhibition of Gal-3 in Mesenchymal Stem Cells Enhances Their Capacity to Promote Alternative Activation of Macrophages in Dextran Sulphate Sodium-Induced Colitis. *Stem Cells Int.* **2016**, 2640746. (doi:10.1155/2016/2640746)
49. Carty F, Mahon BP, English K. 2017 The influence of macrophages on mesenchymal stromal cell therapy: Passive or aggressive agents. *Clin. Exp. Immunol.* **188**, 1–11. (doi:10.1111/cei.12929)
50. Cheung TS, Dazzi F. 2018 Mesenchymal-myeloid interaction in the regulation of immunity. *Semin. Immunol.* **35**, 59–68. (doi:10.1016/j.smim.2018.01.002)
51. Bifari F, Lisi V, Mimiola E, Pasini A, Krampera M. 2008 Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Transfus. Med. Hemotherapy* **35**, 194–204. (doi:10.1159/000128968)
52. Yi T, Song SU. 2012 Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch. Pharm. Res.* **35**, 213–221. (doi:10.1007/s12272-012-0202-



z)

53. Shi M, Liu ZW, Wang FS. 2011 Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Immunol.* **164**, 1–8. (doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04327.x)
54. Đokić JM, Tomić SZ, Čolić MJ. 2016 Cross-Talk Between Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Dendritic Cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **11**, 51–65. (doi:10.2174/1574888X10666150904114035)
55. Ménard C, Tarte K. 2013 Immunoregulatory properties of clinical grade mesenchymal stromal cells: Evidence, uncertainties, and clinical application. *Stem Cell Res. Ther.* **4**, 64. (doi:10.1186/scrt214)
56. Jung S, Panchalingam KM, Rosenberg L, Behie LA. 2012 Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells in defined serum-free media. *Stem Cells Int.* **2012**, 123030. (doi:10.1155/2012/123030)
57. Cihova M, Altanerova V, Altaner C. 2011 Stem cell based cancer gene therapy. *Mol. Pharm.* **8**, 1480–1487. (doi:10.1021/mp200151a)
58. Wang S, Qu X, Zhao R. 2012 Clinical applications of mesenchymal stem cells. *J. Hematol. Oncol.* **5**, 19. (doi:10.1186/1756-8722-5-19)
59. ClinicalTrials.gov.  
<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=mesechymal+stem+cell&term=&cntry=&state=&city=&dist=> (accessed on 9 February 2018).
60. Caplan AI. 2015 Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How. *Stem Cells Int.* **2015**, 628767. (doi:10.1155/2015/628767)
61. Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. 2001 The Dynamic in vivo Distribution of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells after Infusion. *Cells Tissues Organs* **169**, 12–20. (doi: 10.1159/000047856)
62. Ye Y, Pang Z, Chen W, Ju S, Zhou C. 2015 The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 22529–22542.
63. Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. 2012 Ulcerative colitis. *Lancet (London, England)* **380**, 1606–1619. (doi:10.1016/S0140-6736(12)60150-0)
64. Danese S, Fiocchi C. 2011 Ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 1713–25. (doi:10.1056/NEJMra1102942)
65. Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. 2009 Biological Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **136**, 1182–1197. (doi:10.1053/j.gastro.2009.02.001)
66. Nikolaus S, Schreiber S. 2007 Diagnostics of inflammatory bowel disease.

- Gastroenterology* **133**, 1670–1689. (doi:10.1053/j.gastro.2007.09.001)
67. Pardi DS, Kelly CP. 2011 Microscopic colitis. *Gastroenterology* **140**, 1155–1165. (doi:10.1053/j.gastro.2011.02.003)
68. Münch A *et al.* 2012 Microscopic colitis: Current status, present and future challenges: Statements of the European Microscopic Colitis Group. *J. Crohn's Colitis* **6**, 932–945. (doi:10.1016/j.crohns.2012.05.014)
69. Iskandar HN, Ciorba MA. 2012 Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. *Transl. Res.* **159**, 313–325. (doi:10.1016/j.trsl.2012.01.001)
70. Gracie DJ, Ford AC. 2015 IBS-like symptoms in patients with ulcerative colitis. *Clin. Exp. Gastroenterol.* **8**, 101–109. (doi:10.2147/CEG.S58153)
71. Peyrin-Biroulet L, Panés J, Sandborn WJ, Vermeire S, Danese S, Feagan BG, Colombel J-F, Hanauer SB, Rycroft B. 2016 Defining Disease Severity in Inflammatory Bowel Diseases: Current and Future Directions. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **14**, 348–354.e17. (doi:10.1016/j.cgh.2015.06.001)
72. Schroeder KW, Tremaine WJ, Ilstrup DM. 1987 Coated Oral 5-Aminosalicylic Acid Therapy for Mildly to Moderately Active Ulcerative Colitis. *N. Engl. J. Med.* **317**, 1625–1629. (doi:10.1056/NEJM198712243172603)
73. Sutherland LR, Martin F. 1987 5-Aminosalicylic acid enemas in treatment of distal ulcerative colitis and proctitis in Canada. *Dig. Dis. Sci.* **32**, S64–S66. (doi:10.1007/BF01312466)
74. Lewis JD. 2011 The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **140**, 1817–1826. (doi:10.1053/j.gastro.2010.11.058)
75. Travis SPL *et al.* 2015 The impact of clinical information on the assessment of endoscopic activity: Characteristics of the ulcerative colitis endoscopic index of severity [UCEIS]. *J. Crohn's Colitis* **9**, 607–616. (doi:10.1093/ecco-jcc/jjv077)
76. Argollo M, Fiorino G, Hindryckx P, Peyrin-Biroulet L, Danese S. 2017 Novel therapeutic targets for inflammatory bowel disease. *J. Autoimmun.* **85**, 103–116. (doi:10.1016/j.jaut.2017.07.004)
77. Khor B, Gardet A, Xavier RJ. 2011 Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **474**, 307–317. (doi:10.1038/nature10209)
78. Molodecky NA *et al.* 2012 Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* **142**, 46–54.e42. (doi:10.1053/j.gastro.2011.10.001)
79. Di Sabatino A, Biancheri P, Rovedatti L, MacDonald TT, Corazza GR. 2012 Recent

- advances in understanding ulcerative colitis. *Intern. Emerg. Med.* **7**, 103–111. (doi:10.1007/s11739-011-0719-z)
80. Santos MPC, Gomes C, Torres J. 2018 Familial and ethnic risk in inflammatory bowel disease. *Ann. Gastroenterol.* **31**, 14–23. (doi:10.20524/aog.2017.0208)
  81. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, van den Brandt PA, Stobberingh EE. 2006 Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* **118**, 511–521. (doi:10.1542/peds.2005-2824)
  82. Koloski NA, Bret L, Radford-Smith G. 2008 Hygiene hypothesis in inflammatory bowel disease: A critical review of the literature. *World J. Gastroenterol.* **14**, 165–173. (doi:10.3748/wjg.14.165)
  83. Strachan DP. 1989 Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* **299**, 1259–1260. (doi:10.1136/bmj.299.6710.1259)
  84. Sheikh A, Strachan DP. 2004 The hygiene theory: fact or fiction? *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **12**, 232–236. (doi:10.1097/01.moo.0000122311.13359.30)
  85. Burke KE, Boumitri C, Ananthakrishnan AN. 2017 Modifiable Environmental Factors in Inflammatory Bowel Disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **19**, 21 (doi:10.1007/s11894-017-0562-0)
  86. Kuenzig ME, Lee SM, Eksteen B, Seow CH, Barnabe C, Panaccione R, Kaplan GG. 2016 Smoking influences the need for surgery in patients with the inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis incorporating disease duration. *BMC Gastroenterol.* **16**, 143. (doi:10.1186/s12876-016-0555-8)
  87. Radford-Smith GL, Edwards JE, Purdie DM, Pandeya N, Watson M, Martin NG, Green A, Newman B, Florin THJ. 2002 Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* **51**, 808–813. (doi:10.1136/gut.51.6.808)
  88. Parian A *et al.* 2017 Appendectomy does not decrease the risk of future colectomy in UC: results from a large cohort and meta-analysis. *Gut* **66**, 1390–1397. (doi:10.1136/gutjnl-2016-311550)
  89. Shivashankar R, Lewis JD. 2017 The Role of Diet in Inflammatory Bowel Disease. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **19**, 22. (doi:10.1007/s11894-017-0563-z)
  90. Ananthakrishnan AN *et al.* 2013 A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gastroenterology* **145**, 970–977. (doi:10.1053/j.gastro.2013.07.050)
  91. van der Logt EMJ, Blokzijl T, van der Meer R, Faber KN, Dijkstra G. 2013 Westernized high-fat diet accelerates weight loss in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice,

- which is further aggravated by supplementation of heme. *J. Nutr. Biochem.* **24**, 1159–1165. (doi:10.1016/j.jnutbio.2012.09.001)
92. Cheng L *et al.* 2016 High fat diet exacerbates dextran sulfate sodium induced colitis through disturbing mucosal dendritic cell homeostasis. *Int. Immunopharmacol.* **40**, 1–10. (doi:10.1016/j.intimp.2016.08.018)
  93. Sgambato D, Miranda A, Ranaldo R, Federico A, Romano M. 2017 The Role of Stress in Inflammatory Bowel Diseases. *Curr. Pharm. Des.* **23**, 3997–4002. (doi:10.2174/1381612823666170228123357)
  94. Bonaz BL, Bernstein CN. 2013 Brain-gut interactions in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **144**, 36–49. (doi:10.1053/j.gastro.2012.10.003)
  95. Danese S, Fiocchi C. 2016 Endothelial Cell-Immune Cell Interaction in IBD. *Dig. Dis.* **34**, 43–50. (doi:10.1159/000442925)
  96. Rogler G, Andus T. 1998 Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J. Surg.* **22**, 382–389. (doi:10.1016/S0950-3528(96)90045-7)
  97. Koliaraki V, Pallangyo CK, Greten FR, Kollias G. 2017 Mesenchymal Cells in Colon Cancer. *Gastroenterology* **152**, 964–979. (doi:10.1053/j.gastro.2016.11.049)
  98. Kurashima Y, Yamamoto D, Nelson S, Uematsu S, Ernst PB, Nakayama T, Kiyono H. 2017 Mucosal mesenchymal cells: Secondary barrier and peripheral educator for the gut immune system. *Front. Immunol.* **8**, 1787. (doi:10.3389/fimmu.2017.01787)
  99. Blumberg RS, Saubermann LJ, Strober W. 1999 Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease. *Curr. Opin. Immunol.* **11**, 648–656. (doi:10.1016/S0952-7915(99)00032-1)
  100. Lampinen M, Backman M, Winqvist O, Rorsman F, Rönnblom A, Sangfelt P, Carlson M. 2008 Different regulation of eosinophil activity in Crohn's disease compared with ulcerative colitis. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 1392–1399. (doi:10.1189/jlb.0807513)
  101. D'Alessio S, Tacconi C, Danese S. 2015 Targeting lymphatics in inflammatory bowel disease. *Oncotarget* **6**, 34047–34048. (doi:10.18632/oncotarget.6026)
  102. Eaton JE, Talwalkar JA, Lazaridis KN, Gores GJ, Lindor KD. 2013 Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and advances in diagnosis and management. *Gastroenterology* **145**, 521–536. (doi:10.1053/j.gastro.2013.06.052)
  103. Langholz E, Munkholm P, Davidsen M, Binder V. 1992 Colorectal cancer risk and mortality in patients with ulcerative colitis. *Gastroenterology* **103**, 1444–1451. (doi:10.1016/0016-5085(92)91163-X)
  104. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. 2014 Dextran Sulfate Sodium

