



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

**Марина М. Газдић**

**Ефекат мезенхималних матичних ћелија на оштећење јетре**  
**узроковано**  
**активацијом НКТ ћелија**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

**Ментор: Др сци. мед. Владислав Воларевић, ванредни професор**

**Крагујевац, 2017. године**

# САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. АКУТНИ ХЕПАТИТИС</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Дефиниција и етиологија.....	1
1.1.2. Клиничка слика .....	2
1.1.5. Терапија и прогноза .....	2
<b>1.2. УРОБЕНО УБИЛАЧКЕ Т ЋЕЛИЈЕ</b> .....	<b>3</b>
1.2.1. Активација НКТ ћелија.....	4
1.2.2. Интеракција НКТ ћелија са ћелијама имунског система.....	5
1.2.3. Улога НКТ ћелија у акутном хепатитису.....	6
<b>1.3. РЕГУЛАТОРНИ Т ЛИМФОЦИТИ</b> .....	<b>7</b>
1.3.1. Улога Трег лимфоцита у болестима јетре и интеракција са НКТ ћелијама.....	8
<b>1.4. РЕГУЛАТОРНИ В ЛИМФОЦИТИ</b> .....	<b>10</b>
1.4.1. Улога Врег лимфоцита у болестима јетре и интеракција са НКТ ћелијама.....	11
<b>1.5. АНИМАЛНИ МОДЕЛИ АКУТНОГ ХЕПАТИТИСА         ИЗАЗВАНИ АКТИВАЦИЈОМ НКТ ЋЕЛИЈА</b> .....	<b>13</b>
1.5.1. Соп А хепатитис.....	13
1.5.2. $\alpha$ -GalCer хепатитис.....	15
<b>1.6. МЕЗЕНХИМАЛНЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ</b> .....	<b>18</b>
1.6.1. Порекло и извори MSCs.....	19
1.6.2. Карактеристике MSCs.....	20
<b>1.7. ИМУНОМОДУЛАТОРНА СВОЈСТВА MSCs</b> .....	<b>23</b>
1.7.1. Молекуларни механизми супресије Т лимфоцита.....	28
1.7.2. Значај интеракције MSCs и дендритских ћелија у инфламацији изазваној активацијом Т лимфоцита.....	29
1.7.3. MSCs смањују цитотоксички потенцијал Т лимфоцита и НК ћелија.....	30
1.7.4. Молекуларни механизми којим MSCs супримирају макрофаге.....	31
1.7.5. Молекуларни механизми којим MSCs супримирају В лимфоците.....	31
<b>1.8. ИМУНОМОДУЛАТОРНИ ЕФЕКАТ MSCs У         АКУТНОМ ХЕПАТИТИСУ</b> .....	<b>32</b>
<b>2. ЦИЉ РАДА</b> .....	<b>37</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1. Ћелијска линија мишјих мезенхималних матичних         ћелија</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2. Ћелијска линија хуманих мезенхималних матичних         ћелија</b> .....	<b>38</b>
<b>3.3. Ћелијска линија хуманог карцинома јетре (HepG2)</b> .....	<b>39</b>
<b>3.4. Изолација мишјих хепатоцита</b> .....	<b>39</b>
<b>3.5. Инхибиција индоламин-2, 3 диоксигеназе</b> .....	<b>39</b>
<b>3.6. Инхибиција индуцибилне азот оксид синтазе</b> .....	<b>40</b>
<b>3.7. Кондиционирани медијум генерисан од MSCs</b> .....	<b>40</b>
<b>3.8. Експерименталне животиње</b> .....	<b>41</b>

3.9.	Индукција експерименталног фулминантног хепатитиса конканавалином А.....	42
3.10.	Индукција експерименталног фулминантног хепатитиса $\alpha$ -галактоцерамидом.....	42
3.11.	Апликација mMSCs.....	42
3.12.	Детекција трансплантираних mMSCs у ткиву јетре.....	43
3.13.	Деплеција регулаторних лимфоцита.....	43
3.14.	Биохемијска анализа оштећења јетре.....	43
3.15.	Патохистолошка анализа.....	44
	3.15.1. Израда патохистолошких препарата.....	44
	3.15.2. Бојење хематоксилином и еозином (H&E).....	44
3.16.	Изолација мононуклеарних ћелија из јетре .....	45
3.17.	Анализа популација мононуклеарних ћелија јетре проточном цитометријом.....	46
	3.17.1. Бојење мембранских маркера.....	46
	3.17.2. Интрацелуларно бојење цитокина.....	49
3.18.	Сепарација NKT ћелија негативном и позитивном селекцијом помоћу магнетних куглица.....	51
3.19.	Изолација спленocyта.....	52
3.20.	Издвајање регулаторних Т лимфоцита негативном и позитивном селекцијом помоћу магнетних куглица.....	53
3.21.	Изолација PBMNC.....	54
3.22.	Кокултивација NKT ћелија и MSCs.....	54
3.23.	Кокултивација Т регулаторних лимфоцита и mMSCs.....	55
3.24.	Адоптивни трансфер регулаторних лимфоцита.....	55
3.25.	Тест цитотоксичности.....	55
3.26.	Мерење концентрације цитокина и имуносупресивних фактора које продукују MSCs у серуму и супернатанту.....	56
3.27.	Мерење концентрације кинуренина.....	58
3.28.	Полимеризована ланчана реакција (PCR).....	59
	3.28.1. Изолација РНК.....	59
	3.28.2. Реверзна транскрипција.....	59
	3.28.3. Реакција ланчаног умножавања у реалном времену (RT-PCR, <i>real time polymerase chain reaction</i> ).....	60
3.29.	Статистичка обрада података.....	60
4.	РЕЗУЛТАТИ .....	61
4.1.	Интравенски трансплантиране mMSCs мигрирају у јетру и значајно смањују оштећење јетре изазвано Cop A.....	61
	4.1.1. Концентрације проинфламацијских цитокина TN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ и IL-4 су мање док је концентрација антиинфламацијског IL-10 већа након примене mMSCs.....	63
4.2.	Примена mMSCs смањује инфламацију у јетри мишева којима је хепатитис изазван апликацијом Cop A.....	64
	4.2.1. mMSCs значајно смањују инфилтрацију инфламацијских NKT ћелија у јетри.....	64
	4.2.2. mMSCs значајно смањују инфлукс макрофага и дендритских ћелија у јетру.....	66
4.3.	Примена mMSCs значајно смањује оштећење јетре изазвано $\alpha$ -GalCer-ом.....	67

4.3.1.	Примена mMSCs смањује концентрацију TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ и IL-4 у серуму.....	70
4.3.2.	mMSCs смањују инфлукс NKT ћелија које продукују проинфламацијске цитокине.....	71
4.3.3.	Примена mMSCs не мења заступљеност дендритских ћелија у јетри мишева којима је хепатитис изазван $\alpha$ -GalCer-ом.....	73
4.3.4.	Интравенска апликација mMSCs смањује цитотоксичку активност NKT ћелија јетре.....	74
4.3.5.	Примена mMSCs смањује процентуалну заступљеност FasL, TRAIL и CD107, али не утиче на заступљеност перфорина, гранзима B, NKG2D и KLRG1 на NKT ћелијама у јетри мишева.....	76
4.3.6.	Примена mMSCs повећава број регулаторних лимфоцита у јетри мишева којима је изазван хепатитис.....	77
4.3.7.	Деплеција Treg лимфоцита циклофосфамидом значајно смањује капацитет mMSCs да редукују оштећење јетре узроковано активацијом NKT ћелија.....	79
4.3.8.	Супресија хепатотоксичности NKT ћелија мезенхималним матичним ћелијама је значајно смањена након деплеције Treg лимфоцита циклофосфамидом.....	81
4.3.9.	Примена mMSCs значајно повећава број Breg лимфоцита у јетри оболелих мишева којима су Treg лимфоцити деплетирани циклофосфамидом.....	82
4.3.10.	Недостатак Breg лимфоцита не утиче на хепатопротективан ефекат mMSCs у акутном хепатитису.....	83
4.3.11.	Деплеција Breg лимфоцита anti-CD20 антителом не утиче на супресивни ефекат mMSCs на хепатотоксичност NKT ћелија.....	86
4.3.12.	Примена MSCs супримира проапоптотске гене.....	89
<b>4.4.</b>	<b>mMSCs супримирају NKT ћелије паракриним механизмом.....</b>	<b>91</b>
4.4.1.	mMSCs повећавају број регулаторних ћелија у јетри посредством солубилних фактора.....	95
<b>4.5.</b>	<b>mMSCs супримирају NKT ћелије активношћу ензима IDO и iNOS.....</b>	<b>96</b>
4.5.1.	Ефекат mMSC-СМ на експанзију Treg лимфоцита се губи у присуству 1-метил триптофана.....	100
<b>4.6.</b>	<b>mMSCs модулирају функције NKT ћелија у хепатитису изазваном Cop A активношћу ензима IDO и iNOS.....</b>	<b>103</b>
<b>4.7.</b>	<b>Продукцијом IDO и iNOS hMSCs модулирају ефекторске функције <math>\alpha</math>-GalCer-ом стимулираних хуманих PBMNCs.....</b>	<b>107</b>
<b>5.</b>	<b>ДИСКУСИЈА .....</b>	<b>110</b>
<b>5.1.</b>	<b>Интравенски трансплантиране mMSCs мигрирају у јетру и смањују акутно оштећење јетре мишева.....</b>	<b>110</b>

<b>5.2. Примена MSCs смањује инфламацију у јетри.....</b>	<b>111</b>
<b>5.3. Примена MSCs смањује апоптозу у јетри.....</b>	<b>113</b>
<b>5.4. MSCs супримирају ефекторске функције NKT ћелије паракриним механизмом.....</b>	<b>114</b>
<b>5.5. Фармаколошка инаktivација IDO и iNOS у MSCs смањује имуномодулаторни ефекат MSCs на NKT ћелије.....</b>	<b>114</b>
<b>6.ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	<b>119</b>
<b>СКРАЋЕНИЦЕ .....</b>	<b>120</b>
<b>7.РЕФЕРЕНЦЕ.....</b>	<b>121</b>

## 1. УВОД

У уводном делу су објашњене етиологија, клиничка слика и прогноза акутног хепатитиса код људи са посебним аспектом на значај урођено убилачких Т ћелија у имунопатогенези ове болести, описана је патогенеза експерименталног аутоимунског хепатитиса, биолошки ефекти мезенхималних матичних ћелија, а посебно његов имуномодулаторни утицај на имунски одговор у акутном хепатитису.

### 1.1. АКУТНИ ХЕПАТИТИС

#### 1.1.1. Дефиниција и етиологија

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

Најчешћи узрочници фулминантног хепатитиса су вируси, лекови, токсичне ноксе и метаболичке болести, док у 40-50% случајева етиологија ове болести остаје непозната (2, 3). Вируси хепатитиса А, В, С и Е су чест узрок фулминантног хепатитиса у земљама у развоју, и то претежно код млађих особа. Инфекција хепатотропним вирусима као што су парво вирус В19 и херпес вируси, такође може изазвати симптоме фулминантног хепатитиса (4-6). У развијеним земљама, код преко 50% оболелих, акутно оштећење јетре је последица токсичног дејства лекова. Резултати многих истраживања показују да најизраженије хепатотоксичне ефекте има парацетамол, као и лекови из групе антитуберкулотика, антипсихотика, антибиотика и аминосалицилата и дроге (екстази (3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine, MDMA) и кокаин (benzoylmethylecgonine)) (7-8). Потенцијални узрочници фулминантног хепатитиса у мањем проценту су и аутоимунски хепатитис, исхемијске, малигне и друге болести јетре (9, 10).

### **1.1.2. Клиничка слика**

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

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

### **1.1.3. Терапија и прогноза**

Смртност оболелих од овог клиничког облика хепатитиса се креће од 50% до 90%, према различитим наводима у литератури (1-3,11). Конзервативне, симптоматске и супортивне терапијске мере остају углавном без успеха када су у питању вирусни хепатитиси, док се код токсичних хепатитиса отвара питање специфичне, антитоксичне терапије, уколико она постоји за дотичну токсичну ноксу. Примена биоартефицијелне јетре знатно је утицала на смањење смртности.

Иако је најефикаснија терапија фулминантног хепатитиса хитна трансплантација јетре, ограничења попут недовољног броја донатора органа, финансијски разлози и неопходност доживотне имуносупресије, чине да терапија матичним ћелијама завређује све више пажње у лечењу ове болести. Због тога се бројна истраживања раде на анималним моделима у циљу проналажења нових терапијских агенаса ефикасних у превенцији или лечењу фулминантног хепатитиса људи.

## 1.2. УРОЂЕНОУБИЛАЧКЕ Т ЋЕЛИЈЕ

Урођено убилачке Т ћелије (енгл. *Natural Killer T cells*, NKT) представљају популацију ћелија урођене имуности са јединственим имуномодулаторним карактеристикама (12). Осим рецептора Т лимфоцита (енгл. *T cell receptor*, TCR), NKT ћелије експримирају и маркере NK ћелија као што су NK1.1, CD49b, NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2E и Ly49a код миша, односно CD161, CD56 и CD16 код људи (13, 14). Међутим, за разлику од Т лимфоцита који препознају пептидне антигене у контексту главног комплекса хистокompatибилности I или II класе, NKT ћелије препознају липидне антигене презентоване у склопу молекула CD1d (енгл. *Cluster of Differentiation 1 d*) на мембрани ћелија које презентују антигене (енгл. *antigen-presenting cells*, APC) (13, 14). На основу карактеристика TCR-а и реактивности на липидне антигене, NKT ћелије су подељене на тип I и тип II (15). NKT ћелије тип I, које се називају још и инваријантне NKT ћелије (енгл. *invariant NKT cells*, iNKT) експримирају инваријантни  $\alpha$  ланац TCR-а, који настаје реаранжирањем V $\alpha$ 14–J $\alpha$ 18 ланца код мишева, односно хомолог V $\alpha$ 24–J $\alpha$ 18 ланца код људи (16). Инваријантни  $\alpha$  ланац TCR-а упарује се са  $\beta$  ланцем који има ограничену хетерогеност, и означен је као V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7 или V $\beta$ 2 ланац код мишева, и V $\beta$ 11 код људи (16, 17). Једна од главних имунолошких карактеристика ових ћелија је да препознају гликолипид  $\alpha$ -галактоцерамид (енгл.  *$\alpha$ -galactosylceramide*,  $\alpha$ -GalCer) презентован у склопу CD1d молекула (16).  $\alpha$ -GalCer је ендогени лиганд iNKT ћелија кога продукују имунске ћелије (18). Са друге стране, људске и мишје NKT ћелије тип II такође препознају CD1d молекулу, међутим, експримирају TCR веће разноликости и не препознају  $\alpha$ -GalCer (19, 20). Овај тип NKT ћелија препознаје широк спектар хидрофобних антигена попут сулфатида и лизофосфатидилхолина (21, 22). Због техничких препрека, као што су изражено неспецифично бојење и нестабилност сулфатид/CD1d тетрамер комплекса, имунобиологија NKT ћелија типа II је много мање испитана (15, 23). У циљу испитивања значаја обе популације NKT ћелија у патогенези различитих болести, последњих година у истраживањима се користе CD1d дефицијенти мишеви којим недостају оба типа NKT ћелија, као и J $\alpha$ 18-дефицијенти мишеви којима недостају само NKT ћелије тип I (24, 25, 26). Предмет испитивања у овде приказаној студији, био је имунски одговор у коме учествују iNKT ћелије. iNKT ћелије настају у тимусу диференцијацијом хематопоезних прекурсора, где подлежу позитивној селекцији преко CD1d молекула експримираног на површини CD4+CD8+ тимоцита (27). У негативној селекцији iNKT ћелија у тимусу учествују



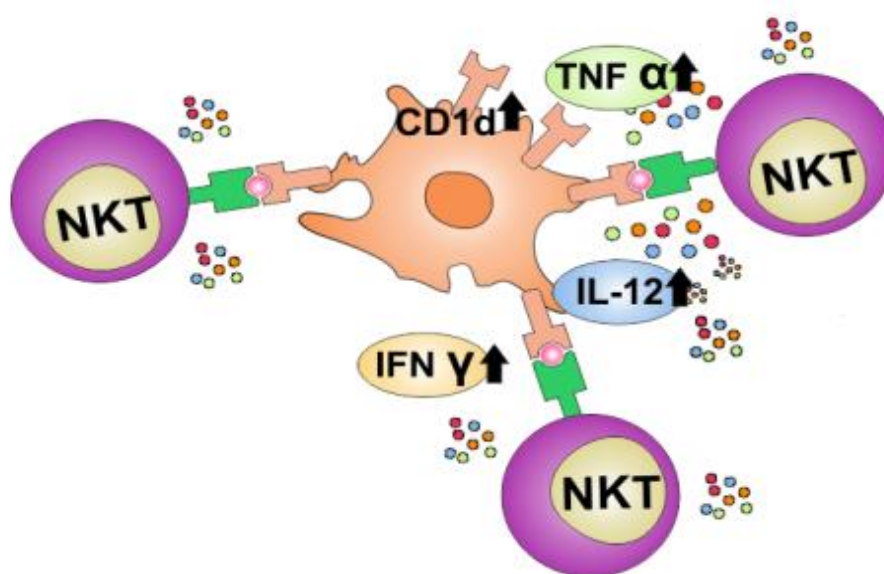
CD1d+ дендритске ћелије (28). Након тога iNKT ћелије мигрирају у периферне органе (29). Код мишева, iNKT ћелије су најзаступљеније у јетри где чине 15-30% укупних лимфоцита, док је њихова процентуална заступљеност у другим органима знатно мања-0.2–0.5% у тимусу, слезини, костној сржи и цревима, 1% у крви, 0.1–0.2% у лимфним чворовима (30). Код мишева је највећа заступљеност iNKT ћелија забележена у оментуму (~10%) и јетри (~1%) (30). Такође је познато да је заступљеност iNKT ћелија у слезини, крви, костној сржи и лимфним чворовима људи у распону од 0.01–0.5% (15). Иако је проценат различит, укупан број ових ћелија у поменутиим органима је сличан и износи око милион ћелија по органу (31).

### 1.2.1.Активација NKT ћелија

NKT ћелије се активирају након што TCR-ом препознају липидне антигене презентоване у склопу CD1 молекула на APC (32, 33). Осим на тај начин, NKT ћелије могу да буду активирани и цитокинима IL-12 или IL-2 које секретују APC (Купферове ћелије, хепатоцити, дендритске ћелије) након стимулације TLR сигналног пута (34, 23). CD1 је фамилија површинских гликопротеина експримирана на површини APC, слична класичном MHC молекулу I класе (35). Код људи, CD1 молекул постоји у неколико изоформи CD1a, -b, -c, -d и -e. Код мишева је међутим експримиран само CD1d (36, 37). У склопу свих CD1d молекула су презентовани липидни антигени T лимфоцитима који не експримирају MHC молекул (23). Хемијске групе, укључујући ендogene липиде, сфинголипиде и глицеролипиде, као и егзогене липиде као што су антигени микроорганизама *Sphingomonas spp*, *Borrelia burgdorferi*, *Streptococcus pneumonia*, *Helicobacter pylori* везују се за CD1d молекул и стимулишу NKT ћелије (12). Због ограничене разноликости TCR рецептора, NKT се сматрају ћелијама урођене имуности, и реагују на само неколико липидних антигена (14). Гликолипид  $\alpha$ -галактоцерамид (енгл.  *$\alpha$ -galactosylceramide*,  $\alpha$ -GalCer), првобитно изолован из морског сунђера као и његова вештачки синтетисана форма KRN7000, представљају специфичне егзогене лиганде за хумане и мишје NKT ћелије (17). Међутим, недавним студијама је идентификован метаболички пут у имунским ћелијама којим настају ендогени лиганди NKT ћелија,  $\alpha$ -GluCer и  $\alpha$ -GalCer (18). Откриће ендогеног  $\alpha$ -GalCer-а чини употребу овог једињења погодним за испитивање биологије NKT ћелија. Мишје NKT ћелије препознају хумани CD1d молекул и обратно (38), што додатно истиче

физиолошку релевантност мишјих модела за испитивање улоге NKT ћелија у имунском одговору.

Активација NKT ћелија  $\alpha$ -GalCer-ом узрокује брзу продукцију Th1- и Th2 цитокина, укључујући IL-4 и IFN- $\gamma$  (13, 33). Овакав одговор дешава се неколико сати након активације, обзиром да NKT ћелије конститутивно експримирају mRNAs за поменуте цитокине (33). Осим тога, активирани NKT ћелије производе бројне друге цитокине као што су IL-10, IL-3, IL-5, IL-9, IL-13, TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-2, IL-21, IL-22 и GM-CSF (39, 23).



Слика 1. Механизам активације NKT ћелија.

### 1.2.2. Интеракција NKT ћелија са ћелијама имунског система

Конверзијом у Th1, Th2 или Th17 цитокински профил, NKT ћелије модулирају како урођени тако и стечени имунски одговор (40, 41, 42). Показано је NKT ћелије продукцијом цитокина или директним контактом утичу на мобилизацију и активацију NK ћелија, CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита, макрофага, неутрофила и еозинофила (43, 44, 45, 46, 47). IFN- $\gamma$  који производе NKT ћелије појачава фагоцитну способност макрофага у плућима као и њихов капацитет да елиминишу бактерије, и уједно мобилише и активира NK ћелије и CD8<sup>+</sup> Т лимфоците (48, 49, 50). Такође, *in vitro* је забележено да NKT ћелије активирају В лимфоците, промовишу њихову пролиферацију и продукцију антитела (51). Интеракцијом CD40L-CD40, NKT ћелије стимулишу

дендритске ћелије (енгл. *dendritic cells*, DCs) да продукују IL-12, који је важан за одржавање и активацију iNKT ћелија (52). Директни контакт NKT ћелија и IL10+ неутрофила, узрокује конверзију имуносупресивних неутрофила у ћелије које продукују IL-12 и промовишу инфламацију (53). Истовремено, такође директним контактом, неутрофили супримирају продукцију цитокина у мишићим и људским NKT ћелијама, за сада још увек недовољно познатим механизмом (54). NKT ћелије експримирају FAS лиганд (енгл. *FAS ligand*, FASL) као и серин протеазе (перфорин и гранзим), којим активацијом TNF-индукованим, перфорин-посредованим и CD95–CD95L-посредованим механизмом убијају ћелије паренхима јетре (39, 34, 55). Дакле, овом интеракцијом NKT и имунских ћелија, NKT значајно утичу на ток како урођеног тако и стеченог имунског одговора у јетри.

### **1.2.3. Улога NKT ћелија у акутном хепатитису**

NKT ћелије играју важну улогу у патогенези многих обољења јетре код људи. Показано је да је код пацијената оболелих од РВС у поређењу са здравим људима процентуална заступљеност NKT ћелија око интерлобуларних билијарних каналића значајно већа (56). Квантитативне студије у којима је анализиран број NKT ћелија у јетри и крви пацијената одолелих од РВС и здравих контрола, указале су на изражену редистрибуцију ових ћелија из крви у јетру (57). Такође, број NKT ћелија у периферној крви особа оболелих од стеатозе јетре је значајно смањен у односу на број NKT ћелија у крви здравих, што указује на мобилизацију NKT ћелија са периферије у оболелу јетру (58). Повећан број хепатичних NKT ћелија уједно је праћен већом експресијом CD1d молекула на мембрани Купферових ћелија (59, 60). У складу са овим налазом, у узорцима јетри деце оболеле од аутоимунског хепатитиса детектован је пораст броја NKT ћелија, док је у периферној крви њихов број био смањен у поређењу са здравом контролом (61).

Број хепатичних NKT ћелија се са развојем болести повећава и у јетри пацијената оболелих од хроничног вирусног хепатитиса (HCV и HBV), а хроничитет ове болести јетре карактерише упечатљиви пораст експресије CD1d на APC у јетри (62, 63). У складу са тим, код пацијентата оболелих од ове болести који добро реагују на примењену анти-вирусну терапију детектовано је статистички значајно смањење броја NKT ћелија у јетри, у поређењу са пацијентима који лошије реагују на терапију (64).

Због својих различитих имуномодулаторних и ефекторских функција, NKT ћелије могу имати и проинфламацијску и антиинфламацијску регулаторну улогу у јетри. Поред познатих протективног ефекта хепатичних NKT ћелија током урођеног имунског одговора на вирусну инфекцију и тумор, већина до данас објављених студија указује да NKT ћелије директно или индиректно доприносе равоју болести јетре (65). Агресивна улога ових ћелија у болестима јетре показана је у више анималних модела, као што су анимални модел HBV инфекције (66), примарне билијарне цирозе (67), оштећења јетре изаваних угљен тетра хлоридом (68), односно тиацетамидом (69), ако и у моделу неалкохолне стеатозе јетре (70). Значај активације NKT ћелија у патогенези болести јетре је потврђена и у мишјем моделу примарне билијарне цирозе (71, 72), акутног хепатитиса изазваног конканавалином А (73, 74) и  $\alpha$ -галактоцерамидом (75, 76), хроничном оштећењу јетре индукованом алкохолом (77), као и у различитим моделима масне (78, 79) и исхемијске болести јетре (80, 81, 82).

### 1.3. РЕГУЛАТОРНИ Т ЛИМФОЦИТИ

Регулаторни Т лимфоцити (енгл. *regulatory T cells*, Treg) представљају субпопулацију Т лимфоцита која има важну улогу у супресији имунског одговора. Treg лимфоцити се могу поделити на урођене Treg лимфоците који своје регулаторне функције стичу у тимусу (83) и индуцибилне Treg лимфоците који настају диференцијацијом зрелих конвенционалних Т лимфоцита под специфичним условима субоптималног излагања антигенима и/или костимулацији (84). Treg лимфоците карактерише експресија молекула CD25 ( $\alpha$  ланац рецептора за интерлеукин 2), CTLA-4 (енгл. *cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) и GITR (енгл. *glucocorticoid induced TNRF family related gene*) (84). Међутим, специфичним маркером ових ћелија сматра се транскрипциони фактор Foxp3 (енгл. *Forkhead helix transcription factor p3*) који супримира гене за IL-2, IL-4 и IFN- $\gamma$ , стога је важан фактор настанка, развоја и супресорских функција Treg лимфоцита (85). Инхибирањем транскрипције гена за IL-2 као и за рецептор за IL-2, Treg лимфоцити спречавају пролиферацију (86), док посредством CTLA-4 и мембранског TGF- $\beta$  заустављају активацију лимфоцита (87). Помоћу гранзима или активацијом рецептора смрти Treg лимфоцити убијају Т лимфоците као и ћелије које презентују антигене (88). Директним контактом са дендритским ћелијама Treg лимфоцити повећавају експресију гена за индоламин-2,3-диоксигеназу (енгл. *indolamine 2,3-dyoxigenase*, IDO) у дендритским ћелијама. IDO разграђује есенцијални

триптофан и узрокује настанак имуносупресивних метаболита што за последицу има супресију функција ефекторских Т лимфоцита (89). Експресијом молекула CD39 и CD73 Treg лимфоцити разграђују аденозинтрифосфат (енгл. *adenosine triphosphate*, АТР) до аденозина који такође супримира ефекторске Т лимфоците (90). Осим поменутих имуномодулаторних ефеката, показано је да Treg лимфоцити инхибирају синтезу и промену класе антитела В лимфоцита (91), смањују цитотоксичку активност НК (92) и НКТ ћелија (93), као и функцију дендритских ћелија (94).

### **1.3.1. Улога Treg лимфоцита у болестима јетре и интеракција са НКТ ћелијама**

Treg лимфоцити чине од 0.5% до 1% укупног броја лимфоцита присутних у јетри здравих људи (95). Фактори који контролишу миграцију и задржавање Treg лимфоцита у инфламираној јетри као и улога ове популације ћелија у супресији имунског одговора у јетри још увек је предмет интензивног истраживања. Познато је да је у периферној крви оболелих од аутоимунског хепатитиса и примарне билијарне цирозе број Treg лимфоцита значајно мањи у поређењу са бројем ових ћелија у крви здравих особа (96, 97, 98, 99). Повећање броја ових ћелија у јетри повезан је са мањим оштећењем, док је мали број Treg лимфоцита праћен већом некрозом хепатоцита (100). Повећаван инфлукс протективних Treg лимфоцита у јетру настаје услед интеракције Е кадхерина експримираног на ендотелу и CD103 молекула исказаног на мембрани Treg лимфоцита (101, 102). У експериментима на животињама је показано да деплеција Treg лимфоцита, применом анти-CD25 антитела узрокује дисеминовану некрозу хепатоцита, док адаптивни трансфер CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Т ћелија, редукује оштећење јетре мишева изазвано применом Con A (100). Treg лимфоцити штите хепатоците на тај начин што супримирају ефекторске Т лимфоците који су инфилтрисали инфламирану јетру: директно, интеракцијом CTLA-4 молекула на Treg лимфоцитима и његових лиганата CD80 и CD86 на ефекторским Т лимфоцитима, или индиректно, секрецијом TGF-β (100). Wei и сарадници су показали да у животиња са делецијом гена за TGF-beta рецептор (TGFβRII *knockout*) након примене Con A настаје тешка дисеминована некроза хепатоцита и праћена високим морталитетом (100).

Иако Treg и НКТ ћелије могу независно регулисати имунски одговор, недавно објављене студије указују на значајну улогу интеракције ове две популације ћелије током инфламацијског одговора у јетри. Код оболелих од аутоимунског хепатитиса и примарне билијарне цирозе број и имунорегулаторна функција Treg лимфоцита су

смањени (103, 104) док је број NKT ћелија, главних ефекторских ћелија у овим болестима повећан (57, 105, 106). Дакле, поремећен однос и измењена интеракција Treg и NKT ћелија значајно доприноси патогенези аутоимунских болести јетре. У моделу акутног хепатитиса је показано да  $\alpha$ -GalCer-ом стимулисане NKT ћелије масовно мобилишу Treg лимфоците у јетру, што наводи на закључак да су NKT ћелије главни координатори запаљења у јетри, не само због својих добро познатих проинфламацијских својстава, већ и због чињенице да регулишу накопљање имunosупресивних Treg у јетру. Стимулисане NKT ћелије секретују IFN- $\gamma$  којим се активира цитокинско-хемокинска каскада одговорна за *homing* Treg лимфоцита из крви у инфламирану јетру. Показано је IFN- $\gamma$  значајно повећава експресију CXCL10 у јетри, лиганда за CXCR3 рецептор исказан на Treg лимфоцитима (107, 108) што за последицу има повећан инфлукс FoxP3+Treg лимфоцита који продукују имунорегулаторне цитокине IL-10 и TGF- $\beta$ 1. Претпоставља се да мембрански молекул CD103 омогућава Treg лимфоцита да остану чврсто везани за паренхим инфламиране јетре (109). Миграција CXCR3<sup>+</sup> Treg лимфоцита у инфламирану јетру IFN- $\gamma$ -дефицијентних мишева и животиња којима је апликовано анти-CXCL10 антитело је значајно редукована (75). Смањену заступљеност хепатичких имunosупресивних Treg лимфоцита прати повећан инфлукс NK и ефекторских CD4<sup>+</sup> T ћелија које продукују проинфламацијске цитокине који промовишу акутно оштећење јетре (75).

#### 1.4. РЕГУЛАТОРНИ В ЛИМФОЦИТИ

В лимфоцити се превасходно сматрају позитивним регулатором имунског одговора, при чему се ефекторске функције ових ћелија заснивају на продукцији антитела и проинфламацијских цитокина, као и презентовању антигена помагачким Т лимфоцитима (110, 111). Израз „регулаторни В лимфоцити“ (енгл. *regulatory B cells*, Breg) први пут су увели *Mizoguchi* и *Brana* 2006. године (112). Популација протективних Breg лимфоцита супримира имунски одговор и идентификована је у бројним моделима аутоимунских болести. У експериментима на животињама показано је да уклањање Breg лимфоцита повећава агресивност аутоимунског процеса, што указује на то да аутоимунски процес сам по себи промовише експанзију ових ћелија као компензаторни механизам који има за циљ да ограничи оштећење ткива (113, 114, 115). Популација Breg лимфоцита се на основу фенотипа и биолошких функција може поделити на различите субпопулације. *Mauri* и сарадници су описали прекурсоре В

лимфоцита пореклом из маргиналне зоне слезине као CD21<sup>hi</sup>CD23<sup>hi</sup>CD1d<sup>hi</sup> ћелије (116, 117). Група предвођена Tedder-ом идентификовала је субпопулацију В лимфоцита у слезини чија је главна функционална карактеристика продукција имуносупресивног IL-10 (118, 119). Ове имунорегулаторне ћелије су стога назване В10 лимфоцити, а фенотипски су окарактерисане као CD1d<sup>hi</sup>CD5<sup>+</sup> ћелије (118, 119). Регулаторна функција Врег лимфоцита, активираних у запаљенској средини, заснива се на способности ових ћелија да продукују анти-инфламацијски IL-10, којим супримирају продукцију проинфламацијских цитокина у ефекторским Т лимфоцитима и подстичу диференцијацију Трег лимфоцита (120-123). Осим IL-10, Врег лимфоцити продукују и TGF- $\beta$  који је такође има важну регулаторну функцију (124-126). Посредством инхибиторних молекула експримираних на површини, Врег лимфоцити директним међућелијским контактом индукују имунску толеранцију на тај начин што супримирају ефекторске Т и В лимфоците, узрокују њихову апоптозу и индукују регулаторни фенотип имунских ћелија (127, 128, 129). Површински молекули кључни за имунорегулаторне функције Врег лимфоцита су В7 (130), GITRL (енгл. *glucocorticoid-induced TNF receptor ligand*) (131), FasL (132, 133), PD-L (енгл. *programmed death-1 ligand*) (134, 135) и ектонуклеотидазе CD39 и CD73 (136, 137). Аутоантитела која су одговорна за патогене ефекте В лимфоцита, у овом контексту имају протективну улогу јер уклањају апоптотичне ћелије и редукују доступност аутоантигена (138). Дакле, секрецијом бројних медијатора и експресијом различитих површинских молекула, Врег лимфоцити делују на ћелије имунског система и фаворизују имунску толеранцију. Врег лимфоцити супримирају патогени Th1 и Th17 имунски одговор углавном захваљујући својој способности да продукују IL-10 (139). Интеракција CD40-CD40L и присуство IL-21 стимулишу настанак IL-10<sup>+</sup> Врег лимфоцита, које супримирају помагачке Т лимфоците (140). Још један од механизма којим Врег лимфоцити смањују запаљење је индукција апоптозе CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита посредством FasL (141, 142). Деплеција В лимфоцита значајно поспешује инфламаторни одговор у коме учествују CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити, што указује на супресивни ефекат Врег лимфоцита и на CD8<sup>+</sup> Т лимфоците (143, 144). Такође је показано да Врег лимфоцити индукују апоптозу CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита и смањују број цитотоксичких лимфоцита у запаљеном захваћеном ткиву на тај начин што као ћелије које презентују антигене смањено продукују IL-2 (145). Током супресије инфламацијског одговора Врег лимфоцити директно делују и на ћелије урођеног имунског одговора- смањују инфилтрацију макрофага (146), неутрофила (147) и НК ћелија (148) у инфламирано ткиво. Посредством IL-10, В

лимфоцити инхибирају сазревање, експресију ко-стимулаторних молекула CD80 и CD86 на DCs као и капацитет ових ћелија да презентују антигене и продукују IL-12 (149).

#### **1.4.1. Улога Breg лимфоцита у болестима јетре и интеракција са NKT ћелијама**

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

У моделу аутоимунског холангитиса NOD.c3c4 (енгл. *non-obese diabetic*) мишева показано је да В лимфоцити промовишу запаљенски одговор током ране фазе болести, обзиром да деплеција ових ћелија значајно редукује инфламацију у јетри (151). Такође, у моделу хроничног оштећења јетре које је мишевима изазвано применом CCl<sub>4</sub> В лимфоцити имају профиброгени ефекат који је независан од продукције антитела и активације Т лимфоцита (152). Због добро познате проинфламацијске улоге В лимфоцита, примена лекова који ефикасно смањују број ових ћелија као што је ритуксимаб (моноклонско антитело против протеина CD20) је постала стандардна терапија за бројне туморе и аутоимунске болести јетре (153, 154). Међутим, у моделима аутоимунског холангитиса у dnTGFβRII (енгл. *double negative*) мишева као и у холангитису изазваном ксенобиотиком показано је да В лимфоцити имају регулаторни фенотип, обзиром да *in vivo* деплеција ових ћелија значајно погоршава аутоимунски процес (155). Breg лимфоцити такође супримирају инфламацијски одговор у јетри изазван активацијом CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита, о чему у прилог говори чињеница да мишеви дефицијенти за В лимфоците (μMT) након инфекције паразитом *Schistosoma mansoni* развијају теже оштећење јетре и не улазе у уобичајену спонтану ремисију током касне фазе болести (156). У моделу акутног хепатитиса који је изазван α-GalCer-ом је недавно показано да стимулација NKT ћелија узрокује брзу активацију и миграцију В лимфоцита из слезине и перитонеалне шупљине у јетрине синусоиде и област порталног крвотока, као и да деплеција В лимфоцита за последицу има промену цитокинског профила и значајно погоршање акутног хепатитиса. Дакле, након активације NKT ћелија следи снажан одговор Breg који има кључну улогу у супресији инфламације и модулацији имунског одговора у јетри. *Almishri* и сарадници су у моделу α-GalCer-ом индукованог хепатитиса, показали да након стимулације NKT



ћелија, B1 (B1a и B1b) В лимфоцити који су углавном присутни у перитонеуму и В лимфоцити пореклом из маргиналне зоне слезине (енгл. *marginal zone*, MZ) веома брзо мигрирају у јетру (157). Ове регулаторне ћелије *innate-like* фенотипа продукују антитела слабог афинитета, презентују антигене и продукују регулаторне цитокине IL-10 и TGF- $\beta$ 1 којима супримирају инфламацију и аутоимунски процес (158). Такође, осим антиинфламацијских цитокина, Breg експримирају бројне адхезивне молекуле, рецепторе, као и ектоензим CD73 којима регулишу урођени и стечени имунски одговор (159). Активношћу ектонуклеотидазе CD73 настаје аденозин за који је познато да смањује акутно оштећење јетре (160). На основу ових података може се закључити да регулаторне ћелије имају широк спектар деловања на различите типове имунокомпетентних ћелија, што им обезбеђује важно место у хомеостази имунског система. Резултати многих истраживања показују да су ови лимфоцити незаобилазни учесници практично свих облика неспецифичног и специфичног имунског одговора у болестима јетре.