- (DSS)-Induced Colitis in Mice. In *Current Protocols in Immunology*, p. 15.25.1-15.25.14. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. (doi:10.1002/0471142735.im1525s104)
105. Goyal N, Rana A, Ahlawat A, Bijjem KR V., Kumar P. 2014 Animal models of inflammatory bowel disease: A review. *Inflammopharmacology* **22**, 219–233. (doi:10.1007/s10787-014-0207-y)
  106. Jurjus AR, Khoury NN, Reimund J-M. 2004 Animal models of inflammatory bowel disease. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **50**, 81–92. (doi:10.1016/j.vascn.2003.12.002)
  107. Randhawa PK, Singh K, Singh N, Jaggi AS. 2014 A review on chemical-induced inflammatory bowel disease models in rodents. *Korean J. Physiol. Pharmacol.* **18**, 279–288. (doi:10.4196/kjpp.2014.18.4.279)
  108. Perše M, Cerar A. 2012 Dextran sodium sulphate colitis mouse model: Traps and tricks. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, 718617. (doi:10.1155/2012/718617)
  109. Borm MEA, Bouma G. 2004 Animal models of inflammatory bowel disease. *Drug Discov. Today Dis. Model.* **1**, 437–443. (doi:10.1016/j.ddmod.2004.11.019)
  110. Low D, Nguyen DD, Mizoguchi E. 2013 Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. *Drug Des. Devel. Ther.* **7**, 1341–1357. (doi:10.2147/DDDT.S40107)
  111. Chinnadurai R, Ng S, Velu V, Galipeau J. 2015 Challenges in animal modelling of mesenchymal stromal cell therapy for inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **21**, 4779–4787. (doi:10.3748/wjg.v21.i16.4779)
  112. Gaudio E, Taddei G, Vetusch A, Sferra R, Frieri G, Ricciardi G, Caprilli R. 1999 Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: Clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig. Dis. Sci.* **44**, 1458–1475. (doi:10.1023/A:1026620322859)
  113. Valatas V, Bamias G, Kolios G. 2015 Experimental colitis models: Insights into the pathogenesis of inflammatory bowel disease and translational issues. *Eur. J. Pharmacol.* **759**, 253–264. (doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.017)
  114. Allocca M, Fiorino G, Gilardi D, Preatoni P, Papa A, Peyrin-Biroulet L, Danese S. 2018 Biologic therapies in ulcerative colitis: primi inter pares? *Curr. Drug Targets* **19**, 748-756. (doi:10.2174/1389450117666160527142719)
  115. Panaccione R *et al.* 2014 Combination therapy with infliximab and azathioprine is superior to monotherapy with either agent in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **146**, 392–400.e3. (doi:10.1053/j.gastro.2013.10.052)
  116. Bodammer P, Zirzow E, Klammt S, Maletzki C, Kerkhoff C. 2013 Alteration of DSS-mediated immune cell redistribution in murine colitis by oral colostral immunoglobulin.

- BMC Immunol.* **14**, 10. (doi:10.1186/1471-2172-14-10)
117. Dassopoulos T, Cohen RD, Scherl EJ, Schwartz RM, Kosinski L, Regueiro MD. 2015 Ulcerative Colitis Care Pathway. *Gastroenterology* **149**, 238–245. (doi:10.1053/j.gastro.2015.05.036)
  118. Torres J, Danese S, Colombel J-F. 2013 New therapeutic avenues in ulcerative colitis: thinking out of the box. *Gut* **62**, 1642–1652. (doi:10.1136/gutjnl-2012-303959)
  119. Khan WI, Blennerhasset PA, Varghese AK, Chowdhury SK, Omsted P, Deng Y, Collins SM. 2002 Intestinal Nematode Infection Ameliorates Experimental Colitis in Mice. *Infect. Immun.* **70**, 5931–5937. (doi:10.1128/IAI.70.11.5931-5937.2002)
  120. Lee HJ *et al.* 2016 Long-Term Effects of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Chronic Colitis. *Gut Liver* **10**, 412–419. (doi:10.5009/gnl15229)
  121. Ohkusa T. 1985 [Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi* **82**, 1327–1336.
  122. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. 1990 A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* **98**, 694–702. (doi:S0016508590000725 [pii])
  123. Solomon L, Mansor S, Mallon P, Donnelly E, Hoper M, Loughrey M, Kirk S, Gardiner K. 2010 The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: An overview. *Comp. Clin. Path.* **19**, 235–239. (doi:10.1007/s00580-010-0979-4)
  124. Araki Y *et al.* 2012 Dextran sulfate sodium administered orally is depolymerized in the stomach and induces cell cycle arrest plus apoptosis in the colon in early mouse colitis. *Oncol. Rep.* **28**, 1597–1605. (doi:10.3892/or.2012.1969)
  125. Okayasu I, Yamada M, Mikami T, Yoshida T, Kanno J, Ohkusa T. 2002 Dysplasia and carcinoma development in a repeated dextran sulfate sodium-induced colitis model. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 1078–1083. (doi:10.1046/j.1440-1746.2002.02853.x)
  126. Johansson ME V, Gustafsson JK, Sjöberg KE, Petersson J, Holm L, Sjövall H, Hansson GC. 2010 Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PLoS One* **5**, e12238. (doi:10.1371/journal.pone.0012238)
  127. Mähler M, Bristol IJ, Leiter EH, Workman AE, Birkenmeier EH, Elson CO, Sundberg JP. 1998 Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am. J. Physiol.* **274**, G544–551.
  128. Barnett M, Fraser A. 2011 Animal Models of Colitis: Lessons Learned, and Their

- Relevance to the Clinic. *Ulcerative Colitis-Treat. Spec. Popul. Futur.* 161–178. (doi:10.5772/27431)
129. Laroui H *et al.* 2012 Dextran sodium sulfate (dss) induces colitis in mice by forming nano-lipocomplexes with medium-chain-length fatty acids in the colon. *PLoS One* **7**, e32084. (doi:10.1371/journal.pone.0032084)
130. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. 2000 Histological Analysis of Murine Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium of Different Molecular Weights. *Exp. Anim* **49**, 9–15. (doi:doi.org/10.1538/expanim.49.9)
131. Tokieda S, Komori M, Ishiguro T, Iwakura Y, Takahara K, Inaba K. 2015 Dendritic cell immunoreceptor 1 alters neutrophil responses in the development of experimental colitis. *BMC Immunol.* **16**, 64. (doi:10.1186/s12865-015-0129-5)
132. Weisser SB, van Rooijen N, Sly LM. 2012 Depletion and Reconstitution of Macrophages in Mice. *J. Vis. Exp.* 4105. (doi:10.3791/4105)
133. Hisamatsu T, Kanai T, Mikami Y, Yoneno K, Matsuoka K, Hibi T. 2013 Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacol. Ther.* **137**, 283–297. (doi:10.1016/j.pharmthera.2012.10.008)
134. Simovic Markovic B *et al.* 2016 Galectin-3 plays an important pro-inflammatory role in the induction phase of acute colitis by promoting activation of NLRP3 inflammasome and production of IL-1 $\beta$  in macrophages. *J. Crohn's Colitis* **10**, 593–606. (doi:10.1093/ecco-jcc/jjw013)
135. Qualls JE, Tuna H, Kaplan AM, Cohen DA. 2009 Suppression of experimental colitis in mice by CD11c+ dendritic cells. *Inflamm. Bowel Dis.* **15**, 236–247. (doi:10.1002/ibd.20733)
136. Berndt BE, Zhang M, Chen G-H, Huffnagle GB, Kao JY. 2007 The Role of Dendritic Cells in the Development of Acute Dextran Sulfate Sodium Colitis. *J. Immunol.* **179**, 6255–6262. (doi:10.4049/jimmunol.179.9.6255)
137. Abe K *et al.* 2007 Conventional dendritic cells regulate the outcome of colonic inflammation independently of T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 17022–17027. (doi:10.1073/pnas.0708469104)
138. Rescigno M, Di Sabatino A. 2009 Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J. Clin. Invest.* **119**, 2441–2450. (doi:10.1172/JCI39134)
139. Rutella S, Locatelli F. 2011 Intestinal dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **17**, 3761–3775. (doi:10.3748/wjg.v17.i33.3761)
140. Zou Z, Zuo D, Yang J, Fan H. 2016 The ANXA1 released from intestinal epithelial cells