## **1.5. АНИМАЛНИ МОДЕЛИ АКУТНОГ ХЕПАТИТИСА ИЗАЗВАНИ АКТИВАЦИЈОМ НКТ ЋЕЛИЈА**

### **1.5.1. Con A хепатитис**

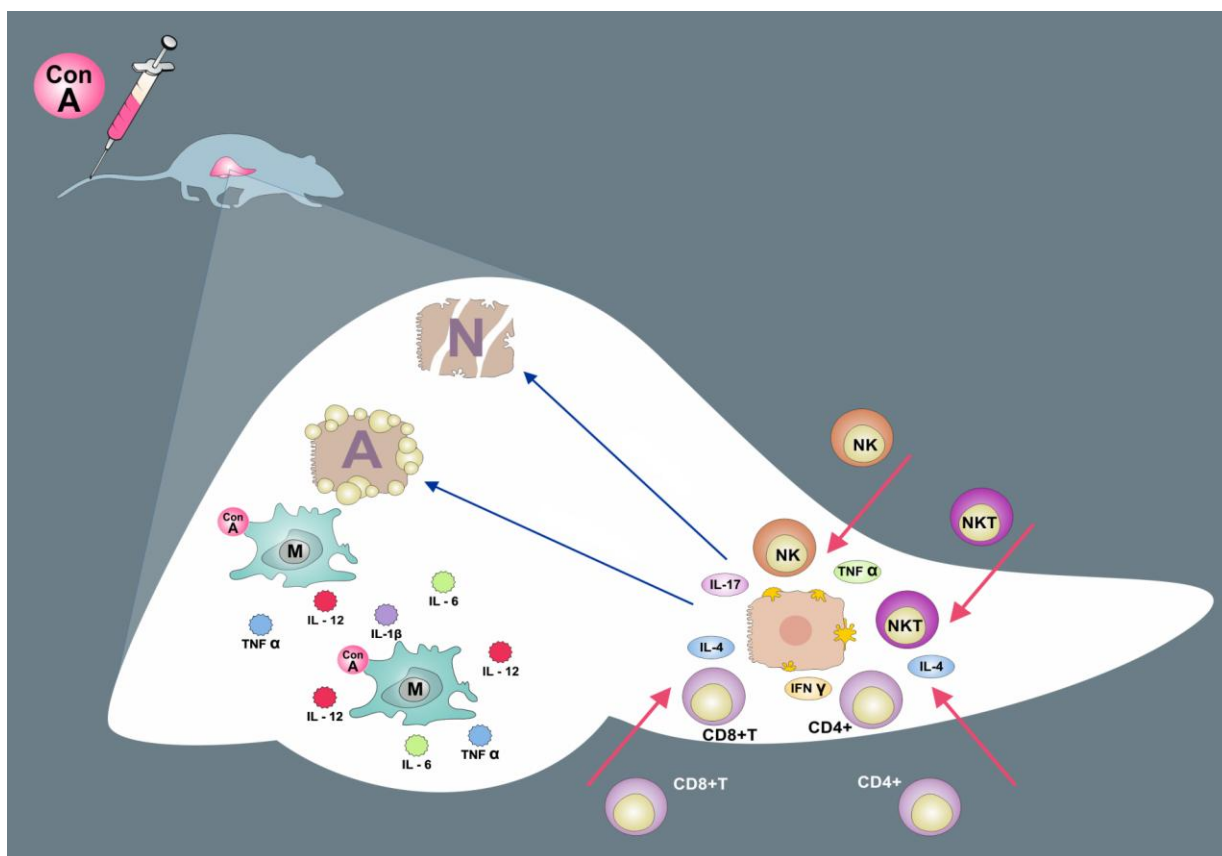
Најчешће примењиван анимални модел аутоимунског хепатитиса се индукује интравенском апликацијом Con A. Con A је лектин првобитно изолован из пасуља (лат. *Canavalia ensiformis*). Карактерише га афинитет за  $\alpha$ -D-mannosyl и  $\alpha$ -D-glucosyl групе које се налазе у шећерима, гликопротеинима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

Након апликације макрофаги јетре лектин-везујућим рецепторима први препознају и ингестирају Con A из циркулације (162). Сада активирани макрофаги продукују проинфламацијске цитокине (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-12) и привлаче ефекторске ћелије у јетру: НКТ и урођено-убилачке ћелије (енгл. *natural killer*, NK), као и поликлонално активирани CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоците, које директним цитотоксичним ефектом и индиректно продукцијом цитокина (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17 и IL-4) узрокују масовну некрозу хепатоцита (162).

Главне ефекторске ћелије у патогенези Con A хепатитиса су НКТ ћелије, што потврђује студија у којој је показано да су мишеви дефицијентни за CD1d молекул резистентни на индукцију овог модела (163, 164, 74). На основу поменутих резултата је

закључено да су  $CD4^+$  ћелије које су сматране најзначајнијим у развоју Соп А хепатитиса у највећем броју  $CD4^+$  NKT ћелије (162, 74). Такође је показано и да су  $V\alpha 14$  *knockout* ( $V\alpha 14^{-/-}$ ) мишеви резистентни на Соп А хепатитис, па су  $V\alpha 14^+$  NKT ћелије означене као субпопулација NKT ћелија одговорна за оштећење хепатоцита у Соп А хепатитису (165). NKT ћелије индукују апоптозу хепатоцита посредством Fas ligand:Fas интеракције (166) и продукцијом проинфламацијских цитокина IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  (165). У Соп А хепатитису, IFN- $\gamma$  узрокује апоптозу хепатоцита повећавајући експресију Fas рецептора на њиховој мембрани (167). Активација IFN- $\gamma$ /STAT-1 сигналног пута подстиче експресију адхезионих молекула: ICAM-1, VCAM-1, Mig (енг. *monokine induced by IFN- $\gamma$* ), ENA-78 (енгл. *epithelial cell derived neutrophil-activating peptide*), I-TAC (енгл. *IFN-inducible T cell- $\alpha$  chemoattractant*), IP-10 (енгл. *IFN-inducible protein-10*) на мембрани синусоидалних ендотелних ћелија чиме помаже инфлукс леукоцита у јетру (168). IFN- $\gamma$  додатно симулише продукцију TNF- $\alpha$  који има хепатотоксичко дејство (169). Директан хепатотоксички ефекат TNF- $\alpha$  остварује везивањем за TNF рецепторе хепатоцита и активацијом JNK киназа. Осим директним хепатотоксичким ефектом, TNF- $\alpha$  доприноси оштећењу јетре и индиректно: повећавајући експресију адхезивног молекула ICAM-1 на ендотелним ћелијама јетре чиме помаже инфлукс леукоцита, пре свега  $CD4^+$  Т лимфоцита (170). Tagawa и сарадници су уочили да IFN- $\gamma$  дефицијентни мишеви након примене Соп А не развијају хепатитис, док са друге стране у присуству делеције гена за TNF- $\alpha$  након апликације Соп А настаје оштећење јетре (167). На тај начин је показана централна улога проинфламацијског IFN- $\gamma$  у патогенези овог модела хепатитиса.

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



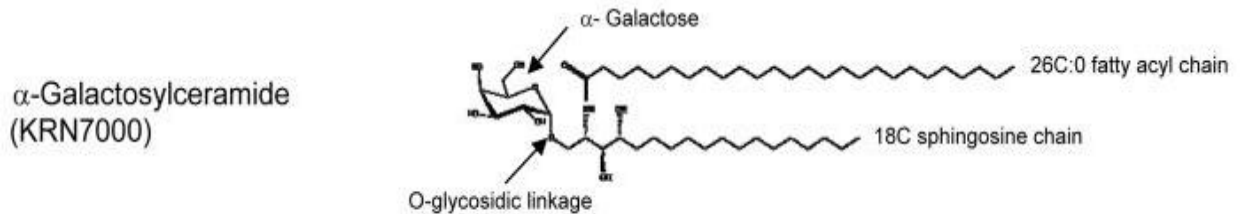
Слика 2. Имунопатогенеза Con A хепатитиса.

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

### 1.5.2. $\alpha$ -GalCer хепатитис

$\alpha$ -GalCer представља поједностављени гликолипидни аналог агеласфина, који је првобитно изолован из морског сунђера *Agelas mauritanus* 1993. године током предклиничких покушаја да се идентификује ново антитуморско терапијско средство (179). Након тога, компанија *Kirin Brewery* га је синтетисала и назвала KRN7000.  $\alpha$ -

GalCer је састављен од  $\alpha$ -галактозе, фитосфингозина и ацилног ланца (Слика 3). Данас,  $\alpha$ -GalCer је познати антиген за CD1d -реактивне NKT ћелије миша и човека (179).



Слика 3. Хемијска структура  $\alpha$ -галактоцерамида.

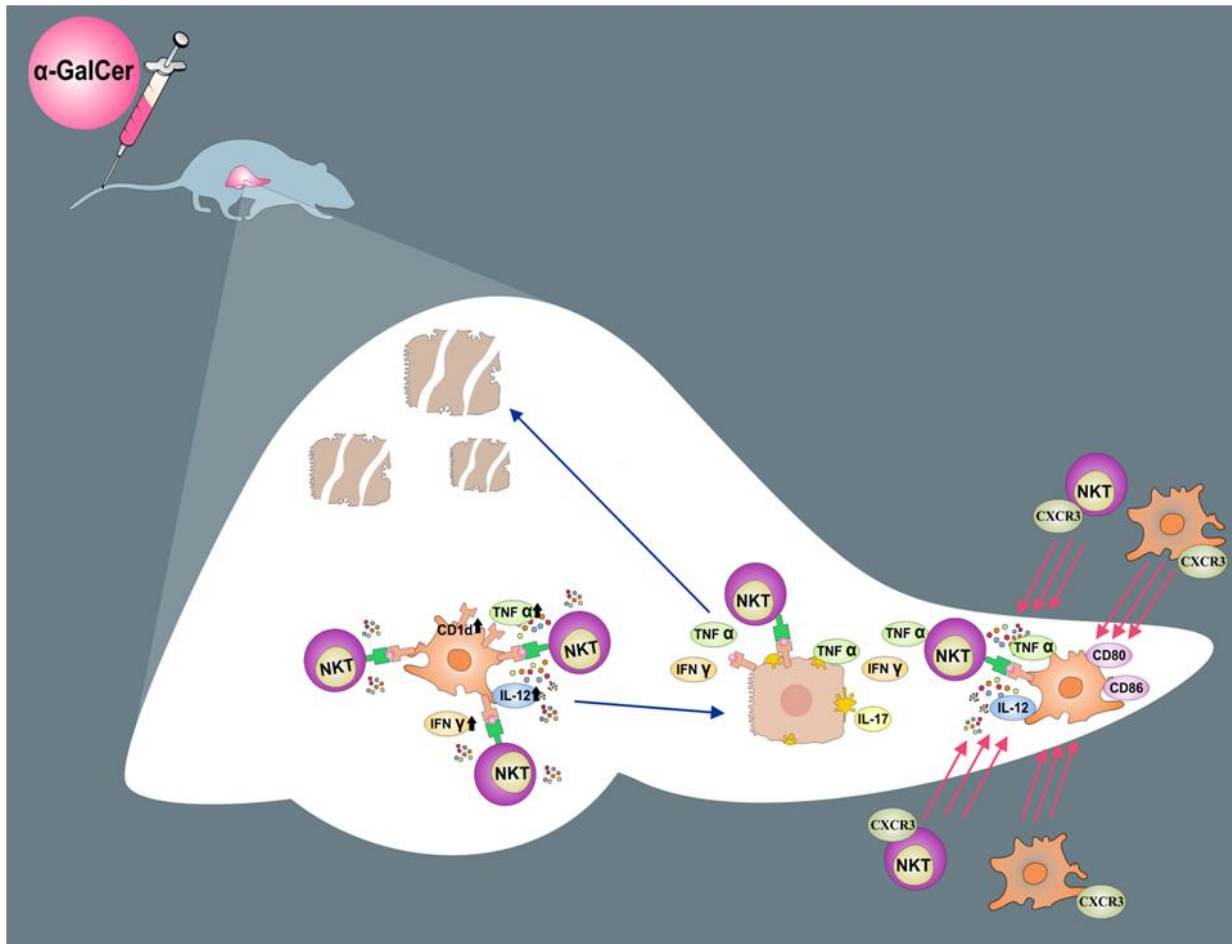
Системском применом егзогеног  $\alpha$ -GalCer-а којим се специфично активирају NKT ћелије и покреће снажан имунски одговор у јетри изазива се мишији модел акутног хепатитиса (75). Механизам настанка, патолошке промене које се детектују у јетри експерименталних животиња, као и чињеница да је  $\alpha$ -GalCer ендогени лиганд NKT ћелија који конститутивно продукују имунске ћелије сисара, чине овај модел физиолошки релевантним за испитивање етиопатогенезе, прогресије и нових видова терапије аутоимунског хепатитиса (18).

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

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

IFN- $\gamma$  кога продукују NKT ћелије делује преко рецептора 1 за IFN- $\gamma$  (енгл. *IFN- $\gamma$  receptor 1*, IFNGR1) и рецептора 2 за IFN- $\gamma$  (енгл. *IFN- $\gamma$  receptor 2*, IFNGR2), услед чега се активира STAT1 (енгл. *signal transducer and activator of transcription 1*) молекул у хепатоцитима, непаренхимским ћелијама јетре и имунским ћелијама што доприноси патогенези акутног хепатитиса (182). IFN- $\gamma$  активира NK ћелије у јетри док истовремено редукује инфилтрацију неутрофила (182). Међутим, за разлику од Con A хепатитиса, показано је да се хепатитис изазван  $\alpha$ -GalCer-ом развија и у случају неутрализације IFN- $\gamma$  односно да је кључни цитокин за настанак оштећења јетре у овом моделу TNF- $\alpha$  кога доминантно секретују NKT ћелије (75). TNF- $\alpha$  индукује оштећење хепатоцита директним цитотоксичким механизмом као и аутокрином и паракрином индукцијом експресије FasL на NKT ћелијама (75). IL-4 кога продукују NKT ћелије остварује свој ефекат везивањем за IL-4R $\alpha$  и gp140/ $\gamma$ c ланац, или IL-4R $\alpha$  и IL-13R $\alpha$ 1 ланац што последично активира сигнални молекул STAT6 (енгл. *signal transducer and activator of transcription 6*). IL-4/STAT6 сигнални пут у јетри игра кључну улогу у акумулацији неутрофила који експримирају мијелопероксидазу, преваходно на тај начин што инхибира њихову апоптозу. У прилог овоме говоре студије у којима је делеција гена за IL-4 или рецептор за IL-4 повећала апоптозу неутрофила и смањила њихову заступљеност у јетри  $\alpha$ -GalCer-ом третираних мишева и последично редуковала хепатитис (182). Непосредно након активације  $\alpha$ -GalCer-ом, популација NKT ћелија која експримира транскрипциони фактор ROR $\gamma$ T продукује IL-17, који повећава инфилтрацију и хепатотоксичност неутрофила, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита у јетри (183). Улога IL-17 у овом моделу је међутим контроверзна. Недавно је показано да anti-IL-17 антители повећава експресију хемокина MCP-1 and CXCL5 у јетри што за последицу има повећан инфлукс ефекторских NKT ћелија и погоршање акутног хепатитиса који је изазван  $\alpha$ -GalCer-ом (184).

Слично осталим моделима акутног оштећења јетре,  $\alpha$ -GalCer изазива пролазни хепатитис, што потврђује да се дуготрајно укидање имунске толеранције у јетри тешко постиже као и да овај модел болести карактеришу снажни регулаторни процеси који контролишу оштећење јетре и доприносе њеној регенерацији (182).



Слика 4. Имунопатогенеза  $\alpha$ -GalCer хепатитиса.

## 1.6. МЕЗЕНХИМАЛНЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ

Мезенхималне матичне ћелије (енгл. *mesenchymal stem cells*, MSCs) су адултне матичне ћелије, облика фибробласта, које имају способност самообнављања и диференцијације у ћелије мезодермалног порекла (185, 186). Недавно објављене студије указују да MSCs карактерише и фенотипска пластичност, односно капацитет да се диференцирају и у ћелије друга два клицина листа- ћелије ектодерма (неуроне, астроците и олигодендроците) и ендодерма (хепатоците) (187).

### 1.6.1. Порекло и извори MSCs

Порекло MSCs још увек није потпуно разјашњено. *Battula* и сарадници су указали да ћелије настале епително-мезенхималном транзицијом наликују MSCs по експресији гена, мултипотентности и способности миграције ка месту повреде у ткиву (188).

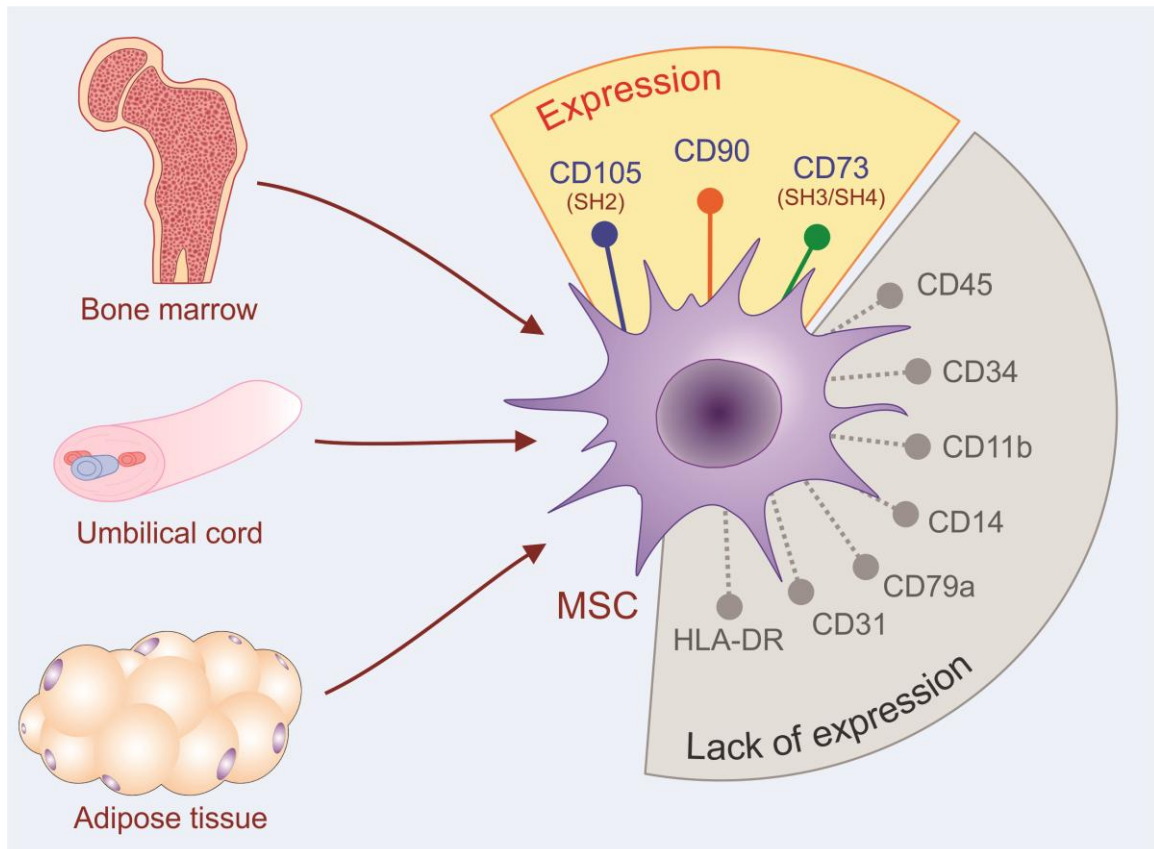
*Takashima* и сарадници су доказали да током ембриогенезе први прогенитори MSCs воде порекло од Sox1<sup>+</sup> неуроепителних ћелија, док током каснијег постнаталног развоја MSCs настају из других извора (189). Ово запажање не искључује могућност да под одговарајућим условима MSCs могу настати и од параксијалног мезодерма. Већина до данас објављених студија подржава хипотезу да MSCs воде порекло од периваскуларних ћелија- перицита, о чему говоре у прилог чињенице да перицити експримирају неке од MSCs маркера и испољавају остеогени, хондрогени и адипогени потенцијал диференцијације (190).