- alleviate DSS-induced colitis by improving NKG2A expression of Natural Killer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **478**, 213–220. (doi:10.1016/j.bbrc.2016.07.066)
141. Hall LJ, Murphy CT, Quinlan A, Hurley G, Shanahan F, Nally K, Melgar S. 2013 Natural killer cells protect mice from DSS-induced colitis by regulating neutrophil function via the NKG2A receptor. *Mucosal Immunol.* **6**, 1016–1026. (doi:10.1038/mi.2012.140)
  142. Katsurada T *et al.* 2012 Decrease of Peripheral and Intestinal NKG2A-Positive T Cells in Patients with Ulcerative Colitis. *PLoS One* **7**, e44113. (doi:10.1371/journal.pone.0044113)
  143. Huang E, Liu R, Lu Z, Liu J, Liu X, Zhang D, Chu Y. 2016 NKT cells mediate the recruitment of neutrophils by stimulating epithelial chemokine secretion during colitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **474**, 252–258. (doi:10.1016/j.bbrc.2016.04.024)
  144. Sagami S *et al.* 2017 Choline deficiency causes colonic type II natural killer T (NKT) cell loss and alleviates murine colitis under type I NKT cell deficiency. *PLoS One* **12**, e0169681. (doi:10.1371/journal.pone.0169681)
  145. Liao CM, Zimmer MI, Wang CR. 2013 The functions of type I and Type II Natural Killer T cells in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* **19**, 1330–1338. (doi:10.1097/MIB.0b013e318280b1e3)
  146. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. 1999 Tissue distribution of dextran sulfate sodium (DSS) in the acute phase of murine DSS-induced colitis. *J. Vet. Med. Sci.* **61**, 67–70.
  147. Duijvestein M *et al.* 2011 Pretreatment with interferon- $\gamma$  enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis. *Stem Cells* **29**, 1549–1558. (doi:10.1002/stem.698)
  148. Chen Y, Song Y, Miao H, Xu Y, Lv M, Wang T, Hou Y. 2015 Gene delivery with IFN- $\gamma$ -expression plasmids enhances the therapeutic effects of MSCs on DSS-induced mouse colitis. *Inflamm. Res.* **64**, 671–681. (doi:10.1007/s00011-015-0845-6)
  149. Fan H, Zhao G, Liu L, Liu F, Gong W, Liu X, Yang L, Wang J, Hou Y. 2012 Pre-treatment with IL-1 $\beta$  enhances the efficacy of MSC transplantation in DSS-induced colitis. *Cell. Mol. Immunol.* **9**, 473–481. (doi:10.1038/cmi.2012.40)
  150. Gonzalez-Rey E, Delgado M. 2014 Therapeutic Application of Mesenchymal Stromal Cells in Murine Models of Inflammatory Bowel Disease. *Methods Mol. Biol.* **1213**, 331–339. (doi:10.1007/978-1-4939-1453-1\_27)
  151. Wang C, Chen J, Sun L, Liu Y. 2014 TGF-beta signaling-dependent alleviation of dextran sulfate sodium-induced colitis by mesenchymal stem cell transplantation. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 4977–4983. (doi:10.1007/s11033-014-3364-6)



152. Liu W, Zhang S, Gu S, Sang L, Dai C. 2015 Mesenchymal stem cells recruit macrophages to alleviate experimental colitis through TGFβ1. *Cell. Physiol. Biochem.* **35**, 858–865. (doi:10.1159/000369743)
153. Sala E *et al.* 2015 Mesenchymal Stem Cells Reduce Colitis in Mice via Release of TSG6, Independently of Their Localization to the Intestine. *Gastroenterology* **149**, 163–176. (doi:10.1053/j.gastro.2015.03.013)
154. Wang M *et al.* 2016 Intraperitoneal injection (IP), Intravenous injection (IV) or anal injection (AI)? Best way for mesenchymal stem cells transplantation for colitis. *Sci. Rep.* **6**, 30696. (doi:10.1038/srep30696)
155. BD.Biosciences. Kit Manual BD Cytofix / Cytoperm™ Plus Fixation / Permeabilization Kit (with BD GolgiPlug™ protein transport inhibitor containing brefeldin A) [http://wwwbdbiosciences.com/ds/ab/others/554714\\_554715\\_555028\\_Book\\_Website.pdf](http://wwwbdbiosciences.com/ds/ab/others/554714_554715_555028_Book_Website.pdf).
156. Yanaba K, Yoshizaki A, Asano Y, Kadono T, Tedder TF, Sato S. 2011 IL-10-producing regulatory B10 cells inhibit intestinal injury in a mouse model. *Am. J. Pathol.* **178**, 735–743. (doi:10.1016/j.ajpath.2010.10.022)
157. Maseda D, Candando KM, Smith SH, Kalampokis I, Weaver CT, Plevy SE, Poe JC, Tedder TF. 2013 Peritoneal Cavity Regulatory B Cells (B10 Cells) Modulate IFN-γ+CD4+ T Cell Numbers during Colitis Development in Mice. *J. Immunol.* **191**, 2780–2795. (doi:10.4049/jimmunol.1300649)
158. Ray A, Dittel B. 2017 Mechanisms of Regulatory B cell Function in Autoimmune and Inflammatory Diseases beyond IL-10. *J. Clin. Med.* **6**, 12. (doi:10.3390/jcm6010012)
159. Liu GY, Xu Y, Li Y, Wang LH, Liu YJ, Zhu D. 2013 Secreted galectin-3 as a possible biomarker for the immunomodulatory potential of human umbilical cord mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **15**, 1208–1217. (doi:10.1016/j.jcyt.2013.05.011)
160. Fermino ML, Dylon LSD, Cecílio NT, Santos SN, Toscano MA, Dias-Baruffi M, Roque-Barreira MC, Rabinovich GA, Bernardes ES. 2016 Lack of galectin-3 increases Jagged1/Notch activation in bone marrow-derived dendritic cells and promotes dysregulation of T helper cell polarization. *Mol. Immunol.* **76**, 22–34. (doi:10.1016/j.molimm.2016.06.005)
161. Sioud M. 2011 New Insights into Mesenchymal Stromal Cell-Mediated T-Cell Suppression Through Galectins. *Scand. J. Immunol.* **73**, 79–84. (doi:10.1111/j.1365-3083.2010.02491.x)
162. Sioud M, Mobergslien A, Boudabous A, Fløisand Y. 2011 Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins. *Int. J. Oncol.* **38**, 385–390.

- (doi:10.3892/ijo.2010.869)
163. Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. 2014 Mesenchymal stem cells: Immune evasive, not immune privileged. *Nat. Biotechnol.* **32**, 252–260. (doi:10.1038/nbt.2816)
  164. Kyurkchiev D. 2014 Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J. Stem Cells* **6**, 552-570. (doi:10.4252/wjsc.v6.i5.552)
  165. Gazdic M, Volarevic V, Arsenijevic N, Stojkovic M. 2015 Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem Cell Rev.* **11**, 280–287. (doi:10.1007/s12015-014-9583-3)
  166. Fernández Vallone VB, Romaniuk MA, Choi H, Labovsky V, Otaegui J, Chasseing NA. 2013 Mesenchymal stem cells and their use in therapy: What has been achieved? *Differentiation* **85**, 1–10. (doi:10.1016/j.diff.2012.08.004)
  167. Zhao ZG, Xu W, Sun L, You Y, Li F, Li QB, Zou P. 2012 Immunomodulatory function of regulatory dendritic cells induced by mesenchymal stem cells. *Immunol. Invest.* **41**, 183–198. (doi:10.3109/08820139.2011.607877)
  168. Mann ER, Li X. 2014 Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: Crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells. *World J. Gastroenterol.* **20**, 9653–9664. (doi:10.3748/wjg.v20.i29.9653)
  169. van Rooijen N, Hendrikx E. 2010 Liposomes for specific depletion of macrophages from organs and tissues. *Methods Mol. Biol.* **605**, 189–203. (doi:10.1007/978-1-60327-360-2\_13)
  170. Rooijen N Van, Sanders A. 1994 Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J. Immunol. Methods* **174**, 83–93. (doi:10.1016/0022-1759(94)90012-4)
  171. Alonso MN, Gregorio JG, Davidson MG, Gonzalez JC, Engleman EG. 2014 Depletion of inflammatory dendritic cells with anti-CD209 conjugated to saporin toxin. *Immunol. Res.* **58**, 374–377. (doi:10.1007/s12026-014-8511-6)
  172. Kanai T *et al.* 2006 Ameliorating effect of saporin-conjugated anti-CD11b monoclonal antibody in a murine T-cell-mediated chronic colitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 1136–1142. (doi:10.1111/j.1440-1746.2006.04391.x)
  173. Qualls JE, Kaplan AM, Rooijen N Van, Cohen DA. 2006 Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 802–815. (doi:10.1189/jlb.1205734.0741-5400/06/0080-802)
  174. Redhu NS *et al.* 2017 Macrophage dysfunction initiates colitis during weaning of infant mice lacking the interleukin-10 receptor. *Elife* **6**, e27652. (doi:10.7554/eLife.27652)

175. Lim D, Kim W, Lee C, Bae H, Kim J. 2018 Macrophage Depletion Protects against Cigarette Smoke-Induced Inflammatory Response in the Mouse Colon and Lung. *Front. Physiol.* **9**, 47. (doi:10.3389/fphys.2018.00047)
176. Chen P, Huang Y, Womer KL. 2015 Effects of mesenchymal stromal cells on human myeloid dendritic cell differentiation and maturation in a humanized mouse model. *J. Immunol. Methods* **427**, 100–104. (doi:10.1016/j.jim.2015.10.008)
177. Jiang X, Zhang Y, Liu B. 2005 Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **105**, 4120–4126. (doi:10.1182/blood-2004-02-0586.Supported)
178. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. 2009 MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: Central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* **113**, 6576–6583. (doi:10.1182/blood-2009-02-203943)
179. Hsu DK, Chen HY, Liu FT. 2009 Galectin-3 regulates T-cell functions. *Immunol. Rev.* **230**, 114–127. (doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00798.x)
180. Radosavljevic G, Volarevic V, Jovanovic I, Milovanovic M, Pejnovic N, Arsenijevic N, Hsu DK, Lukic ML. 2012 The roles of Galectin-3 in autoimmunity and tumor progression. *Immunol. Res.* **52**, 100–110. (doi:10.1007/s12026-012-8286-6)
181. Fermin Lee A *et al.* 2013 Galectin-3 modulates Th17 responses by regulating dendritic cell cytokines. *Am. J. Pathol.* **183**, 1209–1222. (doi:10.1016/j.ajpath.2013.06.017)

## Биографија

Александар Николић рођен је 05.01.1986. године у Лесковцу где је завршио основну и средњу школу. Интегрисане академске студије Факултета ветеринарске медицине Универзитета у Београду уписао је школске 2004/2005 године, а дипломирао 2010. године са просечном оценом 8,49. Школске 2012/2013 године уписао је докторске академске студије Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу на изборном подручју Матичне ћелије у биомедицинским наукама. Усмени докторски испит положио је јула 2014. године са оценом 10 (десет). У периоду фебруар-мај 2014. године усавршавао се у лабораторији INSERM U-791 (LIOAD), Нант, Француска.

Аутор је и коаутор 5 рада у часописима од међународног значаја. Тема докторске дисертације под називом „Ефекти мезенхималних матичних ћелија у мишјем моделу акутног запаљења дебелог црева изазваног декстран натријум сулфатом“ прихваћена је 2016. године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу.

## Библиографија

1. **Nikolic A**, Simovic Markovic B, Gazdic M, Randall Harrell C, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, L Lukic M, Stojkovic M, Volarevic V. Intraperitoneal administration of mesenchymal stem cells ameliorates acute dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing dendritic cells. *Biomed Pharmacother.* 2018;100:426-432. doi: 10.1016/j.biopha.2018.02.060.
2. Simovic Markovic B, **Nikolic A**, Gazdic M, Bojic S, Vucicevic L, Kosic M, Mitrovic S, Milosavljevic M, Besra G, Trajkovic V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Gal-3 plays an important pro-inflammatory role in the induction phase of acute colitis by promoting activation of NLRP3 inflammasome and production of IL- $\beta$  in macrophages. *J Crohns Colitis.* 2016;10(5):593-606. doi: 10.1093/ecco-jcc/jjw013.
3. Simovic Markovic B, **Nikolic A**, Gazdic M, Nurkovic J, Djordjevic I, Arsenijevic N, Stojkovic M, Lukic ML, Volarevic V. Pharmacological Inhibition of Gal-3 in Mesenchymal Stem Cells Enhances Their Capacity to Promote Alternative Activation of Macrophages in Dextran Sulphate Sodium-Induced Colitis. *Stem Cells Int.* 2016;2016:2640746. doi: 10.1155/2016/2640746.

4. **Nikolic A**, Volarevic V, Armstrong L, Lako M, Stojkovic M. Primordial Germ Cells: Current Knowledge and Perspectives. *Stem Cells Int.* 2016;2016:1741072. doi: 10.1155/2016/1741072.
5. Ratković Z, Muškinja J, Burmudžija A, Ranković B, Kosanić M, Bogdanović G.A, Simović Marković B, **Nikolić A**, Arsenijević N, Đorđević S, Vukićević R.D. Dehydrozingerone based 1-acetyl-5-aryl-4,5-dihydro-1H-pyrazoles: synthesis, characterization and anticancer activity. *J Mol Struct.* 2016;1109:82-8. doi: 10.1016/j.molstruc.2015.12.079.

## 8. ПРИЛОГ

### 8.1. Кључна документацијска информатика

**УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ**  
**ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ**

**Редни број:**

**РБ**

**Идентификациони број:**

**ИБР**

**Тип документације:**

Монографска публикација

**ТД**

**Тип записа:**

Текстуални штампани материјал

**ТЗ**

**Врста рада:**

Докторска дисертација

**ВР**

**Аутор:**

Александар З. Николић

**АУ**

**Ментор/коментор:**

др сци.мед. Миодраг Стојковић, редовни професор

**МН**

**Наслов рада:**

Ефекти мезенхималних матичних ћелија у мишјем моделу  
акутног запаљења дебелог црева изазваног декстран  
натријум сулфатом

**НР**

<b>Језик публикације:</b> ЈП	Српски (ћирилица)
<b>Језик извода:</b> ЈИ	српски и енглески
<b>Земља публикавања:</b> ЗП	Република Србија
<b>Уже географско подручје:</b> УГП	Република Србија
<b>Година:</b> ГО	2018
<b>Издавач:</b> ИЗ	Ауторски репринт
<b>Место и адреса:</b> МС	Светозара Марковића 69, 34000 Крагујевац
<b>Физичи опис рада:</b> ФО	Дисертација има 103 страница, садржи 8 поглавља, 12 фигура, 5 табела и 181 референцу
<b>Научна област:</b>	Медицина
<b>Научна дисциплина:</b> ДИ	Матичне ћелије у биомедицинским наукама
<b>Предметна одредница/ кључне речи</b> ПО	Мезенхималне матичне ћелије, колитис изазван декстран натријум сулфатом, дендритске ћелије

**УДК**

**Чува се:**

У библиотеци Факултета медицинских наука у Крагујевцу,

**ЧУ**

Светозара Марковића 69, 34000 Крагујевац, Р. Србија

**Важна напомена:**

**МН**

**Извод:**

**ИД**

Мезенхималне матичне ћелије (енгл. *Mesenchymal stem cells- MSC*) имају терапеутски потенцијал у многим стањима, укључујући гастроинтестиналним болестима. Њихов ефекат на супресију патогене улоге дендритских ћелија (енгл. *dendritic cells-DC*) у оштећењу дебелог црева није откривен. У овом истраживању су по први пут описани ефекти MSC на DC у колитису изазваним декстран натријум сулфатом, који представља добар модел за истраживање улцерозног колитиса. Два милиона MSC су интраперитонеално апликоване дневно подељених у три дневних доза. Оцењивање знака развоја болести, анализирање ћелија имунског система које су инфилтрисале *lamina propria* дебелог црева и продукције системских цитокина је коришћено за процену ефеката MSC. Додатно је спроведена деплеција макрофага и пасивни трансфер *in vivo* стимулираних DC, као и култивисање MSC и DC, одређивање продукције цитокина и промене фенотипа DC. Апликоване MSC су позитивно утицале на смањење развоја колитиса. Апликације су значајно смањиле прогресију болести, смањиле продукцију системских проинфламацијских цитокина (IL-1 $\beta$ , IL-12 и IL-6) и редуковале процентуалну заступљеност инфилтрисаних проинфламацијских ћелија имунског система у *lamina propria*. Њихов позитиван ефекат на ублажавање знакова колитиса је био евидентан чак и након деплеције макрофага.



Пасивни трансфер *in vivo* MSC стимулираних DC ублажио је озбиљност колитиса. MSC паракриним начином, продукцијом Галектина 3 смањиле су продукцију проинфламацијских цитокина (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 и IL-6) у DC и умањиле експресију CD86, CD80 и I-A молекула на њиховој мембрани укључених у презентацији антигена. Све заједно, ови резултати указују да апликоване MSC позитивне ефекте на смањење колитиса изазваног декстран натријум сулфатом постижу супресијом DC.

**Датум прихватања теме од** 28.09.2016. године

**стране ННВ:**

**ДП**

**Датум одбране:**

**ДО**

**Чланови комисије:**

**КО**

Проф. др Владислав Воларевић, ванредни професор  
Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу,  
председник,  
Доц. Др Биљана Љујић, доцент Факултета медицинских  
наука Универзитета у Крагујевцу, члан,  
НС Диана Бугарски, научни саветник Института за  
медицинска истраживања Универзитета у Београду, члан.

## 8.2. Key words documentation

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC**  
**FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

**Accession number:**

**ANO**

**Identification number:**

**INO**

**Documentation type:**

Monographic publication

**DT**

**Type of record:**

Textual printed material

**TR**

**Contents code:**

PhD thesis

**CC**

**Author:**

Aleksandar Z. Nikolic

**AU**

**Menthor/co-mentor:**

Prof. Miodrag Stojkovic

**MN**

**Title:**

Effects of mesenchymal stem cells in mouse model of acute  
dextran sodium sulphate-induced colitis

**TI**

**Language of text:**

Serbian (Cyrillic)

**LT**

**Language of abstract:** Serbian and English

**Country of publication:** Republic of Serbia  
**CP**

**Locality of publication:** Republic of Serbia  
**LP**

**Publication year:** 2018  
**PY**

**Publisher:** Author reprint  
**PU**

**Publication place:** 69 Svetozara Markovica, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia  
**PP**

**Physical description:** Thesis contains 103 pages, 8 chapters, 12 figures, 5 tables and 181 citations  
**PD**

**Scientific field:** Medicine  
**SF**

**Scientific discipline:** Stem cells in biomedical sciences  
**SD**

**Subject/key words:** Mesenchymal stem cells, dss-induced colitis, dendritic cells  
**SKW**

**UDC**

**Holding data:**

Library of Faculty of Medical Sciences, Kragujevac, 69  
Svetozara Markovica, 34000 Kragujevac, Republic of Serbia

**Note:**

N

**Abstract:****AB**

Mesenchymal stem cells (MSC) have therapeutic potential in many conditions, including gastrointestinal diseases. Their effect on suppression of pathogenic role of dendritic cells (DC) in colon injury is not revealed. Here, for the first time is described the effects of MSC on dendritic cells in dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis, used as a well-established model of ulcerative colitis. Divided in three doses, two million MSC were intraperitoneally administered daily. Assessing signs of disease development, analysis of infiltrated of immune cells in colon *lamina propria* and production of systemic cytokines were used to evaluate effects of MSC. Additionally, depletion of macrophages and passive transfer of *in vivo* primed DC was performed, as well as co-culture of DC and MSC, measurement of cytokines production and phenotype changing of DC. Administered MSC positively affects the decreased development of colitis. The administration of MSC significantly reduced progression of disease, decreased the production of systemic proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-12, and IL-6), and reduced percentage of infiltrated proinflammatory immune cells in *lamina propria*. Their effect was evident even after depletion of macrophages. Passive transfer of *in vivo* MSC-primed DC reduced severity of colitis. MSC in paracrine manner, by increased production of Galectin 3, down-regulated the production of proinflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, and IL-6) in DC, and attenuated expression of CD86, CD80

and I-A, molecules on their membranes involved in antigen presentation. Taken together, these results indicate that applied MSC achieve positive effects on attenuation of DSS-induced colitis by suppressing DC.

**Accepted by the Scientific** 28.09.2016.

**Board on:**

**ASB**

**Defended on:**

**DE**

**Thesis defended board  
(Degree/name/surname/title  
/faculty)**

Prof. Vladislav Volarevic, associate professor at Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, president,  
Prof. Biljana Ljubic, assistant professor at Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, member,  
Dr Diana Bugarski, principal research fellow at Institute for Medical Research University of Belgrade, member.

**Образац 1**

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, \_\_\_\_\_, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

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

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

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

У \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ године,

\_\_\_\_\_  
потпис аутора

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, \_\_\_\_\_,

дозвољавам

не дозвољавам

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

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

која је одбрањена на \_\_\_\_\_

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

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

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

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада<sup>2</sup>

У \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ године,

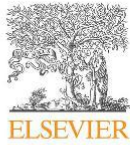
---

потпис аутора

---

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





Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine &amp; Pharmacotherapy

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bioph](http://www.elsevier.com/locate/bioph)

## Intraperitoneal administration of mesenchymal stem cells ameliorates acute dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing dendritic cells



Aleksandar Nikolic<sup>a</sup>, Bojana Simovic Markovic<sup>a</sup>, Marina Gazdic<sup>b</sup>, C. Randall Harrell<sup>c</sup>, Crissy Fellabaum<sup>c</sup>, Nemanja Jovicic<sup>a</sup>, Valentin Djonov<sup>d</sup>, Nebojsa Arsenijevic<sup>a</sup>, Miodrag L Lukic<sup>a</sup>, Miodrag Stojkovic<sup>b,e</sup>, Vladislav Volarevic<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Microbiology and Immunology, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>b</sup> Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

<sup>c</sup> Regenerative Processing Plant, LLC, Palm Harbor, Florida, United States

<sup>d</sup> Institute of Anatomy, University of Bern, Bern, Switzerland

<sup>e</sup> Speho Medical, Leskovac, Serbia

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Dendritic cells  
DSS-induced colitis  
Mesenchymal stem cells

### ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) have important pathogenic role in the induction and progression of ulcerative colitis (UC), but their role in mesenchymal stem cells (MSCs)-mediated suppression of colon injury and inflammation is not revealed. By using dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis, a well-established murine model of UC, we examined effects of MSCs on phenotype and function of colon infiltrating DCs. Clinical, histological, immunophenotypic analysis and passive transfer of MSCs-primed DCs were used to evaluate capacity of MSC to suppress inflammatory phenotype of DCs in vivo. Additionally, DCs:MSCs interplay was also investigated in vitro, to confirmed in vivo obtained findings. Intraperitoneally administered MSCs ( $2 \times 10^6$ ) significantly reduced progression of DSS-induced colitis and reduced serum levels of inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-12, and IL-6). Passive transfer of in vivo MSCs-primed DCs reduced severity of colitis while passive transfer of MSCs-non-primed DCs aggravated DSS-induced colitis. Through the secretion of immunomodulatory Galectin 3, MSCs, in paracrine manner, down-regulated production of inflammatory cytokines in DCs and attenuated expression of co-stimulatory and major histocompatibility complex class II molecules on their membranes. Taken together, these results indicate that MSCs achieved their beneficial effects in DSS-induced colitis by suppressing inflammatory phenotype of DCs in Gal-3 dependent manner. Therapeutic targeting of DCs by MSCs should be explored in future studies as a useful approach for the treatment of UC.