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

### **1.6.2. Карактеристике MSCs**

MSCs експримирају широк спектар различитих површинских антигена, чија експресија варира у зависности од ткива из кога су изоловане као и протокола који је примењен за њихову изолацију и култивацију. Због тога је Међународно друштво за ћелијску терапију дефинисало минималне критеријуме за карактеризацију MSCs: адхерентност

за пластику при стандарним условима култивације, мултипотентни потенцијал диференцијације у ћелије мезодерма, експресија маркера CD105 (SH2, ендоглин), CD73 (SH3/SH4, екто5-нуклеотидаза), CD90 (Thy-1) и одсуство експресије хематопоетских маркера CD45 (пан-леукоцитарни антиген), CD34 (маркер хематопоетских прогенитора и ендотелних ћелија), CD14 (CD11b, маркер моноцита и макрофага), CD79 $\alpha$  (CD19, маркер В лимфоцита), CD31 (адхезивни молекул ендотелних ћелија) и МНС молекула II класе (HLA-DR) (201). (Слика 5)



**Слика 5. Порекло и фенотипске карактеристике MSCs.**

Поред поменутих морфолошких и фенотипских карактеристика, *in vitro* диференцијација у остеобласте, адипоците и хондробласте је особина која на најсигурнији начин омогућава идентификацију MSCs (Слика 6). У више студија је показано да трансформишући фактор раста бета (енгл. *transforming growth factor*, TGF- $\beta$ ) 1, 2 и 3 стимулишу диференцијацију MSCs у хондроците (202). Циклично излагање MSCs комбинацији TGF- $\beta$ 3 и BMP-6 (енгл. *bone morphogenetic protein-6*) нарочито повећава депоновање матрикса хрскавице (203). Као хондрогени медијум, насупрот



медијуму за експанзију MSCs, користи се DMEM са високим садржајем глукозе у који се додају биоактивни молекули L-пролин (40 µg/ml), ITS (енгл. *insulin, transferrin, sodium selenite*), натријум пируват (100 µg/ml), дексаметазон (100 nM) и L-аскорбинска киселина (50 µg/ml) (204). Хондрогена диференцијација MSCs доказује се хистолошким бојењима, као што су *Safranin-O/fast green* и *Alcian blue*, коришћењем реагенса који је осетљив на присуство протеогликана и глукозаминогликана.

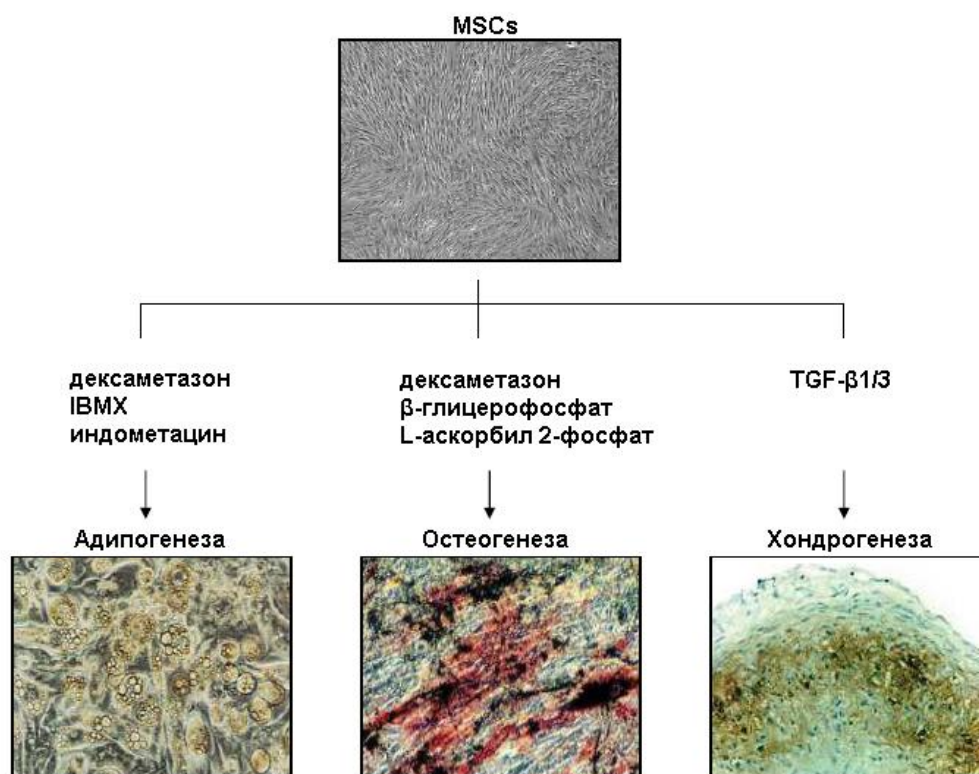
*In vitro* индукција диференцијације MSCs у остеобласте може се постићи применом неколико различитих протокола. Тако на пример, 100 nM дексаметазона, 50 µg/ml L-аскорбил 2-фосфата (енгл. *L-ascorbic acid 2-phosphate*, AsAP) и 100 mM β-глицерофосфата након 7 до 14 дана резултује депоновањем калцијума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

MSCs гајене у једном слоју, у присуству дексаметазона (0,5 µM), 1-метил-3-изобутилксантина (енгл. *1-methyl-3-isobutylxanthine*, IBMX) (0.5 µM–0.5 mM) и индометацина (50–100µM), подлежу адипогеној диференцијацији (214, 215, 216, 186, 217). Инсулин је важан састојак медијума за диференцијацију MSCs у адипоците (дексаметазон, IBMX, индометацин) 2-5 дана, као и за одржавање добијених адипоцита у култури (216). У већини студија је забележено да доза дексаметазона за индукцију диференцијације MSCs у адипоците треба да буде 0.5 µM или пет пута већа од оне којом се MSCs усмеравају ка остеоцитима.

Кључни корак у започињању адипогенезе је заустављање ћелијског циклуса хондроцита добијених од MSCs. IBMX је инхибитор фосфодиестеразе који спречава конверзију cAMP у 5'AMP, што за последицу има повећану експресију протеин киназе

А и хормон сензитивне липазе (енгл. *hormone sensitive lipase*, HSL) као и смањење пролиферације ћелија (218). HSL разграђује триацилглицероле у глицерол и слободне масне киселине, што представља важну реакцију током адипогенезе (218).

Експресија транскрипционог фактора PPAR $\gamma$  (енгл. *peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$* ) у MSCs изазвана индометацином, игра важну улогу у адипогенези и остеогенези. Активација PPAR $\gamma$  директно инхибира остеогену диференцијацију преко Wnt сигналног пута, док је истовремено неопходна за адипогену диференцијацију (218, 219, 220). Наиме, показано је да изостанак експресије PPAR $\gamma$  значајно редукује депоновање липидних вакуола и пролиферацију адипоцита (217). У циљу потврде диференцијације MSCs у адипоците, експресија транскрипционог фактора PPAR $\gamma$ 2 се детектује методом RT-PCR. Такође, липидне вакуоле синтетисане интрацелуларно у адипоцитима генерисаним од MSCs, идентификују се *Oil Red-O* хистолошким бојењем.

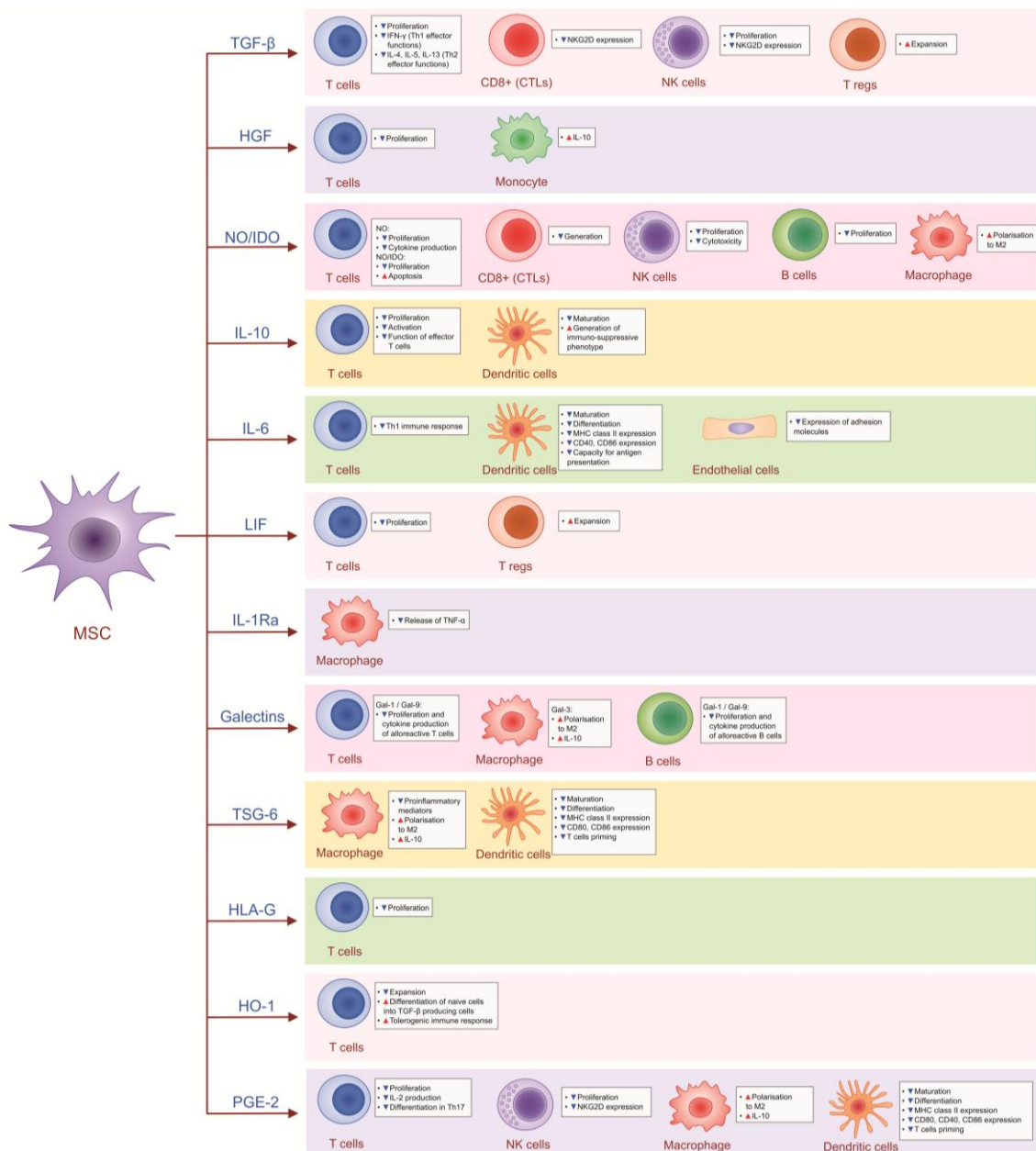


Слика 6. Диференцијација MSCs у адипоците, остеобласте и хондроците. (кориговано према: Pittenger M.F. *Science*.1999; 284:143-147 и Yeh W.C. *Genes Dev*.1995; 9:168-181).

## 1.7. ИМУНОМОДУЛАТОРНА СВОЈСТВА MSCs

Осим прогениторских особина, MSCs карактеришу и мобилизација (енгл. *homing*) у оштећено ткиво, као и способност да модулирају имунски одговор директним контактом са ћелијама имунског система или продукцијом солубилних фактора, што их чини обећавајућим средством за лечење болести узрокованим имунским механизмима (191).

Након системске примене, MSCs мигрирају у повређено ткиво. Проинфламацијски цитокини фактор некрозе тумора (енгл. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ), интерлеукин 1 (енгл. *interleukin 1*, IL-1), интерферон гама (енгл. *interferon gamma*, IFN- $\gamma$ ) секретовани након оштећења ткива, индукују експресију адхезивних молекула који учествују у котрљању и трансмиграцији MSCs у екстрацелуларни матрикс. Миграција MSCs у запаљенску микросредину заснива се на интеракцији CXCL12 хемокина који је индукован проинфламацијским стимулусима и рецептора CXCR4 експримираним на површини MSCs. Непосредно након енграфтмента, MSCs модулирају урођени и стечени имунски одговор директним међућелијским контактом и паракриним механизмом. Паракрини ефекат на ћелије имунског система MSCs остварују посредством солубилних фактора: TGF- $\beta$ , HGF, PGE<sub>2</sub>, IDO, iNOS, IL-10, IL-6, LIF, TSG-6, HLA-G и HO-1 (221). (Слика 7)

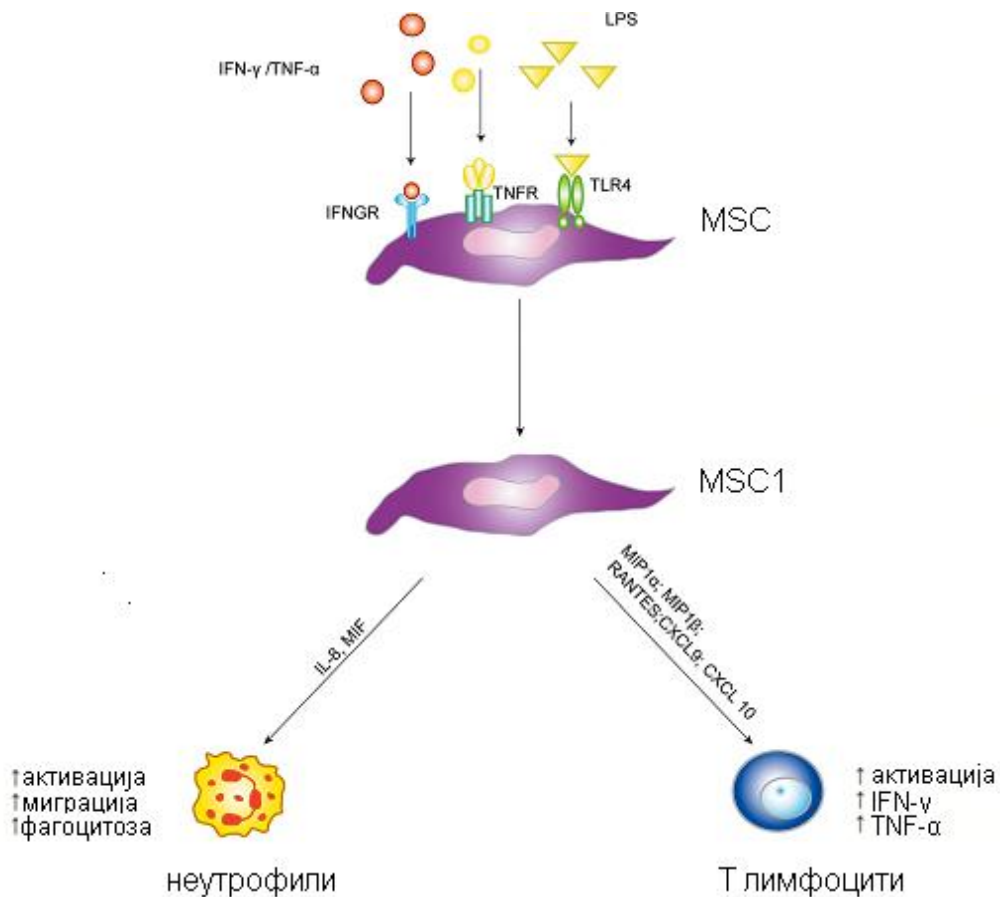


Слика 7. Паракрини ефекат MSCs на различите ћелијске популације.