### 1. Introduction

Since etiology and pathogenesis of ulcerative colitis (UC) is not completely revealed, several animal models have been developed in the last few decades [1–3]. Among them, because of the high degree of uniformity and reproducibility as well as some similarities to human UC, dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis has been usually used to elucidate molecular and cellular pathways involved in pathogenesis of UC and for the evaluation of new diagnostic and therapeutic approaches [2,3].

Among colon infiltrating immune cells, dendritic cells (DCs) have a central role in maintaining tolerance in the gut [4,5]. Their localization in the intestine allows them to be one of the crucial factors in

preservation of tissue homeostasis [5]. Pathogenic role of DCs in development and progression of UC is well described [4–7]. Activation of gut-infiltrated DCs results with the induction of T cell-mediated immune response resulting with the progression of colon inflammation and development of UC [4,5].

Mesenchymal stem cells (MSCs) are self-renewing cells with significant regenerative potential [8–10]. By modulating immune response in juxtacrine or paracrine manner [8,11–14], MSCs attenuate inflammation and promote tissue regeneration representing promising therapeutic tool for various inflammatory diseases including UC [15–21]. MSC may polarize DCs towards inflammatory or tolerogenic phenotype in juxtacrine or paracrine manner in dependence of DCs maturation state and DCs:MSCs ratio in the gut microenvironment

\* Correspondence author at: Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac, 69 Svetozara Markovića Street, 34000 Kragujevac, Serbia.

E-mail address: [drvolarevic@yahoo.com](mailto:drvolarevic@yahoo.com) (V. Volarevic).

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2018.02.060>

Received 1 December 2017; Received in revised form 2 February 2018; Accepted 13 February 2018  
0753-3322/© 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

[11,22,23]. Although several studies demonstrated the efficacy and therapeutic potential of MSCs for treatment of DSS-induced colitis in mice [15–21,24], none of them explored the influence of MSCs on DCs in colitis. Therefore, the aim of this study was to examine effects of MSCs on phenotype and function of colon infiltrating DCs in the pathogenesis of DSS-induced colitis.

Herewith, we present the first evidence that MSCs achieved their beneficial effects in DSS-induced colitis by suppressing inflammatory phenotype of DCs in Galectin-3 (Gal-3) dependent manner, suggesting MSCs-based therapeutic targeting of DCs as a new and useful approach for the treatment of UC.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Wild type C57BL/6 mice, 6–8 week old, 19–21 g weight, which were born and housed during experiments in animal breeding facility into Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia were used. Mice maintained at 12-h day/night cycle in a temperature-controlled environment, accessing food and water *ad libitum*. All experimental procedures were approved and conducted according to Guidelines of the Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia.

### 2.2. Induction of DSS-induced colitis

Acute colitis in C57BL/6 mice was induced by 3% (w/v) DSS (m.w. 40 kDa, TdB Consultancy, Uppsala, Sweden) added to drinking water up to 7 days. Control mice have access only to DSS-free water [21,25]. During experiments, mice were fed with commercial pelleted food.

### 2.3. Application of MSCs and vehicle control

Syngenic MSCs used in these experiments were purchased from Gibco (Cat.No S10502-01) as cells isolated from bone marrow of C57BL/6 mice. MSCs were cultured in a humid atmosphere at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, in T75 flasks with complete medium, consisted DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), heat-inactivated 10% PBS (fetal bovine serum), 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (all purchased from Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

MSCs were daily administrated ( $2 \times 10^6$ , *i.p.*), divided in 3 daily doses dissolved in 0.3 ml PBS (phosphate buffer saline) during 7 days of experiment. The first dose was applied 12 h after induction of colitis. Prior each application, MSCs were trypsinized, counted using Trypan blue exclusion test and diluted, and as fresh solution applied. Control group received vehicle only (PBS) in a same way and volume as MSCs-treated group.

### 2.4. Assessment of colitis

Clinical scoring of colitis has performed according to previously published studies [21,25]. The weight of mice and monitoring of clinical signs of disease progression (presence or absence of diarrhea and rectal bleeding) as parameters for calculating disease activity index (DAI) was done daily by two independent researchers.

### 2.5. Histopathological analysis

Animals were sacrificed, colons were removed from caecum and the length was measured. Colons were flushed with PBS, sliced longitudinally, rolled by “Swiss rolls” method, and placed in tube with 4% formalin. After 24 h of fixation, 5 µm paraffin-embedded colon sections were stained by haematoxylin and eosin (H&E). Histological score was determined summing two parameters (damaged tissue and leucocytes

infiltration) by two investigators in a blind manner [21,25].

### 2.6. Isolation of dendritic cells and passive transfer

To investigate the interactions between DCs and MSCs in DSS-induced colitis under *in vivo* conditions, DCs were isolated from spleen of mice treated with DSS or DSS and MSC for two days. Isolation of DCs was performed using commercial kit for immunomagnetic sorting of CD11c<sup>+</sup> DCs (CD11c MicroBeads, Miltenyi Biotec GmbH, Germany, Cat. No 130-052-001). Passive transfers of  $2 \times 10^5$  DCs dissolved in 0.2 ml PBS were conducted *i.p.* into DSS-treated recipients at day 5 of continuous DSS administration [4].

### 2.7. *In vitro* stimulation of DCs and interaction with MSCs

DCs were isolated from spleen of healthy mice using commercial kit for immunomagnetic sorting of CD11c<sup>+</sup> DCs (CD11c MicroBeads, Miltenyi Biotec GmbH, Germany). MSCs were seeded in a 6.5 mm transwell chamber with a 0.4 µm pore size of 24-well plate in co-culture with DCs on the bottom at a 10:1 DCs/MSCs ratio [26,27], in complete medium alone or in addition of 3% (w/v) DSS for a 2 days. All cases were performed in quadruplicate. After 48 h, collected supernatants were frozen at –20 °C until cytokine analysis, while scraped cells were immediately analyzed using flow cytometry.

### 2.8. Measurement of cytokines

To analyze concentration of cytokines, commercial ELISA kits for IL-1β, IL-6, IL-12, PGE2 (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN), and IDO (Neobiolab, Cambridge, MA) were used. Supernatants were analyzed on following cytokines: TNFα, IL-12, HGF, IL-1β, and Galectin 3 (Gal-3) (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN) according to manufacture prescription.

### 2.9. Flow cytometry analysis

Scraped cells were stained with immunofluorescence antibodies against CD11c, CD80, CD86, and I-A surface markers and IL-6 and TNFα cytokines (BioLegend, San Diego, CA). Acquiring data performed on BD FACSCalibur, (BD Biosciences), while data were analyzed using Flowing Software 2.5.1 (Cell Imaging Core, Turku Centre for Biotechnology, University of Turku, Finland).

### 2.10. Statistical analysis

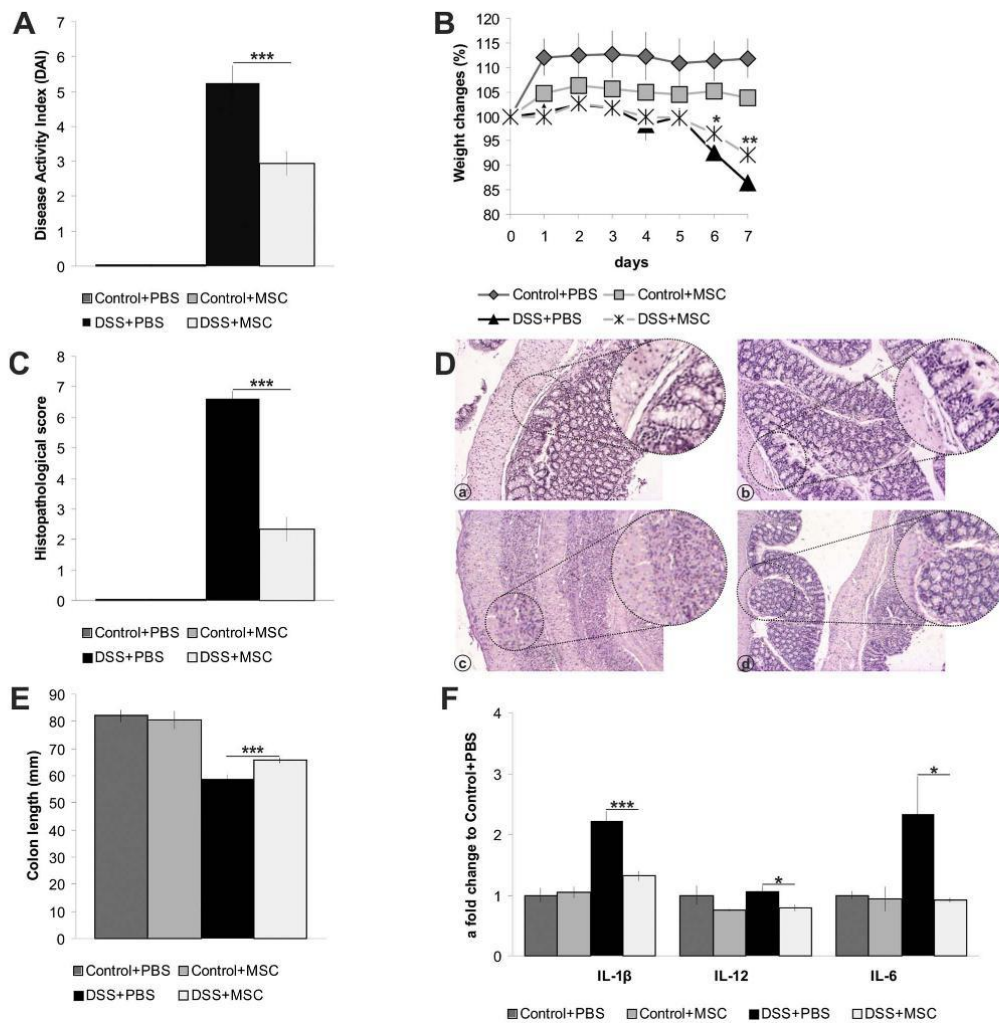
All results were presented as mean ± standard error of mean (SEM). Results were analyzed by two-tailed Student's *t*-test for independent sample. All statistical analyses were performed using the SPSS (Statistical Package for Social Sciences, IBM, Chicago, IL) version 20 for Windows. Statistical differences have been considered at  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Intraperitoneally administrated MSCs significantly alleviate acute DSS-induced colitis

Daily administration of MSCs to DSS-treated mice significantly ( $p < 0.001$ ) alleviate disease activity index (DAI) (Fig. 1A). Daily monitoring showed that DSS + PBS-treated mice develop more severe clinical parameters of UC compared to DSS + MSCs-treated animals. The first appearance of blood in the feces or loose stool in DSS + PBS mice were detected from day 4, with daily gaining in the intensity leading to gross bleeding and diarrhea with the presence of mucus, while in DSS + MSCs mice gross bleeding and diarrhea was not observed until the end of experiment. Significant differences in the weight





**Fig. 1.** Administrations of MSCs ameliorate acute DSS-induced colitis in C57BL/6 mice. Administration of MSCs in DSS-treated mice significantly decreases DAI (Fig. 1A) and loss of weight (Fig. 1B). Histopathological analysis showed significant decreases of histological score in DSS + MSCs-treated mice (Fig. 1C). Representative images of H&E stained sections of colon tissue obtained from PBS-treated (Fig. 1Da), MSCs-only treated mice (Fig. 1Db), DSS + PBS-treated (Fig. 1Dc) and DSS + MSCs-treated mice (Fig. 1Dd) demonstrating attenuated colon injury and inflammation in DSS + MSCs-treated animals. Colon lengths were significantly longer in DSS + PBS-treated mice, compared mice from DSS + MSCs group. Concentration of inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-12, and IL-6) was significantly lower in DSS + MSCs-treated mice. Data presented as mean  $\pm$  SEM from four experiments; control groups (n = 8), DSS-treated groups (n = 35); \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

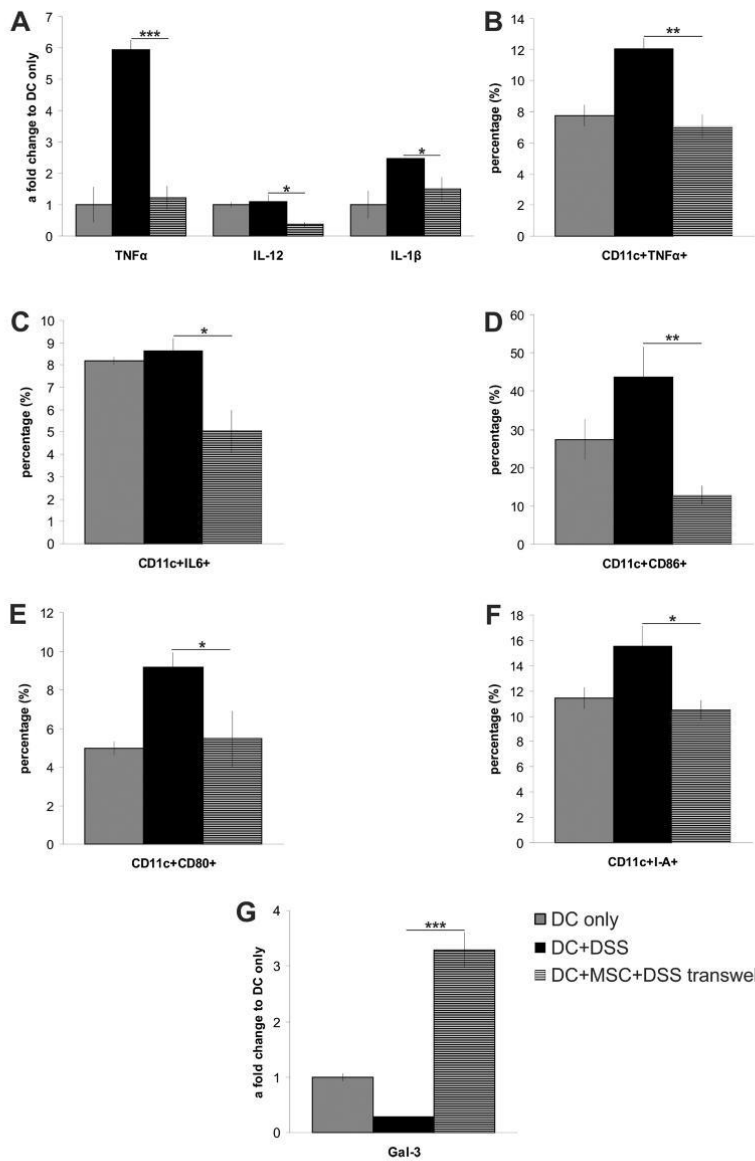
lost were at days 6 ( $p < 0.05$ ) and 7 ( $p < 0.01$ ) (Fig. 1B). Histopathological analysis of colon tissue revealed significant differences in histological score of colon injury among experimental groups ( $p < 0.001$ ; Fig. 1C) while normal colon architecture was observed in control animals (PBS-only (Fig. 1Da) and MSC-only (Fig. 1Db) treated mice). As shown in Fig. 1Dc, DSS + PBS mice had extensive tissue damages with infiltration of immune cells. On the other hand, colon architecture of DSS + MSCs-treated mice (Fig. 1Dd) appeared relatively normal, showing only mild evidence of crypt distortion, widening, and inflammation. This result is in a line with clinical signs of progression of colitis (Fig. 1A). Severity of DSS-induced colitis is associated with a significant decrease in colon length. Accordingly, the length of colon in

DSS + PBS mice were significantly shorter compared to DSS + MSC group ( $p < 0.001$ ; Fig. 1E).

In line with the clinical and histological scores, MSCs significantly decreased concentration of inflammatory cytokines: IL-1 $\beta$  ( $p < 0.001$ ; Fig. 1F), IL-12 ( $p < 0.05$ ; Fig. 1F), and IL-6 ( $p < 0.05$ ; Fig. 1F) in serum of DSS-treated mice.

### 3.2. MSCs, in Gal-3 dependent manner, down-regulate production of inflammatory cytokines in DCs and reduce expression of antigen presenting molecules on their membranes

Since DCs, during the onset of DSS-induced colitis, produce large



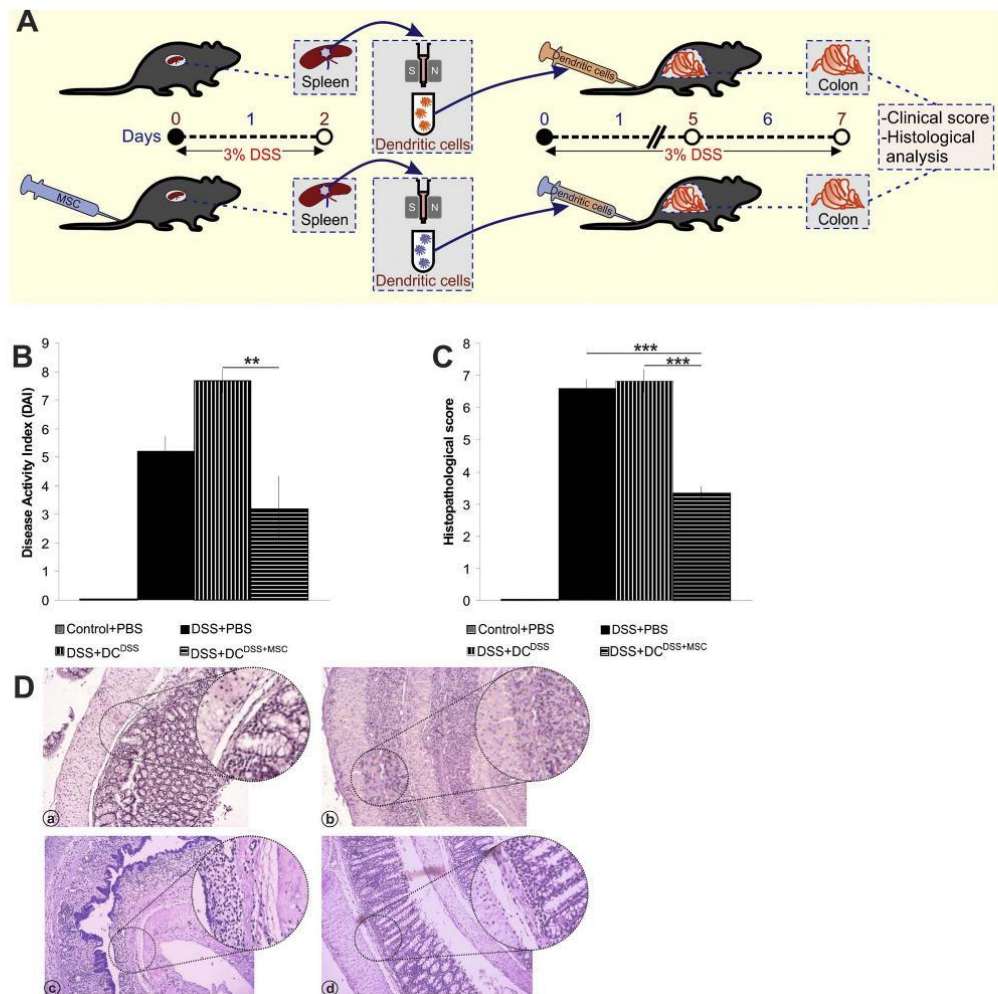
**Fig. 2.** MSCs suppressed inflammatory phenotype of DCs in Gal-3 dependent manner. Concentration of inflammatory cytokines (IL-1β, IL-12, and IL-6) in supernatants of DSS-stimulated DCs was down-regulated after culturing with MSCs in transwell systems (Fig. 2A). Percentage of TNFα-producing (Fig. 2B) and IL-6-producing (Fig. 2C) DCs were significantly lower and the expression of CD86 (Fig. 2D), CD80 (Fig. 2E), and I-A (Fig. 2F) on DSS-stimulated DCs was significantly down-regulated when DCs were cultured with MSCs in transwell systems. Significant increase in MSCs-derived Gal-3 was noticed in DCs:MSCs culture (Fig. 2G). Data presented as a fold change to DC only ± SEM or mean ± SEM; \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

amounts of inflammatory cytokines, their concentration was measured in supernatants of DSS-activated DCs, which were cultured in transwell systems with or without MSCs. Obtained results showed that MSCs, in paracrine manner, significantly down-regulated production of inflammatory cytokines in DCs. There was significant decrease in concentration of TNFα ( $p < 0.001$ ; Fig. 2A), IL-12 ( $p < 0.01$ ; Fig. 2A) and IL1β ( $p < 0.05$ ; Fig. 2A) between experimental groups.