Недавним студијама је показано да у зависности од запаљенског миљеа којем су изложене MSCs промовишу или супримирају инфламацију. У присуству ниских концентрација TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , MSCs стичу проинфламацијски фенотип (MSC1) (221) (Слика 8). MSC1 појачавају одговор Т лимфоцита, тако што секретују хемокине MIP-1 $\alpha$  (енгл. macrophage inflammatory protein 1 alpha), MIP-1 $\beta$ , (енгл. macrophage inflammatory protein-1 $\beta$ ), RANTES (енгл. regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), CXCL9 и CXCL10 којима привлаче лимфоците у место запаљења (222). У оваквој средини активност iNOS у мишјим и IDO у хуманим ћелијама није довољна да супримира пролиферацију Т лимфоцита (223,224). Конверзија MSCs у

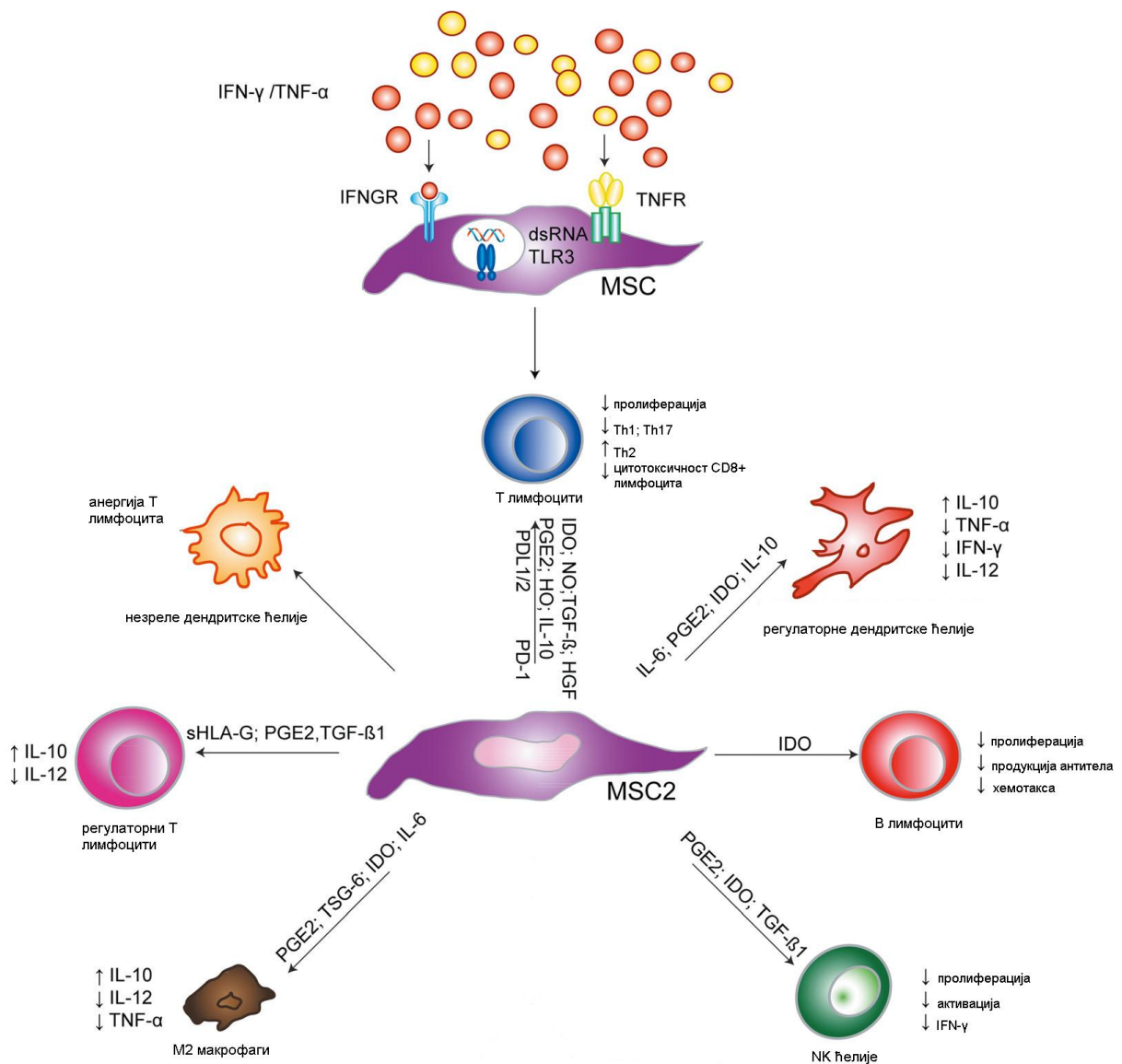
проинфламацијски или антиинфламацијски фенотип зависи и од стимулације рецептора сличних *Toll*-у (енгл. toll-like receptors, TLRs) експримираних на њиховој површини (225). Активација TLR4 липополисахаридом (енгл. Lipopolysaccharide, LPS) при раном одговору на повреду ткива, усмерава MSCs према MSC1 фенотипу, док активација TLR3 дволанчаном рибонуклеинском киселином (енгл. double stranded RNA, dsRNA) индукује имunosупресивни MSC2 фенотип (225). Равнотежа ова два супротна пута промовише одбрану домаћина, али истовремено спречава претерано оштећење ткива и доприноси његовој репарацији (222). Током ране фазе инфламације, MSCs смањују апоптозу неутрофила, промовишу њихову миграцију у место инфекције и повећавају њихову способност да фагоцитују бактерије. Кључну улогу у инхибицији апоптозе неутрофила имају IL-6/STAT-3, IFN- $\beta$  и GM-CSF- (226, 227). На овај начин, у присуству MSCs активираних преко TLR3, одржава се *pool* неутрофила који доприносе одбрани домаћина од инфекције (228). Након препознавања антигена микроорганизама резидентне ткивне MSCs, појачано продукују факторе раста као што су IL-8 и MIP (енгл. macrophagemigration inhibitory factor), који привлаче неутрофиле и повећавају њихову проинфламацијску активност (229). Током ране фазе имунског одговора MSCs повећавају способност неутрофила да фагоцитују бактерије и на тај начин побољшају елиминацију патогена из оштећеног ткива (230). Међутим, током касне фазе имунског одговора, у присуству високих концентрација TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  MSCs индукују експресију IL-10 у моноцитима и макрофагима, цитокина који превенира миграцију неутрофила у ткиво и спречава оксидативни стрес (231). Ови резултати указују да у почетку запаљења MSCs играју проинфламацијску улогу, тако што помовишу миграцију и активацију неутрофила, појачавајући имунски одговор, док током касне фазе, MSCs постају имunosупресивне, инхибирају миграцију неутрофила и спречавају оксидативну повреду ткива (222). Резултати *in vitro* и *in vivo* студија указују двоструки ефекат MSCs на преживљавање, пролиферацију, активацију В лимфоцита као и њихову диференцијацију у плазма ћелије (232, 233, 234). MSCs активирани преко TLR рецептора промовишу пролиферацију и диференцијацију наивних В лимфоцита у ћелије које продукују имуноглобулине (232). *Rasmusson* и сарадници су показали да од нивоа стимулације MSCs LPS-ом или вирусним антигенима зависи на који начин MSCs модулирају продукцију IgG у В лимфоцитима (233). Током бактеријске или вирусне инфекције MSCs значајно супримирају продукцију антитела у В лимфоцитима, међутим у условима када LPS, *Cytomegalovirus* или

*Varicella zoster* вирус индукују слабији имунски одговор, MSCs стимулишу секрецију IgG (234).



**Слика 8. Проинфламацијски ефекат мезенхималних матичних ћелија.** У почетним фазама запаљења, у присуству ниских концентрација проинфламацијских цитокина (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$ ) стичу проинфламацијски фенотип. (кориговано према: Gazdic Marina. *Stem Cell Rev* 2015; 11: 280-287).

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



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

### 1.7.1. Молекуларни механизми супресије Т лимфоцита

MSCs мењају фенотип и функције CD4<sup>+</sup> помоћничких и CD8<sup>+</sup> цитотоксичких Т лимфоцита (CTLs) директним међућелијским контактом као и паракриним механизмима (235, 236). Показано је да се у основи инхибиције пролиферације Т лимфоцита налази интеракција инхибиторног молекула PD-1 експримираног на MSCs са његовим лигандима PD-L1 и PD-L2 на лимфоцитима (191). MSCs не експримирају ко-стимулаторне молекуле CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2) на својој мембрани, што за последицу има индукцију анергије Т лимфоцита (237). Најважнији солубилни фактори



којим MSCs паракрино супримирају Т лимфоците су индоламин-2, 3 диоксигеназа (енгл. *indoleamine-2,3-dioxygenase*, IDO) и индуцибилне азот окид синтазе (енгл. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS) (238). IDO је ензим који разграђује есенцијалну аминокиселину триптофан до кинуренина и токсичних метаболита (хинолне и 3-хидрокси антранилне киселине) који смањују пролиферацију и индукују апоптозу Т лимфоцита. У реакцији коју катализује ензим iNOS из L-аргинина се синтетише NO. NO има кратак полу-живот и делује као сигнални молекул, тако што инхибира фосфорилацију Stat-5 молекула (енгл. *signal transducer and activator of transcription-5*) у Т лимфоцитима и на тај начин зауставља њихов ћелијски циклус (239, 240, 241). *Glennie* и сарадници су показали да MSCs снажном инхибицијом циклина-D2 и повећањем експресије инхибитора циклин-зависне киназе p27kip1 могу индуковати анергију Т лимфоцита (242).

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

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

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



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

Осим директним ефектом, MSCs могу да супримирају диференцијацију и ефекторске функције Th1, Th2 и Th17 лимфоцита и индиректно, утицајем на ћелије које презентују антигене (237, 256, 257). MSCs инхибирају диференцијацију моноцита и CD34<sup>+</sup> прогенитора у дендритске ћелије (258). Дендритске ћелије ко-култивисане са MSCs заустављене су у G0/G1 фази ћелијског циклуса, услед нисходне регулације циклина D2 (259). Осим тога, дендритске ћелије настале у присуству MSCs су незреле и карактерише их одсуство експресије CD83, HLA-DR као и костимулаторних молекула CD40, CD80 и CD86 (260, 261). Незреле дендритске ћелије нису у стању да активирају Т лимфоците, већ их воде у анергију (258). *Djuad* и сарадници су показали да је IL-6 главни цитокин којим MSCs инхибирају сазревање дендритских ћелија (262), док је друга група аутора применом инхибитора синтезе PGE<sub>2</sub>, NS-398, показала да PGE<sub>2</sub> има кључну улогу у овој интеракцији (263).

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

Директним међућелијским контактом и продукцијом PGE<sub>2</sub>, MSCs инхибирају диференцијацију Th17 лимфоцита од наивних и меморијски прекурсора (257). Инхибиција Th17 фенотипа је праћена повећаном експресијом транскрипционог фактора FoxP3 и настанком IL-10<sup>+</sup> Treg лимфоцита (266). Показано је да активацијом Notch1 сигналног пута лигандима (Jagged1, Jagged2 и Delta-Like (DLL) 1, 3 и 4) или продукцијом солубилних фактора HLA-G5, PGE<sub>2</sub> и TGF- $\beta$ 1, MSCs промовишу настанак и експанзију CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg (267).

### **1.7.3. MSCs смањују цитотоксички потенцијал Т лимфоцита и NK ћелија**

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

ћелија-ћелија контактом, као и паракрино продукцијом PGE<sub>2</sub>, IDO и TGF-β, MSCs смањују експресију рецептора NKG2D на CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима што спречава настанак ефекторских CTLs (269, 270).

Бројне студије су показале да при кокултивацији у односу 1:1 и 10:1, MSCs супримирају пролиферацију и продукцију IFN-γ у NK ћелијама (245, 271). Осим тога, активирани NK ћелије култивисане у присуству MSCs у трајању 4-5 дана имају мањи цитотоксички потенцијал, који је израженији према циљним ћелијама које експримирају HLA молекула I класе (271, 272). Редукована цитотоксичност NK ћелија се објашњава инхибиторним ефектом PGE<sub>2</sub>, IDO и TGF-β1 које продукују MSCs на експресију активационих NK рецептора (271, 273).

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

#### **1.7.4. Молекуларни механизми којим MSCs супримирају макрофаге**

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

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

IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  присутни у инфламираном ткиву, стимулишу MSCs да секретују IDO, који разграђује триптофан из микроокружења до кинуренина. Кинуренин директно супримира пролиферацију Т лимфоцита или делује индиректно, тако што индукује диференцијацију IL-10<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> M2 макрофага (281). Настали имуносупресивни M2 макрофаги продукују CCL18 и IL-10, који синергистички са имуносупресивним PGE<sub>2</sub> и TGF- $\beta$  пореклом из MSCs, поспешују секрецију HLA-G5 што за последицу има експанзију Treg лимфоцита (282, 277).

### **1.7.5. Молекуларни механизми којим MSCs супримирају В лимфоците**

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

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

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

## **1.8. ИМУНОМОДУЛАТОРНИ ЕФЕКАТ MSCs У АКУТНОМ ХЕПАТИТИСУ**

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

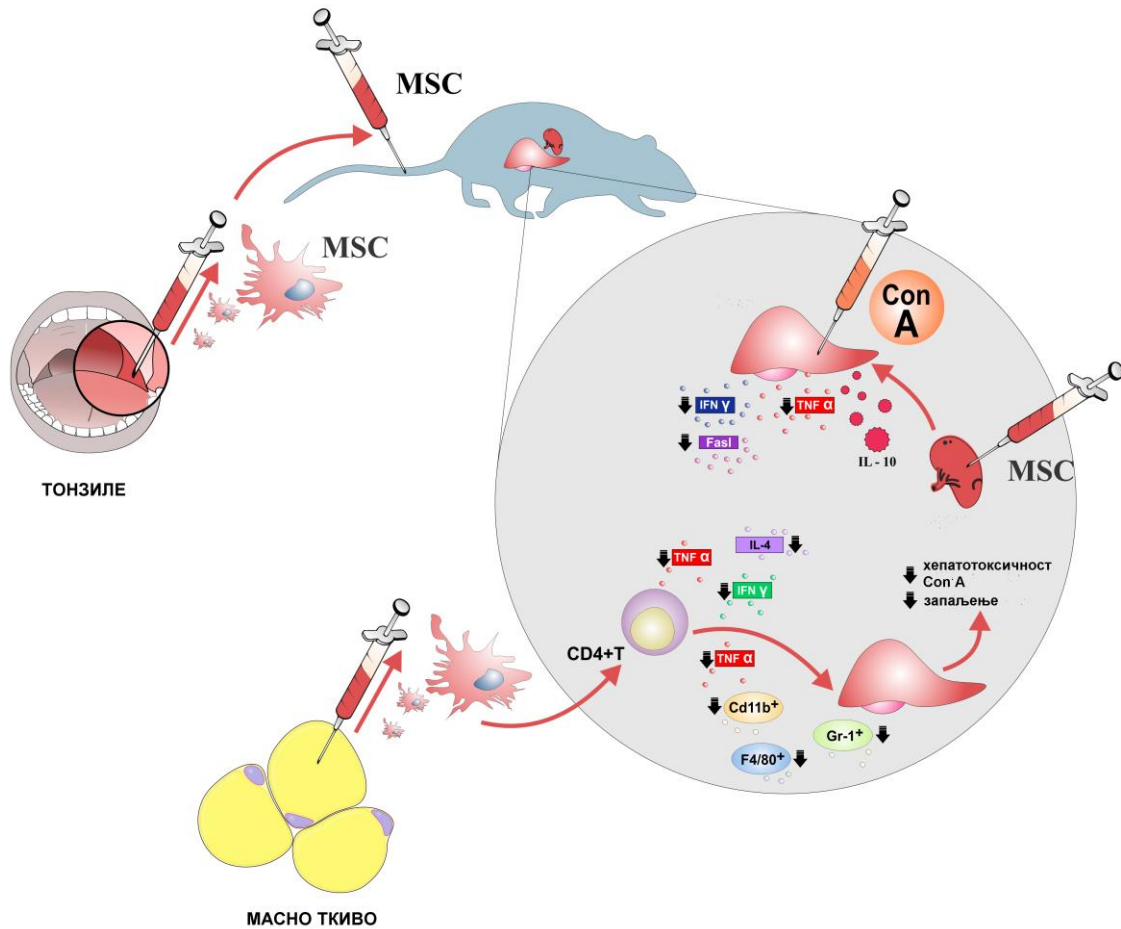
аутофагије, некрозе и некроптозе, заједно са осталим патофизиолошким процесима, узрокују оштећење јетре у коме важну улогу играју имунски механизми (286).

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

У студијама у којима је применом Соп А изазвано оштећење јетре, мишевима су успешно трансплантиране MSCs, након чега је забележено смањење биохемијских и патохистолошких параметара оштећења јетре, као и значајно мања продукција проинфламацијских цитокина  $IFN-\gamma$  и  $TNF-\alpha$  (291, 292). Док  $IFN-\gamma$  води хепатоците у апоптозу посредством Fas рецептора,  $TNF-\alpha$  након везивања за TNF рецептор изазива апоптозу хепатоцита активацијом каспазе 8, што за последицу има ослобађање митохондријалног цитохрома c и активацију каспазе 3 (293, 294). Стога инхибиторни ефекат MSCs на продукцију поменутих проинфламацијских цитокина, делимично објашњава смањену апоптозу синусидалних ендотелних ћелија и хепатоцита, као једног од главних механизма оштећења јетриног паренхима у овом моделу (290).

Интраспленичка апликација MSCs значајно смањује оштећење јетре у мишева са хепатитисом изазваним применом Соп А, на тај начин што повећава експресију хепатопротективног  $IL-10$  у јетри и смањује експресију  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$  и FasL у лимфоцитима и Купферовим ћелијама (295). *Zhu* и сарадници су показали да трансплантиране MSCs свој имуномодулаторни ефекат осим локално остварују и системски, значајно смањујући број активираних циркулишућих лимфоцита и концентрацију  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$  и  $IL-4$  у серуму (292). Трансплантација MSCs није имала утицаја на експресију NO синтазе и  $IL-2$  (292). *Ryu* и сарадници су показали да MSCs изоловане из тонзила (Т-MSCs) секретују галектин-1 који инхибира продукцију

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



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

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

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

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

Резултати претходно споменутих као и неколико недавно објављених студија указују да солубилни фактори које секретују MSCs, односно кондиционирани медијум генерисан од MSCs (MSC-CM), могу бити допунско терапијско средство али и алтернатива трансплантацији MSCs у акутном оштећењу јетре у ком улогу играју имунски механизми (300, 301, 302, 303). Апликација имуномодулаторних молекула које продукују MSCs, како у болусу MSC-CM тако и екстракорпорално путем биореактора, значајно повећава преживљавање мишева којима је индукован експериментални хепатитис хепатотоксином D-галактозамином (Gal-N) (300). MSC-CM значајно смањује панлобуларни леукоцитни инфилтрат и некрозу ћелија јетре (300). Такође, након адоптивног трансфера леукоцита, компјутеризованом томографијом је показано да MSC-CM преусмерава ћелије имунског система из повређеног органа, односно да је смањено присуство имунских ћелија у јетри вероватно последица модулације њихове миграције убризганим MSC-CM (300). Van Poll и сарадници су потврдили да системска апликација MSC-CM повећава преживљавање пацова и превенира ослобађање биохемијских маркера оштећења ткива јетре у моделу фулминантног хепатитиса (301). MSC-CM за око 90% смањује апоптозу хепатоцита, подстиче регенерацију у јетри тако што повећава број хепатоцита који пролиферишу (301).

У моделу акутног оштећења јетре које је изазвано угљен тетрахлоридом (CCl<sub>4</sub>), Xagorari и сарадници су показали да MSC-CM смањује апоптозу ћелија јетре

посредством IL-6 и FGL-1 (302). Међутим, у моделу фулминантног хепатитиса који је изазван тиаоацетамидом (ТАА), за разлику од трансплантираних MSCs које су промовисале пролиферацију и инхибирале апоптозу хепатоцита супресијом инфилтрације јетре F4/80<sup>+</sup> макрофагима и конверзијом CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита у антиинфламаторни фенотип, апликација MSC-СМ није имала значајан хепатопротективни ефекат (304). Инфузија MSC-СМ је само делимично редуковала оштећење јетре, али није значајно смањила морталитет експерименталних животиња (304). Ови резултати су подржали теорију да за разлику од MSC-СМ, трансплантиране MSCs мигрирају у оштећени орган у ком интерагују са ћелијама имунског система и током првих сати након оштећења јетре испољавају свој имуносупресивни потенцијал директним утицајем на циљне ћелије или паракрино- континуираном секрецијом солубилних медијатора (304).

## 2. ЦИЉ РАДА

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

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

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



### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. ЋЕЛИЈСКА ЛИНИЈА МИШЈИХ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА

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

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

#### 3.2.ЋЕЛИЈСКА ЛИНИЈА ХУМАНИХ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА

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

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

### **3.3. ЋЕЛИЈСКА ЛИНИЈА ХУМАНОГ КАРЦИНОМА ЈЕТРЕ (HepG2)**

У тестовима цитотоксичности коришћена је HepG2, ћелијска линија хуманог карцинома јетре (American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA; HB-8065). Ова линија је добијена из хепатоцелуларног карцинома јетре адолесцента узраста 15 година. Туморске ћелије HepG2 су култивисане у DMEM медијуму (Dulbecco`s Modified Eagles Medium) који садржи 10% феталног бовиног серума (FBS) и инкубиране у атмосфери 5% CO<sub>2</sub>, засићеној воденом паром на температури 37°C.

### **3.4. ИЗОЛАЦИЈА МИШЈИХ ХЕПАТОЦИТА**

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

### **3.5. ИНХИБИЦИЈА ИНДОЛАМИН-2, 3 ДИОКСИГЕНАЗЕ**

У експериментима у којима је испитивано да ли је IDO један од медијатора којим MSCs супримирају NKT ћелије и превенирају хепатитис узрокован активацијом NKT ћелија, коришћен је фармаколошки инхибитор IDO-а, 1-метил DL триптофан (1-MT, 860646, Sigma-Aldrich, St-Louis, MO). 1-MT је рацемска смеша два стереоизомера, *levo*-1-метил триптофана, који компетитивно инхибира IDO1 и *dextro*-1-метил триптофана који компетитивно инхибира IDO2. 1-MT је најпре растворен у 0.1 N NaOH чиме је

направљен 1 mM шток. pH је коригована применом хлороводоничне киселине до 7.5. mMSCs односно hMSCs су култивисане у медијуму са додатком 1-MT (1 mM) у трајању од 48 h (305).

### 3.6. ИНХИБИЦИЈА ИНДУЦИБИЛНЕ АЗОТ ОКСИД СИНТАЗЕ

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

### 3.7. КОНДИЦИОНИРАНИ МЕДИЈУМ ГЕНЕРИСАН ОД MSCs

У циљу добијања кондиционираног медијума, mMSCs односно hMSCs су засејане у густини 10 000 ћелија/cm<sup>2</sup> и култивисане у посудама за културу ћелија- T<sub>75</sub> фласкови (BD Falcon) у комплетном DMEM медијуму који садржи серум у стриктно асептичним условима у атмосфери 5% CO<sub>2</sub>, на температури 37°C. При постизању конфлуентног стања ~80%, ћелије су опране PBS-ом (Invitrogen), а медијум у коме су расле је замењан медијумом који не садржи серум. Након 48h, медијум означен као "MCS-кондициониран медијум" (MCS-CM) је сакупљен, центрифугиран 13 000×g на 4°C у трајању од 10 min и замрзнут на -80°C до извођења анализе (306).

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

степен оштећења јетре животиње су жртвоване након 16 сати. Јетре су изоловане за патохистолошку анализу, а пункцијом абдоминалне аорте крв је сакупљена за биохемијску анализу.

НКТ ћелије, стимулисане  $\alpha$ -GalCer-ом (100ng/ml), су култивисане 48h у пластичним флашковима на 37°C, у атмосфери засићеној воденом паром са 5% CO<sub>2</sub> у MSC-CM у одсуству или присуству 1-MT (1mM) односно L-NMMA (1mM). По истеку култивације, НКТ ћелије су сакупљене и анализирана им је цитотоксичка активност у реалном времену помоћу xCELLigence система. Супернатанти у којима су ћелије култивисане су сакупљени и смрзнути на -20°C у циљу одређивања концентрације цитокина.

$\alpha$ -GalCer-ом стимулисане PBMNCs (100ng/ml) су култивисане у hMSC-CM у одсуству или присуству 1-MT (1mM) односно L-NMMA (1mM), у трајању од 48 h. По истеку инкубације, у супернатантима је мерена концентрација цитокина, док су ћелије коришћене у тесту цитотоксичности.

### **3.8. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ**

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

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

### **3.9. ИНДУКЦИЈА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ ФУЛМИНАНТНОГ ХЕПАТИТИСА КОНКАНАВАЛИНОМ А**

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

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

### **3.10. ИНДУКЦИЈА ЕКСПЕРИМЕНТАЛНОГ ФУЛМИНАНТНОГ ХЕПАТИТИСА $\alpha$ -ГАЛАКТОЦЕРАМИДОМ**

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

### **3.11. АПЛИКАЦИЈА mMSCs**

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

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

### **3.12. ДЕТЕКЦИЈА ТРАНСПЛАНТИРАНИХ mMSCs У ТКИВУ ЈЕТРЕ**

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

### **3.13. ДЕПЛЕЦИЈА РЕГУЛАТОРНИХ ЛИМФОЦИТА**

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

### **3.14. БИОХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ОШТЕЋЕЊА ЈЕТРЕ**

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

### **3.15. ПАТОХИСТОЛОШКА АНАЛИЗА**

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

#### **3.15.1. Израда патохистолошких препарата**

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

резови дебљине 5  $\mu\text{m}$ . Пресеци су нанешени на предметна стакла, а затим бојени одговарајућом техником.

### **3.15.2. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)**

Парафински исечци су претходно загрејани у термостату на  $+56^{\circ}\text{C}$  у трајању од 45 минута. Затим су депарафинисани у ксилолу и урађен је поступак рехидратације ткива испирањем у опадајућим концентрацијама етил алкохола: 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, потом 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дестилованој води. Препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10 минута а затим су испрани дестилованом, а потом и текућом водом 5 минута. Препарати су затим бојени алкохолним еозином (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 2 минута. Након бојења ткиво је дехидратисано и просветљено у ксилолу. За процес дехидратације коришћене су растуће концентрације алкохола и то: 5 минута у 70% алкохолу, затим 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и на крају 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након бојења и поступка дехидратације, добијени препарати су просветљени потапањем 1 минут у мешавини ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1, а потом 2 пута по 1 минут само у ксилолу. Ткивни исечци су прекривени канада балзамом (Canada balsam, Centrohem, Србија) и покривним стаклима. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани под светлосним микроскопом (BX51, Olympus, Japan).

### **3.16. ИЗОЛАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА ИЗ ЈЕТРЕ**

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

Након што је извађена јетра и уклоњена жучна кеса, урађена је перфузија јетре апликовањем 7 mL PBS-а кроз *v. porta*-е. Јетру је уситњена маказицама и нежно, „полугом” шприца, здробљена кроз 200 $\mu\text{m}$  челичну мрежу, а затим је ћелијска суспензија пропуштена кроз ћелијско сито (енгл. *cell strainer*, BD Pharmingen, USA). Добијени садржај је ресуспендован у 50 ml RPMI-1640 медијума (који садржи GlutaMax 1,25mM, HEPES и 10% FCS) и центрифугиран на 507 r.p.m. (60g) 1 минут на

собној температури, без наглог заустављања центрифуге (енгл. *off break setting*). Супернатант (45 ml), који је садржао интрахепатичне ћелије, је пребачен у нову епрувету и центрифугиран на 1433 r.p.m. (480 g) 8 минута на собној температури, са активираним опцијом наглог кочења (енгл. *high break setting*). Добијени талог ресуспендован је у 10 ml 37.5% Percoll у HBSS медијуму који је садржи 100 U јединица хепарина по ml и онда центрифугиран на 1907 r.p.m. (850 g) 30 минута на собној температури, без наглог заустављања центрифуге. Овако добијени талог ресуспендован је у 5 ml пуфера за лизирање еритроцита (енгл. *Er Lysing buffer*), у циљу лизирања еритроцита. Уследила је инкубација ћелија у 5 ml lysing раствора у трајању од 5 минута, на леду (на +4°C). Након истека инкубације, додато је 5 ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом чиме је заустављено даље лизирање. Након тога ћелије су центрифугиране на 1433 r.p.m. (480 g) 8 минута на 8°C, са активираним опцијом наглог кочења. Коначно, добијени талог ресуспендован је или у 1 ml PBS који садржи 1% FCS односно 0,1% NaN<sub>3</sub> (тзв. пуфер за анализу проточном цитометријом, енгл. *FACS buffer*) или у 1 ml комплетног RPMI-1640 медијума (који садржи GlutaMax 1,25mM, HEPES и 10% FCS).

### **3.17. АНАЛИЗА ПОПУЛАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА ЈЕТРЕ ПРОТОЧНОМ ЦИТОМЕТРИЈОМ**

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

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

#### **3.17.1. Бојење мембранских маркера**

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



Табела 1. Моноклонска антитела коришћена у проточној цитометрији

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

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

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

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

Табела 2. Изотипске контроле моноклонских антитела коришћених у проточној цитометрији

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

### 3.17.2. Интрацелуларно бојење цитокина

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

претходно активирана физиолошким стимулусима (311). Инкубациони период у трајању 4-6 часова је довољан за индукцију већине цитокина. Дужа инкубација изазива интензиван цитопатогени ефекат поменутих активатора.

У току *in vitro* стимулације ћелија коришћени су инхибитори интрацелуларног транспорта протеина, *BD GolgyStop*™ (садржи моненсин) и *BD GolgyPlug*™ (садржи брефелдин А). Блокирање интрацелуларног транспорта поменутих инхибиторима резултира акумулацијом већине цитокина у ендоплазматском ретикулуму или Голџи комплексу, па је тако повећана могућност детекције ћелија које продукују цитокине. Моненсин и брефелдин А имају дозно и временски зависан цитотоксични ефекат, па излагање ћелија овим агенсима мора бити ограничено, инкубације дуже од 12 часова су токсичне за ћелије.

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

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

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

(Табела 1). Након истека инкубације ћелије су опране са 2 ml пуфера за бојење и центрифугиране (250g, 5 минута).

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

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

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

Први корак у сепарацији НКТ ћелије је изолација мононуклеарних ћелија јетре које су најпре избројане а онда је узето 10<sup>7</sup> ћелија. Ћелије су центрифугиране 10 минута на 300 G а потом је одливен супернатант и талог ћелија је ресуспендован у 80 µl пуфера (PBS (без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>) w/0.1% BSA и 2mM EDTA (pH 7.4)). Затим је додато 20µl NK1.1+ iNKT Cell Biotin-Antibody Cocktail-а који садржи различита антитела (анти-NKp46, CD45R, CD8a, CD115 и TCRγδ антитело) којима се уклањају одређене популације ћелија. Талог ћелија је добро промешан и инкубиран 10 минута на температури од 2-8°C. По истеку инкубације уследило је прање ћелија у 2 ml пуфера, онда су центрифугиране 10 минута на 300 G на температури од 2-8°C а затим је одливен супернатант. Талог ћелија је ресуспендован у 90µl Buffer а онда је додато 10µl Anti-Biotin MicroBeads. Талог ћелија којима је додат Anti-Biotin MicroBeads је инкубиран 15 минута на температури од 2-8°C. По истеку инкубације ћелије су ресуспендоване у 2 ml пуфера и центрифугиране 10 минута на 300 G. Потом је пипетом уклоњен комплетан супернатант и талог ћелија је ресуспендован у 500µl пуфера. LD колона је затим постављена у магнетно поље MidiMACS сепаратора (Miltenyi Biotec) и припремљена испирањем са 2 ml Buffer-а. Следећи корак је био пропуштање ћелијске суспензије кроз LD колону у магнетном пољу и на тај начин су прикупљене необележене NK1.1<sup>+</sup> НКТ ћелије. Негативно селектоване НКТ ћелије су центрифугиране 10 минута на 300 G а затим је одливен супернатант. Талог ћелија је ресуспендован у 90µl пуфера (PBS (pH=7.2), 0.5% BSA и 2mM EDTA) а онда је додато

10µl Anti-NK1.1-APC. Затим је уследила инкубација ћелија са антителом специфичним за NKT ћелије у трајању 10 минута на температури од 2-8°C. По истеку инкубације ћелије су опране у 2 ml Buffer-а и центрифугиране 10 минута на 300 G. Потом је пипетом уклоњен комплетан супернатант и талог ћелија је ресуспендован у 80 µl пуфера, а онда је додато 20 µL Anti-APC MicroBeads. Талог ћелија којима је додат Anti-APC MicroBeads је инкубиран 15 минута на температури од 2-8°C. По истеку инкубације ћелије су ресуспендоване у 2 ml пуфера и центрифугиране 10 минута на 300 g. Потом је уклоњен комплетан супернатант и талог ћелија је ресуспендован у 500µl пуфера.

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

### **3.19. ИЗОЛАЦИЈА СПЛЕНОЦИТА**

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

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

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

### **3.21. ИЗОЛАЦИЈА PBMNC**

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

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

### **3.22. КОКУЛТИВАЦИЈА NKT ЋЕЛИЈА И MSCs**

NKT ћелије, изоловане на претходно описан начин (3.15.), су култивисане у комплетном медијуму DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma Aldrich*) са 10% FBS-а, 2 mM L-глутамин, 100 IU/ml пеницилин G и 100 µg/ml стрептомицин) уз додатак α-GalCer-а (100 ng/ml) у присуству или одсуству mMSCs, на 37°C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub> у инкубатору. NKT ћелије су кокултивисане са mMSCs у *transwell* систему са 24 отвора (0,4 µm; Corning Incorporated, Life Sciences, France), у односу 10:1 (312). NKT ћелије су постављене у културу у доњу комору *transwell* система (1 x 10<sup>6</sup> ћелија по отвору), док су mMSCs засејане у *transwell* инсерте. Након 48 h инкубације, супернатанти из свих комора су сакупљени и замрзнути на температури од -20°C до мерења концентрације цитокина помоћу ELISA китова у складу са препоруком произвођача. NKT ћелије су сакупљене и анализирани методом проточне цитометрије и коришћене у тестовима цитотоксичности.

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

### **3.23. КОКУЛТИВАЦИЈА T РЕГУЛАТОРНИХ ЛИМФОЦИТА И mMSCs**

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



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

### **3.24. АДОПТИВНИ ТРАНСФЕР РЕГУЛАТОРНИХ ЛИМФОЦИТА**

24 h пре индукције хепатитиса  $\alpha$ -GalCer-ом, мишеви којима су деплетирани Treg лимфоцити на претходно описани начин (3.13), су интравенски примили Treg односно Treg<sup>MSCs</sup> лимфоците у дози од  $1 \times 10^6$  ћелија.

### **3.25. ТЕСТ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ**

За одређивање цитотоксичке активности NKT ћелија изолованих из јетре експерименталних животиња коришћена је DP верзија xCELLigence система, која садржи 3 микротитар плоче са по 16 бунарчића (E16) са златним дном. 100  $\mu$ l комплетног медијума је сипано у сваки бунарчић, након чега је извршена калибрација постављањем xCELLigence система у стандардни инкубатор на 37° у присуству 5% CO<sub>2</sub>. Као циљне ћелије коришћене су ћелије туморске линије HepG2. Суспензија таргет ћелија (T - HEPG2) је припремљена на следећи начин: туморске ћелије су одвојене са дна флашка и то краткотрајним третирањем раствором 0.25% trypsin-а и 0.02% EDTA раствореног у PBS-у. Како би се неутралисало даље дејство trypsin-а, ћелијама је додато 6 ml DMEM медијума са 10% FBS-ом, а затим су центрифугиране на 125 g 5 минута. Након одливања супернатанта, ћелије су ресуспендоване у комплетном медијуму. Вијабилност туморских ћелија је одређивана помоћу trypan-blue-а и за тест цитотоксичности је коришћена ћелијска суспензија са више од 95% вијабилних ћелија. Потом је припремљена суспензија ћелија ( $4 \times 10^5$  ћелија/ml комплетног медијума) тако да је у свако бунарче E16 плоче сипано по 100  $\mu$ l медијума у коме се налазило  $4 \times 10^4$  туморских ћелија. E16 плоче су постављене у xCELLigence систем, након чега је уследила инкубација таргет ћелије на температури од 37°C и у присуству 5% CO<sub>2</sub> у трајању 24h.

Ефекторске ћелије које су изоловане на претходно описан начин (мишје NKT ћелије, хумане PBMNC) су кокултивисане са таргет ћелијама у односу 10:1 (313), на тај начин што су ресуспендоване у комплетном медијуму ( $4 \times 10^6$  ћелија/ml комплетног медијума), а затим су у одговарајуће бунарчиће сипане у волумену од 100 $\mu$ l по истеку 24-часовне инкубације таргет ћелија. E16 плоче су постављене у xCELLigence систем којим је мерен ћелијски индекс на 15 минута током 24 сата (37°C; 5% CO<sub>2</sub>). Подаци су анализирани коришћењем програма RTCA Software 1.2 (Acea Biosciences).

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

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

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

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

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

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

По 100  $\mu$ l радне концентрације везујућег антитела сипано је у бунарчиће микротитар плоча са 96 бунарчића са равним дном (SARSTED). Плоче су прелепљене адхезивном фолијом и остављене преко ноћи на собној температури, након чега су бунарчићи мануелно испрани пуфером за испирање. Затим је у све бунарчиће додат блокирајући пуфер у финалном волумену од 300  $\mu$ l и плоче су остављене један сат на собној температури, а потом испране пуфером за испирање. Разблажени узорци и припремљени стандарди су сипани у микротитар плоче, прекривени адхезивном фолијом и остављени два сата на собној температури. Након инкубације и испирања микротитар плоча, у све бунарчиће је додато 100  $\mu$ l радне концентрације антитела за детекцију. Плоче су обложене адхезивном фолијом и поново остављене два сата на собној температури. Плоче су потом испране и у бунарчиће је сипано 100  $\mu$ l радне концентрације *Streptavidin*-HRP (енгл. *Streptavidin horseradish peroxidase*). Инкубација на собној температури и без директног излагања светлости прекинута је након 20 минута, испирањем микротитар плоча. У бунарчиће је сипано 100  $\mu$ l раствора супстрата (енгл. *Substrate solution: Color reagent A + Color reagent B*, у односу 1:1). Плоче су остављене на собној температури заклоњене од директне светлости, а након 20 минута додато је 50  $\mu$ l раствора за прекидање реакције. После мешања у трајању од неколико минута измерена је оптичка густина узорака на *MicroplateReader*-у (*Zenyth*, *Anthos*, UK) на таласној дужини од 450nm

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

### 3.27. МЕРЕЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ КИНУРЕНИНА

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

### 3.28. ПОЛИМЕРИЗОВАНА ЛАНЧАНА РЕАКЦИЈА (PCR)

#### 3.28.1. Изолација РНК

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

#### 3.28.2. Реверзна транскрипција

Након мерења концентрација на *Gene Quant* колориметру волумену раствора који садржи 1 $\mu$ g РНК додавано је 15 $\mu$ l воде и 0,2 $\mu$ g насумичних прајмера (*Fermentas, Vilnius, Литванија*). Након тога у раствору је додаван и dNTP (3'-деокси нуклеотид трифосфат)

(*Fermentas, Vilnius*, Литванија) тако да финална концентрација буде 1mM. Као контрола за евентуалну контаминацију служила је вода. Раствори су инкубирани 10 минута на 70°C, да би се прајмери (хексамери) насумично везивали за РНК, по истеку тог времена узорци су пренети на суви лед. Након пет минута у узорке је додавано по 4µl пуфера за реверзну транскрипцију (5 x *First Strand Buffer, Fermentas, Vilnius*, Литванија) и 1µl M-MuLV реверзне транскриптазе (200 U/µl, *Fermentas, Vilnius*, Литванија). Уследила је инкубација у трајању од 10 минута на 25°C, а потом 60 минута на 42°C, да би се одиграла реакција реверзне транскрипције. Реакција је прекинута инкубацијом узорака на 70°C током 10 минута. На овај начин добијена је cDNA (комплеметарна DNA), која је у раствороном стању чувана на +4°C до употребе у реакцији ланчаног умножавања.