In order to confirm inhibitory effects of MSCs on DCs, immunophenotyping of cultured DCs was performed. Flow cytometry analysis and intracellular staining confirmed capacity of MSCs to reduce production of inflammatory cytokines in DCs. Significantly lower

percentage of TNFα- ( $p < 0.01$ ; Fig. 2B) and IL-6 ( $p < 0.05$ ; Fig. 2C)-producing CD11c + DCs were noticed among DSS-activated DCs that were cultured with MSCs in transwell systems. Additionally, MSCs, in paracrine manner, attenuated expression of co-stimulatory molecules ((CD86 ( $p < 0.01$ ; Fig. 2D), CD80 ( $p < 0.05$ ; Fig. 2E)) and major histocompatibility complex (MHC) molecule class II (I-A,  $p < 0.05$ ; Fig. 2F), which are crucially involved in antigen presentation by DCs during the progression of colon inflammation.

Since these results indicate that MSCs attenuated capacity of DCs for induction of immune response in paracrine manner, we analyzed concentrations of MSCs-derived immunosuppressive factors (prostaglandin



**Fig. 3.** Adoptive transfer of in vivo stimulated DCs aggravates DSS-induced colitis. Schema of isolation and transfer of DCs into DSS-treated mice recipients (Fig. 3A) Passive transfer of DSS-primed, but not DSS + MSCs-primed DCs increased DAI (Fig. 3B) in DSS-treated mice. Histopathological analyses revealed significantly decreased histological score (Fig. 3C) in DSS-treated mice which received DSS + MSCs-primed DCs. This was confirmed in representative images of H&E stained sections of colon tissue from PBS-only treated (Fig. 3Da), DSS + PBS-treated (Fig. 3Db), DSS + DCs<sup>DSS</sup>-treated (Fig. 3Dc) and DSS + DCs<sup>DSS + MSCs</sup>-treated mice. Data are presented as mean ± SEM; recipients groups (n = 6); \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

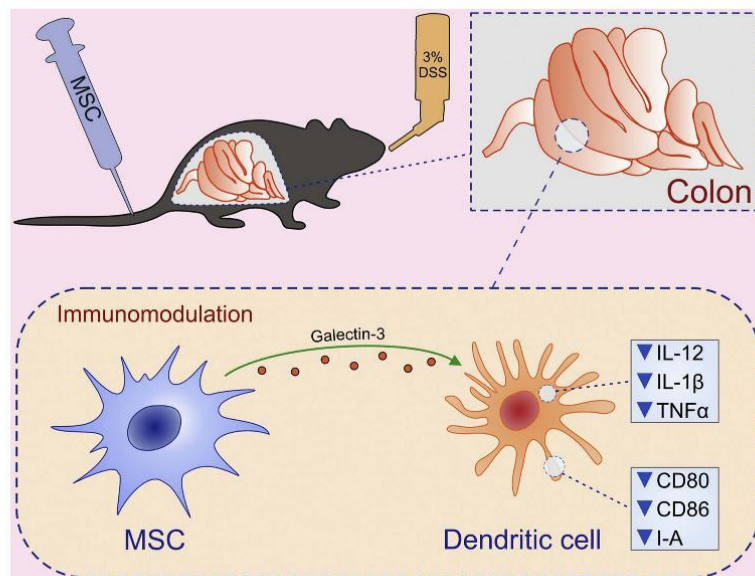
E2 (PGE2), hepatocyte growth factor (HGF), and Gal-3 in serum samples of DSS-treated mice or in supernatants of DSS-activated DCs. Obtained results revealed significant increase only in Gal-3 ( $p < 0.001$ ; Fig. 2G), while there was no difference in the concentration of other MSCs-derived immunomodulatory factors (data not shown), indicating that MSCs modulate phenotype and function of DCs through the production of Gal-3.

### 3.3. Adoptive transfer of in vivo primed DCs in DSS-treated mice exacerbates colitis

In order to evaluate whether MSCs were able to suppress inflammatory phenotype of DCs in vivo, at the same manner as in vitro, we isolated DCs from DSS-treated (DCs<sup>DSS</sup>) or DSS + MSCs-treated mice (DCs<sup>DSS + MSCs</sup>) and analyzed the effects of their transfer in mice that

already received DSS for 5 days (Fig. 3A). Obtained results showed that injection of DCs<sup>DSS</sup> exacerbated colitis, while administration of DCs<sup>DSS + MSCs</sup> attenuated colitis in DSS-treated mice, as evaluated by DAI ( $p < 0.01$ ; Fig. 3B) and histological scores ( $p < 0.001$ ; Fig. 3C). Histological analysis of DSS + DCs<sup>DSS</sup>-treated mice revealed severe inflammation manifested by significant epithelial cell damage, extensive crypt drop-out and massive infiltration of immune cells (Fig. 3Dc). In contrast, the colon architecture of DSS + DCs<sup>DSS + MSCs</sup>-treated mice showed only mild evidence of crypt distortion and attenuated inflammation (Fig. 3Dd). These results indicate that daily administration of MSCs in DSS-treated mice suppress development of inflammatory and promote induction of immunosuppressive phenotype in DCs resulting with the attenuation of colon injury and inflammation. (Fig. 4)





**Fig. 4.** Proposed mechanism of MSCs alleviation acute DSS-induced colitis by suppressing DCs via production of Gal-3. Through the secretion of Gal-3, MSCs suppress production of inflammatory cytokines (IL-1β, IL-12, and IL-6) in colon-infiltrating DCs and reduce their capacity for antigen presentation (by down-regulating expression of CD80, CD86 and I-A on their membranes), resulting with the attenuation of DSS-induced colon inflammation and injury.

#### 4. Discussion

In previously published papers, we and others demonstrated the therapeutic potential of MSCs in DSS-induced colitis [15–21,24,28]. However, this study brought the first evidence that intraperitoneally injected MSCs attenuated colitis by suppressing inflammatory DCs.

It is well known that intraperitoneal application of MSCs is the most appropriate method for the transplantation of MSCs in DSS treated animals [16,20,21,28]. Intraperitoneally administered MSCs remain in the peritoneal cavity from where, by producing soluble factors, they suppress inflammation and attenuate colitis [20]. In line with these findings, we noticed that intraperitoneally injected MSCs, in paracrine manner, down-regulated serum levels of inflammatory cytokines (IL-1β, IL-12, and IL-6) (Figs. 1F and 2A) and alleviated colon injury and inflammation (Fig. 1A–E).

DCs have important pathogenic role in induction and progression of DSS-induced colitis [4–7]. During the inductive phase of colitis, DCs, by producing inflammatory cytokines and chemokines, promote the influx of immune cells in injured colon and induce inflammation [7]. During the progressive phase of colitis DCs present antigens, released from injured epithelial cells or invading bacteria, to naïve T cells and in IL-12 or IL-1, IL-6 and IL-23 dependent manner induce their polarization towards inflammatory Th1 and Th17 cells [4,5]. Accordingly, depletion of DCs in mice that already developed colitis led to the significant attenuation of colon injury and inflammation, while adoptive transfer of DCs in DSS-injured mice results with the aggravation of disease [4,6]. Similarly, herewith we noticed that transfer of DCs, isolated from DSS-treated mice, significantly aggravated DSS-induced colitis (Fig. 3B, C and Dc), confirming detrimental role of DCs in colon injury and inflammation. Importantly, we observed completely opposite findings in DSS-treated mice that received “MSCs-primed DCs”, previously derived from DSS + MSCs-treated animals (DCs<sup>DSS + MSCs</sup>). Both clinical and histological scores showed attenuated colitis in DSS-injured mice that received DCs<sup>DSS + MSCs</sup> (Fig. 3B,C and Dd) indicating that daily, intraperitoneal administration of MSCs induced generation of tolerogenic, immunosuppressive phenotype in DCs enabling them to alleviate acute colon inflammation.

Accordingly, we noticed an attenuated expression of antigen

presenting molecules (CD80, CD86 and I-A) on DCs which were cultured with MSCs (Fig. 2D–F). It is well known that MSCs may arrest DCs in G0/G1 phase of cell cycle preventing the expression of co-stimulatory (CD80 and CD86) and MHC class II molecule (I-A) on their membranes [11]. These MSCs-modulated DCs were hampered in their ability to induce activation of T cells [11,13,22]. Additionally, by suppressing JAK1/STAT3 signaling pathway in DCs, MSCs reduced their capacity to produce inflammatory cytokines [11]. In line with these findings, we observed decreased percentage of TNF-α and IL-6 producing cells among DSS-activated DCs that were cultured with MSC in transwell systems (Fig. 2B and C).

Our data confirmed observations noticed in previously published studies [23,26] that MSCs suppress maturation and activation of DCs in paracrine manner. Several studies have demonstrated that MSCs constitutively express and secrete Gal-3, immunomodulatory molecule which is important for the migration, adhesion, and maturation of DCs [29–32]. Depending on the type and proliferative status of cells, Galectin-3 can be found within the nucleus, in the cytoplasm, on the cell surface and in the extracellular compartment [33]. Extracellular galectin-3 is able to oligomerize and participates in multivalent interactions with cell surface and extracellular matrix glycans, through lectin-carbohydrate interactions, affecting migration of DCs [33]. Furthermore, Gal-3 plays an important role in the antigen presentation and activation of T lymphocytes by DCs [34]. Gal-3 has suppressive effect on the production of IL-12 by DCs attenuating Th1 immune response [34]. Extracellular Gal-3 has been shown to induce apoptosis of activated T cells [35], indicating its immunosuppressive potential. Herewith, we noticed significant increase in Gal-3 when DSS-stimulated DCs were cultured with MSC (Fig. 2G), suggesting that MSCs through the production of Gal-3 suppress capacity of DCs for antigen presentation and production of inflammatory cytokines.