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

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

### 3.29. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

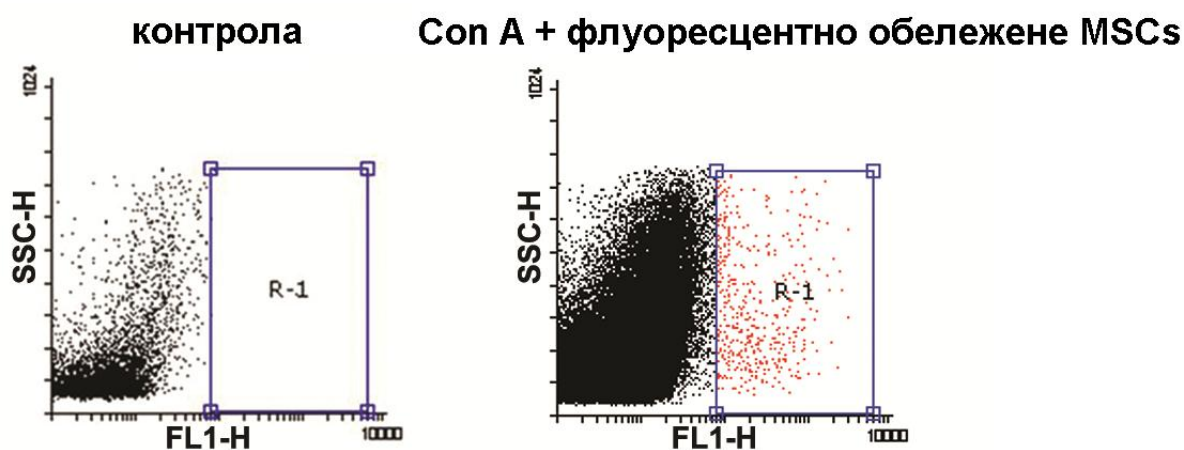
Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS верзија 19. Нормалност расподеле је одређена тестом *Kolmogorov-Smirnov*. Уколико су вредности имале нормалну расподелу коришћен је параметарски *Student's*-ов t тест. У случају неправилне расподеле коришћен је непараметарски *Mann-Whitney*-ев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

## 4. РЕЗУЛТАТИ

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

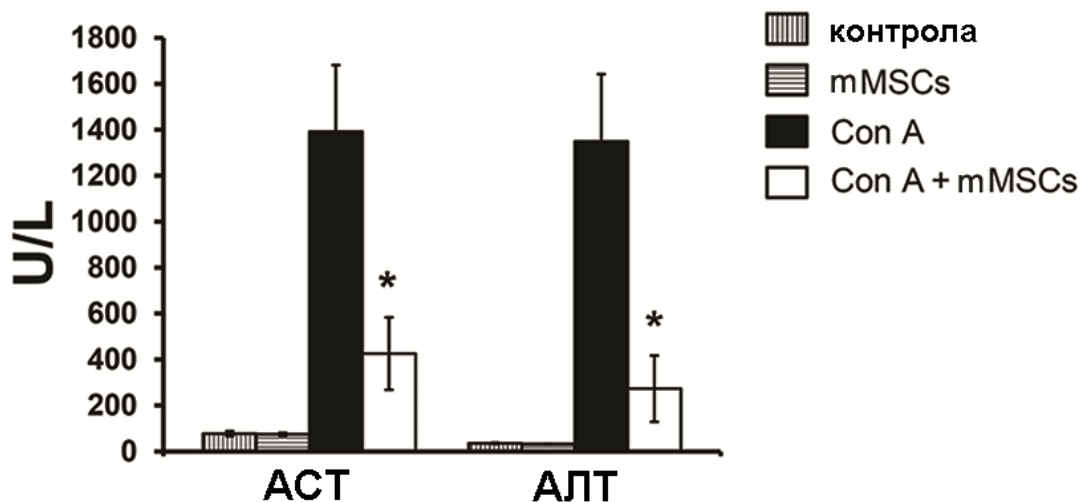
Иако су многе студије показале широк спектар хепатопротективних ефеката mMSCs, ефекат mMSCs на NKT ћелије, главне ефекторске ћелије у фулминантном хепатитису, још увек није познат.

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



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

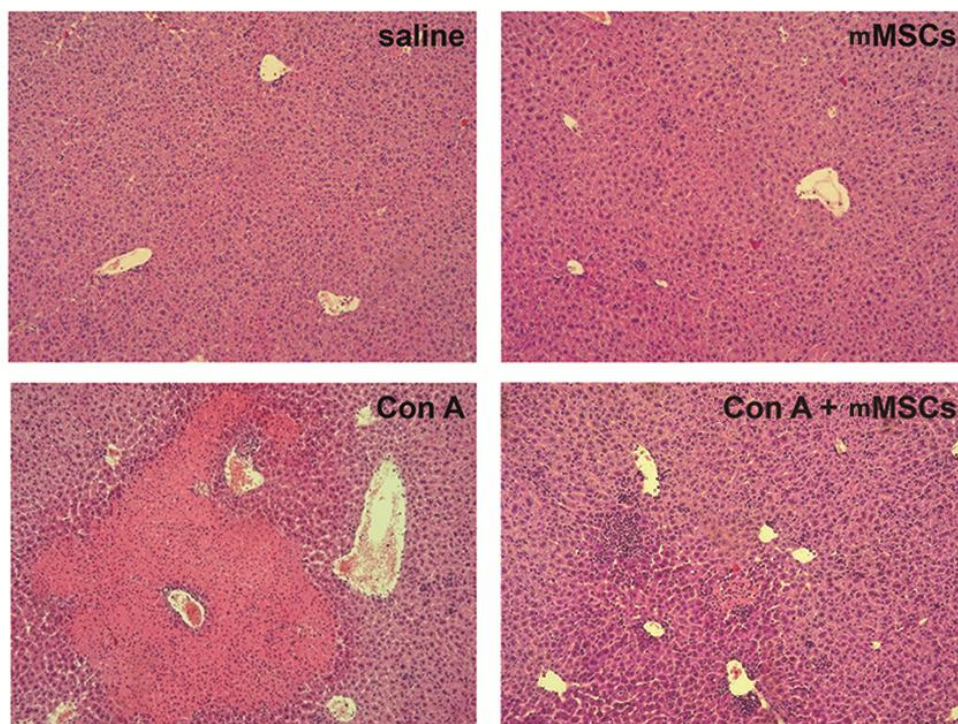
Као што је приказано на графикаону 1, статистички значајан ( $p < 0.05$ ) пад трансминаза (АСТ и АЛТ) је уочен код мишева који су након Con A примили mMSCs, у поређењу са животињама којима је апликован само Con A. Нема значајне разлике у нивоу трансминаза код мишева контролних група (Графикон 1).



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

Анализом патохистолошких препарата исечака јетре потврђени су резултати биохемијских испитивања. Као што је приказано на слици 1, примена једне дозе mMSCs спречила је масовно оштећење хепатоцита индуковано интравенском применом Con A. Само појединачна поља фокалне некрозе, мале површине, уочена су код мишева којима су апликоване mMSCs. Супротно, поља некрозе великих површина са јасно видљивом вакуолизацијом, кариолизом и кондензацијом хроматина хепатоцита била су присутна у јетри мишева који су примили само Con A. Јетре мишева који су примили само 0.9%NaCl односно само mMSCs, биле су без оштећења, односно имале су нормалну грађу (Слика 12).



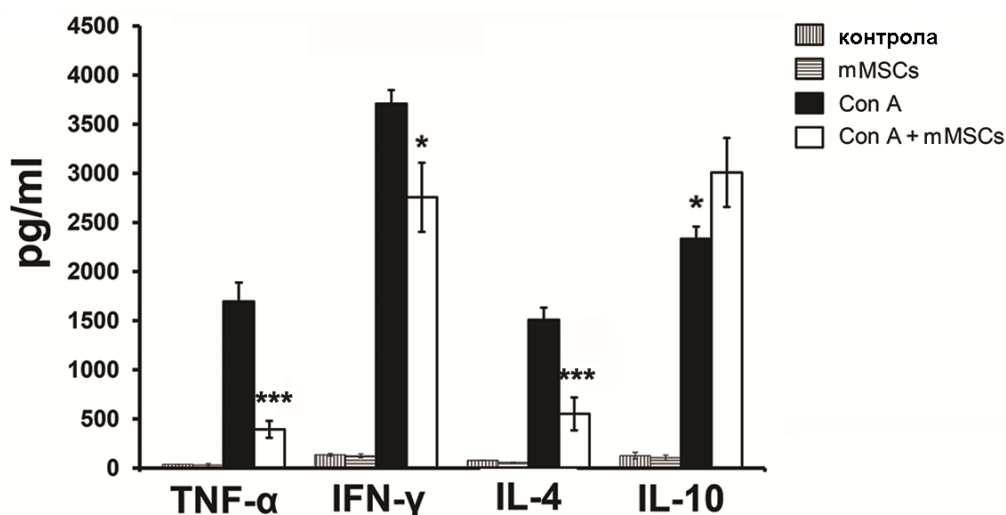


Слика 12. Репрезентативни исечци јетре обојени стандарним патохистолошким бојењем, увећање x 100 (H&E).

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

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

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



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

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

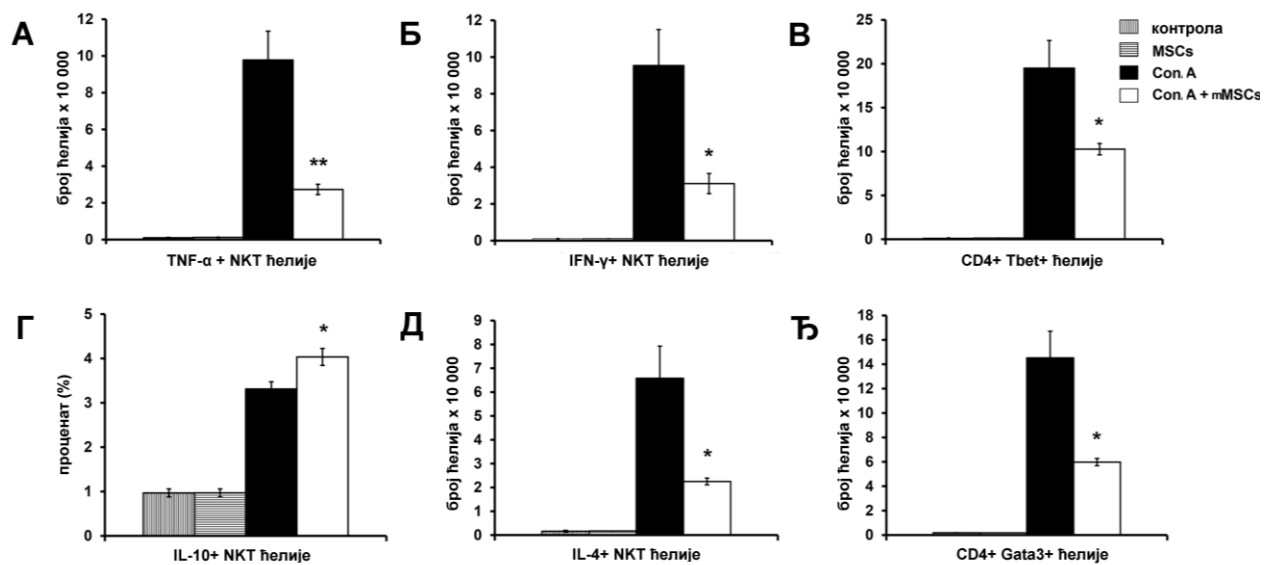
Налаз значајно мањег оштећења јетре као и мање серумске концентрације проинфламацијских цитокина у мишева који су примили mMSCs, имплицирали су претпоставку да би смањена инфилтрација инфламацијским ћелијама могла бити одговорна за уочене разлике. Зато су проточном цитометријом, одређивани како проценат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

##### 4.2.1. mMSCs значајно смањују инфилтрацију инфламацијских NKT ћелија у јетри

Обзиром да су претходне студије показале да NKT ћелије играју главну улогу у патогенези Con A индукованог хепатитиса, проточном цитометријом је одређен цитокински профил NKT ћелија, дефинисаних као CD4<sup>+</sup>CD1d тетрамер<sup>+</sup> ћелије, изолованих из јетри мишева којима су интравенски апликовани Con A и mMSCs, или само Con A. Као што је приказано на графикону 3, 8 сати након интравенске

апликације Con A (12 mg/kg TT), број NKT ћелија, које продукују TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ , и које експримирају Th1 транскрипциони фактор T-bet је био статистички значајно мањи у јетри мишева којима су интравенски апликоване mMSCs непосредно након Con A у поређењу са мишевима који су примили само Con A ( $p < 0.01$  за CD4<sup>+</sup> CD1d тетрамер<sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> NKT ћелије;  $p < 0.05$  за CD4<sup>+</sup> CD1d тетрамер<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> NKT ћелије;  $p < 0.05$  за CD4<sup>+</sup> T-bet<sup>+</sup> ћелије) (Фигура 1). Уз то, број NKT ћелија које продукују IL-4 и експримирају Th2 транскрипциони фактор GATA3 је био статистички значајно ( $p < 0.05$ ) мањи у јетри мишева који су примили mMSCs.

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



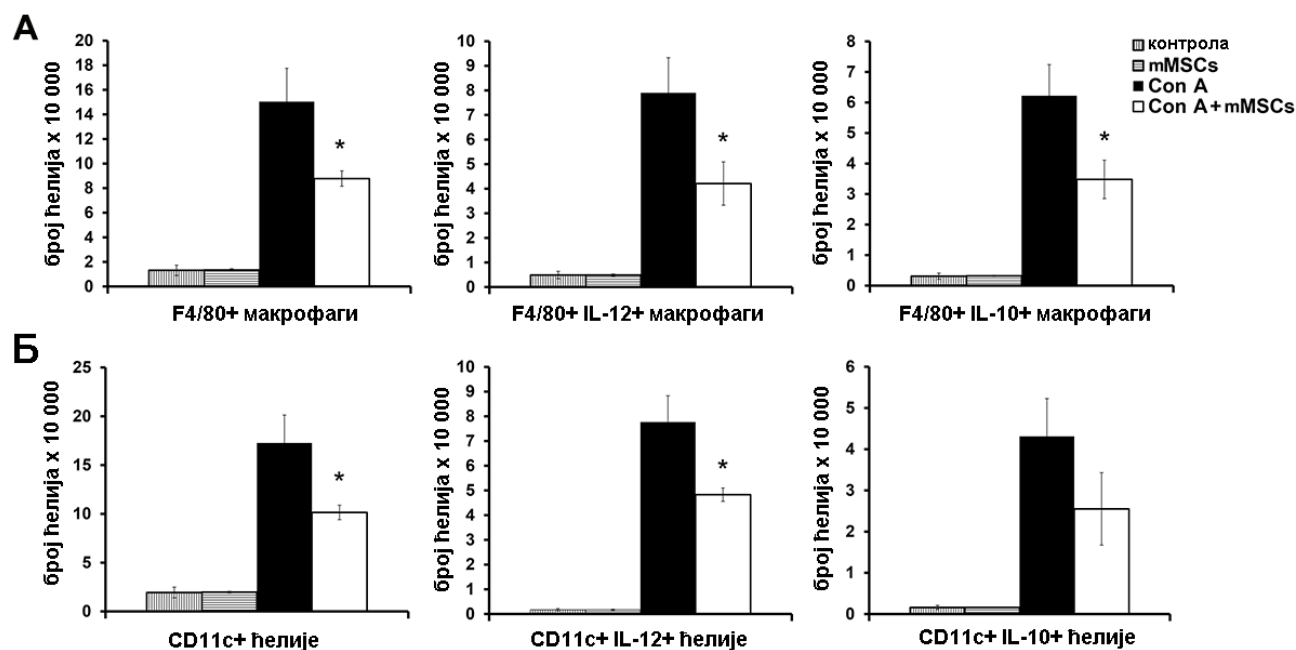
**Фигура 1.** Интравенски апликоване mMSCs смањују број NKT ћелија које продукују цитокине у јетри мишева којима је индукован Con A хепатитис. NKT ћелије изоловане из јетре мишева су анализирани методом проточне цитометрије, 8 сати након третмана. Укупан број NKT ћелија које продукују (А) TNF- $\alpha$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

#### 4.2.2. mMSCs значајно смањују инфлукс макрофага и дендритских ћелија у јетру

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

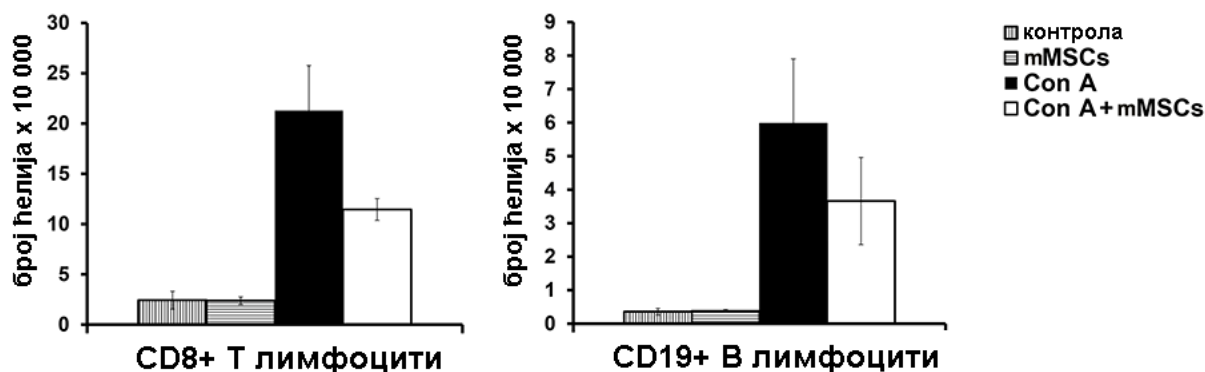
Интравенска примена mMSCs, статистички је значајно смањила укупан број макрофага, дефинисаних као F4/80<sup>+</sup> ћелије, као и макрофага који продукују IL-12 и IL-10 у јетри мишева којима је хепатитис индукован апликацијом Con A (Фигура 2А).