Taken together our findings indicate that MSCs achieved their beneficial effects in DSS-induced colitis by suppressing inflammatory phenotype of DCs in Gal-3 dependent manner. Further implications of our results may be useful in researching influence of MSCs on DCs in recovery and chronic phase of colitis. Accordingly, therapeutic targeting of DCs by MSCs could be explored in future studies as a useful approach for the treatment of chronic colitis.

### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

Authors declare there is no conflict of interest.

### Acknowledgments

This work was supported by Swiss National Science Foundation project (SCOPE5 IZ73Z0.152454/1), Novartis foundation for medical-biological research (Grant No.16C197), Serbian Ministry of Science (ON175069, ON175103) and Faculty of Medical Sciences University of Kragujevac (JP 02/09).

### References

- N. Goyal, A. Rana, A. Ahlawat, K.R.V. Bijjem, P. Kumar, Animal models of inflammatory bowel disease: a review, *Inflammopharmacology* 22 (2014) 219–233, <http://dx.doi.org/10.1007/s10787-014-0207-y>.
- I. Okayasu, S. Hatakeyama, M. Yamada, T. Ohkusa, Y. Inagaki, R. Nakaya, A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice, *Gastroenterology* 98 (1990) 694–702 doi: S0016508590000725 [pii].
- M. Peše, A. Cerar, Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks, *J. Biomed. Biotechnol.* 2012 (2012) 1–13, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/718617>.
- K. Abe, K.P. Nguyen, S.D. Fine, J.-H. Mo, C. Shen, S. Shenouda, M. Corr, S. Jung, J. Lee, L. Lckmann, E. Raz, Conventional dendritic cells regulate the outcome of colonic inflammation independently of T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 17022–17027, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0708469104>.
- M. Rescigno, A. Di Sabatino, Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 2441–2450, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI39134>.
- B.F. Berndt, M. Zhang, G.-H. Chen, G.B. Huffnagle, J.Y. Kao, The role of dendritic cells in the development of acute dextran sulfate sodium colitis, *J. Immunol.* 179 (2007) 6255–6262, <http://dx.doi.org/10.1004/jimmunol.179.9.6255>.
- J.F. Qualls, H. Yama, A.M. Kaplan, D.A. Cohen, Suppression of experimental colitis in mice by CD11c+ dendritic cells, *Inflamm. Bowel Dis.* 15 (2009) 236–247, <http://dx.doi.org/10.1002/ibd.20733>.
- J.A. Ankrum, J.F. Ong, J.M. Karp, Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged, *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 252–260, <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2816>.
- A.I. Caplan, J.E. Dennis, Mesenchymal stem cells as trophic mediators, *J. Cell. Biochem.* 98 (2006) 1076–1084, <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.20886>.
- M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C. Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, L.M. Hiorwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy* 8 (2006) 315–317, <http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- M. Gazdic, V. Volarevic, N. Arsenijevic, M. Stojkovic, Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases, *Stem Cell Rev.* 11 (2015) 280–287, <http://dx.doi.org/10.1007/s12015-014-9583-3>.
- D. Kyurkchiev, Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells, *World J. Stem Cells* 6 (2014) 552, <http://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.552>.
- G.M. Spaggiari, L. Moretta, Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity, *Immunol. Cell Biol.* 91 (2013) 27–31, <http://dx.doi.org/10.1038/icc.2012.62>.
- Y. Wang, X. Chen, W. Cao, Y. Shi, Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications, *Nat. Immunol.* 15 (2014) 1009–1016, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.3002>.
- Y. Chen, Y. Song, H. Miao, Y. Xu, M. Lv, T. Wang, Y. Hou, Gene delivery with IFN- $\gamma$  expression plasmids enhances the therapeutic effects of MSCs on DSS-induced mouse colitis, *Inflamm. Res.* 64 (2015) 671–681, <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-015-0845-6>.
- M. Duijvestein, M.E. Wildenberg, M.M. Welling, S. Hennink, I. Molendijk, V.L. van Zuylen, T. Bosse, A.C.W. Vos, E.S.M. de Jonge-Muller, H. Roclofs, L. van der Weerd, H.W. Verspaget, W.E. Fibbe, A.A. te Velde, G.R. van den Brink, D.W. Hommes, Pretreatment with interferon- $\gamma$  enhances the therapeutic activity of mesenchymal stromal cells in animal models of colitis, *Stem Cells* 29 (2011) 1549–1558, <http://dx.doi.org/10.1002/stem.698>.
- H. Fan, G. Zhao, L. Liu, F. Liu, W. Gong, X. Liu, L. Yang, J. Wang, Y. Hou, Pretreatment with IL-1 $\beta$  enhances the efficacy of MSC transplantation in DSS-induced colitis, *Cell. Mol. Immunol.* 9 (2012) 473–481, <http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2012.40>.
- F. Gonzalez-Rey, M. Delgado, B. Christ, J. Oerlecke, P. Stock (Eds.), *Therapeutic Application of Mesenchymal Stromal Cells in Murine Models of Inflammatory Bowel Disease*, Springer New York, New York, NY, 2014, pp. 331–339, [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1453-1\\_27](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-1453-1_27).
- W. Liu, S. Zhang, S. Gu, L. Sang, C. Dai, Mesenchymal stem cells recruit macrophages to alleviate experimental colitis through TGF $\beta$ 1, *Cell. Physiol. Biochem.* 35 (2015) 858–865, <http://dx.doi.org/10.1159/000369743>.
- F. Sala, M. Genua, L. Petri, A. Anselmo, V. Arena, J. Cibella, I. Zanotti, S. D'Alessio, F. Scaldaferrri, G. Luca, I. Arato, R. Calafiore, A. Sgambato, S. Rutella, M. Locati, S. Danese, S. Vetrano, Mesenchymal stem cells reduce colitis in mice via release of lsg6, independently of their localization to the intestine, *Gastroenterology* 149 (2015) 163–176, <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2015.03.013>.
- B. Simovic Markovic, A. Nikolic, M. Gazdic, J. Nurkovic, I. Djordjevic, N. Arsenijevic, M. Stojkovic, M.L. Lukic, V. Volarevic, Pharmacological inhibition of Gal-3 in mesenchymal stem cells enhances their capacity to promote alternative activation of macrophages in dextran sulphate sodium-induced colitis, *Stem Cells Int.* 2016 (2016) 2640746, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2640746>.
- J.M. Đokić, S.Z. Tomić, M.J. Čolić, Cross-talk between mesenchymal stem/stromal cells and dendritic cells, *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 11 (2016) 61–65, <http://dx.doi.org/10.2174/1574889X10666150904114035>.
- G.M. Spaggiari, H. Abdelrazik, F. Becchetti, L. Moretta, MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: Central role of MSC-derived prostaglandin E2, *Blood* 113 (2009) 6576–6583, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-02-203943>.
- C. Wang, J. Chen, L. Sun, Y. Liu, TGF- $\beta$  signaling-dependent alleviation of dextran sulfate sodium-induced colitis by mesenchymal stem cell transplantation, *Mol. Biol. Rep.* 41 (2014) 4977–4983, <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-014-3364-6>.
- B. Simovic Markovic, A. Nikolic, M. Gazdic, S. Bojic, L. Vucicevic, M. Kosic, S. Mitrovic, M. Milosavljevic, G. Besta, V. Trajkovic, N. Arsenijevic, M.I. Lukic, V. Volarevic, Galectin-3 plays an important pro-inflammatory role in the induction phase of acute colitis by promoting activation of NLRP3 inflammasome and production of IL-1 $\beta$  in macrophages, *J. Crohns Colitis* 10 (2016) 593–606, <http://dx.doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw013>.
- X.-X. Jiang, Y. Zhang, B. Liu, S.-X. Zhang, Y. Wu, X.-D. Yu, N. Mao, Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells, *Blood* 105 (2005) 4120–4126, <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2004-02-0586>.
- P. Chen, Y. Huang, K.L. Womer, Effects of mesenchymal stromal cells on human myeloid dendritic cell differentiation and maturation in a humanized mouse model, *J. Immunol. Methods* 427 (2015) 100–104, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2015.10.008>.
- M. Wang, C. Liang, H. Hu, L. Zhou, B. Xu, X. Wang, Y. Han, Y. Nie, S. Jia, J. Liang, K. Wu, Intraepitonal injection (IP), intravenous injection (IV) or anal injection (AI)? Best way for mesenchymal stem cells transplantation for colitis, *Sci. Rep.* 6 (2016) 30696, <http://dx.doi.org/10.1038/srep30696>.
- G.-Y. Liu, Y. Xu, Y. Li, L.-H. Wang, Y.-J. Liu, D. Zhu, Secreted galectin-3 as a possible biomarker for the immunomodulatory potential of human umbilical cord mesenchymal stromal cells, *Cytotherapy* 15 (2013) 1208–1217, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.05.011>.
- M.L. Ferrmino, L.S.D. Dylon, N.T. Cecilio, S.N. Santos, M.A. Toscano, M. Dias-Baruffi, M.C. Roque-Barreira, G.A. Rabinovich, L.S. Bernardes, Lack of galectin-3 increases Jagged1/Notch activation in bone marrow-derived dendritic cells and promotes dysregulation of T helper cell polarization, *Mol. Immunol.* 76 (2016) 22–34, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2016.06.005>.
- M. Sioud, New insights into mesenchymal stromal cell-mediated T-cell suppression through galectins, *Scand. J. Immunol.* 73 (2011) 79–84, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2010.02491.x>.
- M. Sioud, A. Mobergslie, A. Boudabous, Y. Fløisand, Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins, *Int. J. Oncol.* 38 (2011) 385–390, <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2010.869>.
- G. Radosavljevic, V. Volarevic, I. Jovanovic, M. Milovanovic, N. Pejnovic, N. Arsenijevic, D.K. Hsu, M.L. Lukic, The roles of galectin-3 in autoimmunity and tumor progression, *Immunol. Res.* 52 (2012) 100–110, <http://dx.doi.org/10.1007/s12026-012-8286-6>.
- L. Breuilh, F. Vanhoutte, J. Fontaine, C.M. van Stijn, I. Tillie-Leblond, M. Capron, C. Paveeuw, T. Jouault, I. van Die, P. Gosset, F. Trottein, Galectin-3 modulates immune and inflammatory responses during helminth infection: impact of galectin-3 deficiency on the functions of dendritic cells, *Infect. Immun.* 75 (2007) 5148–5157, <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.02006-06>.
- B.N. Stillman, D.K. Hsu, M. Pang, C.F. Brewer, P. Johnson, F.T. Liu, L.G. Baum, Galectin-3 and galectin-1 bind distinct cell surface glycoprotein receptors to induce T cell death, *J. Immunol.* 176 (2006) 778–789.