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



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

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



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

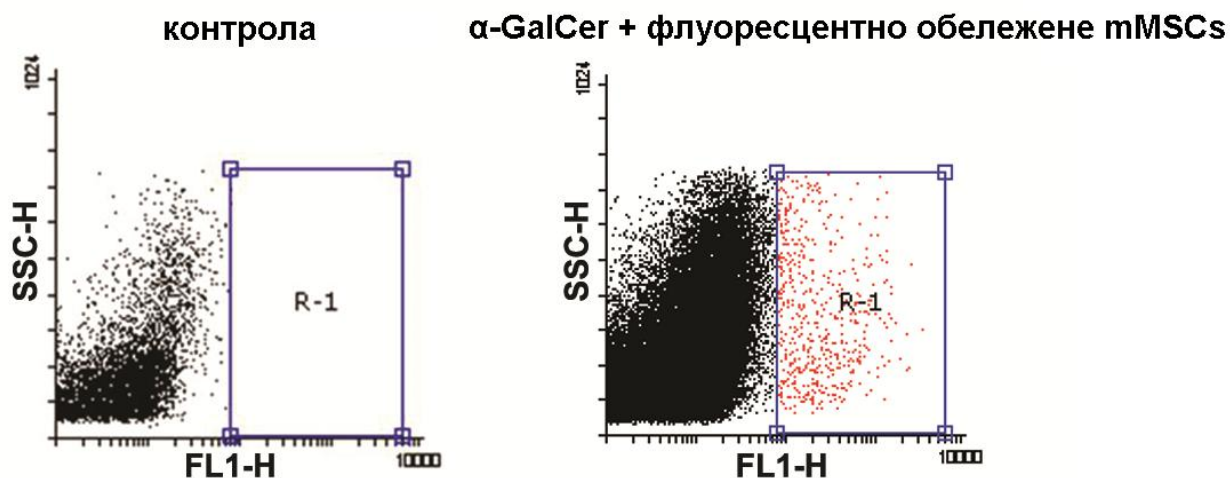
#### 4.3. Примена mMSCs значајно смањује оштећење јетре изазвано $\alpha$ -GalCer-ом

У циљу испитивања да ли mMSCs супримирају ефекторске функције NKT ћелија јетре директно и независно од дендритских ћелија и макрофага, у даљем току истраживања коришћен је модел фулминантног хепатитиса који је мишевима изазван  $\alpha$ -GalCer-ом, специфичним и снажним активатором NKT ћелија.

У ту сврху, најпре су одређене концентрације трансаминаза у серуму и анализирани патохистолошки препарати јетре како би се испитало да ли интравенска примена mMSCs може да редукује оштећење јетре изазвано  $\alpha$ -GalCer-ом.

Као експерименталне животиње коришћени су мишеви соја C57BL/6 насумично сврстани у две експерименталне и две контролне групе. Мишеви прве експерименталне групе интравенски су примили  $\alpha$ -GalCer (50 $\mu$ g/kg TT), претходно растворен у физиолошком раствору (0.9%NaCl), док су мишеви друге експерименталне групе непосредно након  $\alpha$ -GalCer-а интравенски примили  $5 \times 10^5$  mMSCs ресуспендованих у 200  $\mu$ l 0.9%NaCl-а. Мишеви груписани у прву контролну групу су интравенски

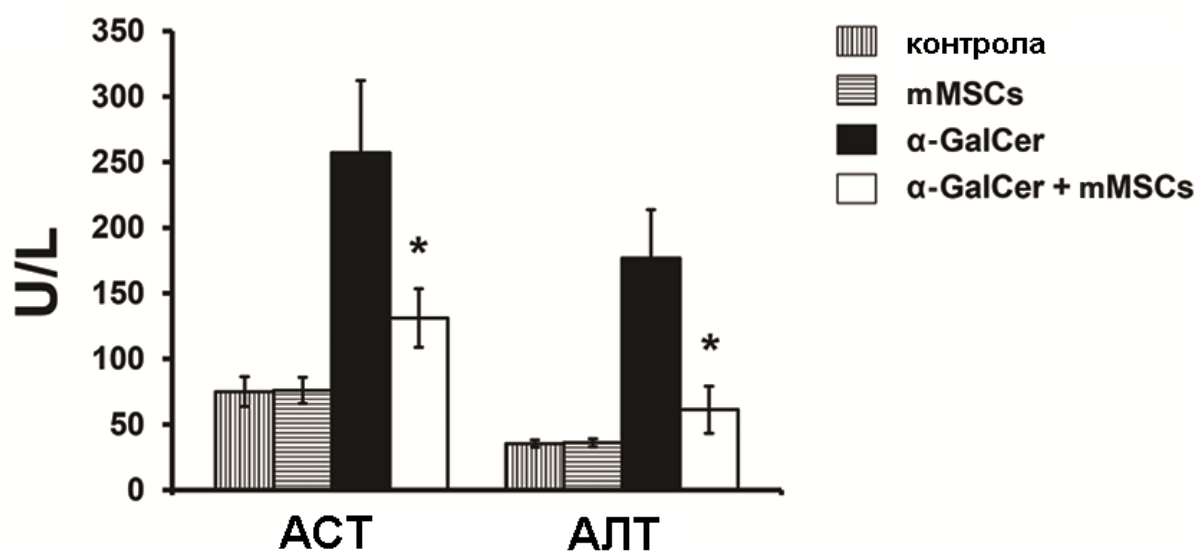
примили само 0.9%NaCl, док су мишеви сврстани у другу контролну групу интравенски примили само mMSCs.



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

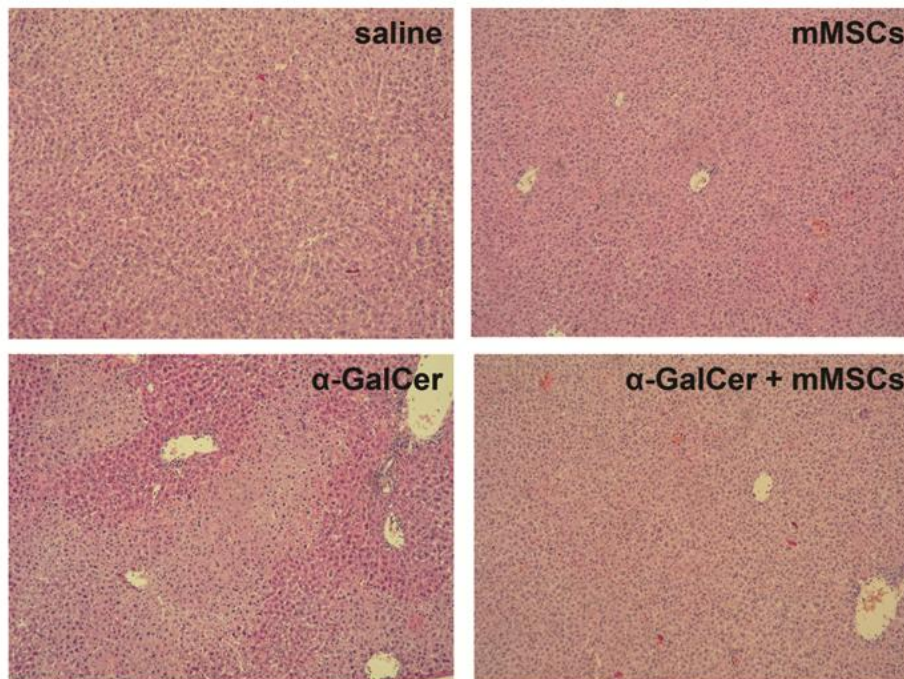
Концентрација трансаминаза (АСТ и АЛТ) у серуму мишева експерименталних група, мерена 16 сати након апликације α-GalCer-а (50μg/kg TT), је показала да интравенска примена  $5 \times 10^5$  mMSCs може да редукује тешко оштећење јетре изазвано α-GalCer-ом. Као што је приказано на графикону 5, концентрација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





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

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



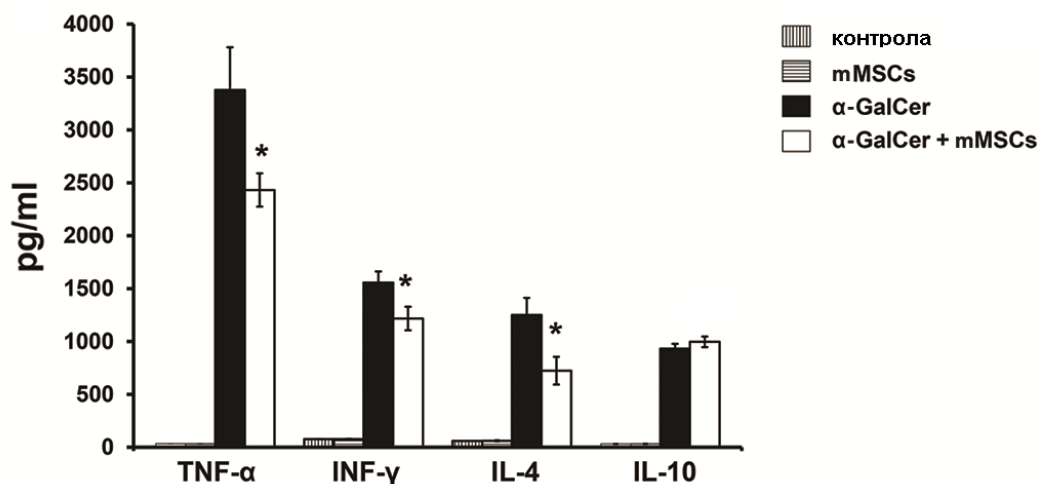
Слика 14. Репрезентативни исечци јетре мишева након примене  $\alpha$ -GalCer-а и mMSCs. Стандарно патохистолошко бојење (H&E), увећање x 100.

#### 4.3.1. Примена mMSCs смањује концентрацију TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ и IL-4 у серуму

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

Мерењем цитокина у серуму 2 сата након интравенске примене  $\alpha$ -GalCer (50 $\mu$ g/kg TT) (Графикон 4), утврђено је статистички значајно смањење концентрације TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ), IFN- $\gamma$  ( $p < 0.05$ ) и IL-4 ( $p < 0.05$ ), у серуму мишева који су примили  $5 \times 10^5$  mMSCs, у поређењу са мишевима којима је дат само  $\alpha$ -GalCer. Као што се може видети на графикону 7, иако је забележен пораст IL-10 у серуму мишева који су примили mMSCs после  $\alpha$ -GalCer, није било статистичке разлике ( $p > 0.05$ ) у његовој концентрацији у серуму мишева експерименталних група.



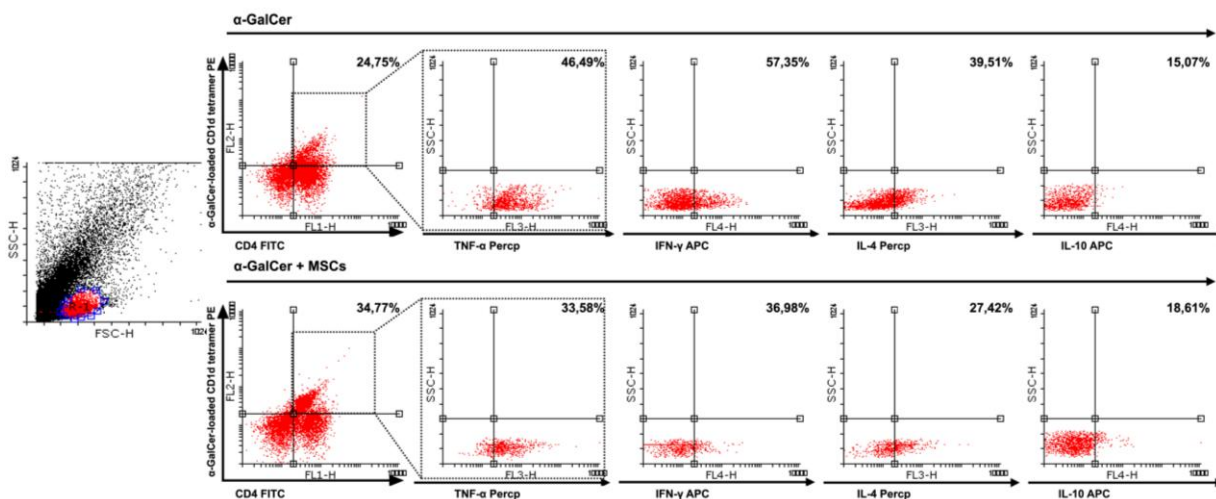


**Графикон 4.** Серумске вредности цитокина након примене  $\alpha$ -GalCer-a и mMSCs. Концентрација серумског TNF alpha, INF- $\gamma$  и IL-4 је статистички значајно мања код мишева који су после  $\alpha$ -GalCer-a интравенски примили  $5 \times 10^5$  mMSCs у поређењу са мишевима којима је дат само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

#### 4.3.2. mMSCs смањују инфлукс NKT ћелија које продукују проинфламацијске цитокине

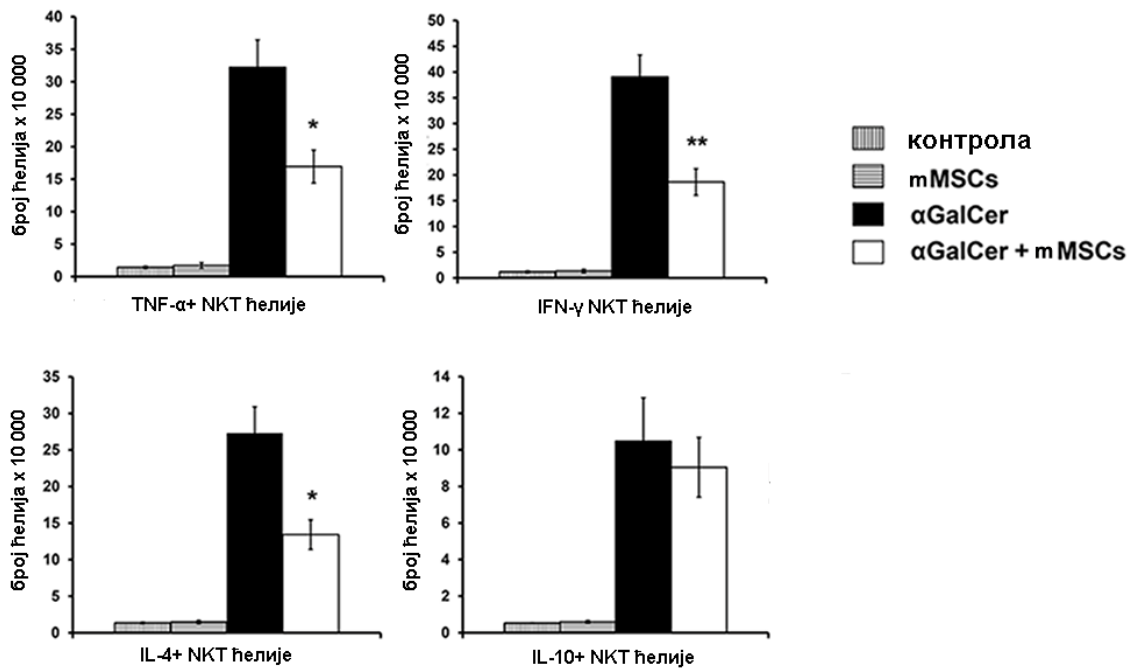
Након што је уочено да у серуму мишева који су примили  $\alpha$ -GalCer и mMSCs постоји значајна разлика у концентрацији цитокина у односу на мишеве којима је дат само  $\alpha$ -GalCer (Графикон 4), испитано је присуство и природа инфламације у јетри експерименталних животиња анализом фенотипских и функционалних карактеристика изолованих ћелија јетре методом проточне цитометрије.

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



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

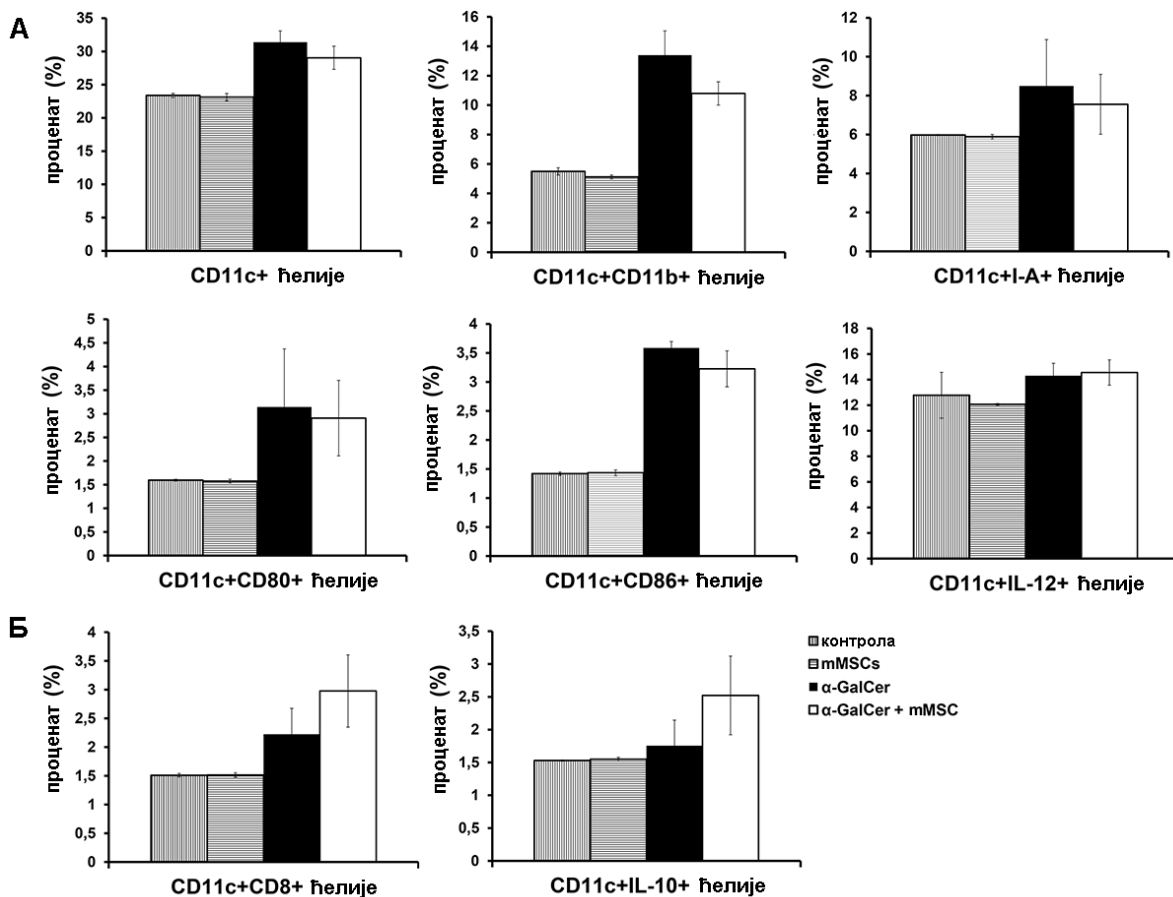
Забележене разлике у процентуалној заступљености различитих популација NKT ћелија постојале су и када је анализиран апсолутни број тих популација у узорцима, па је тако број NKT ћелија које продукују TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и IL-4 у мишева који су након  $\alpha$ -GalCer (50 $\mu$ g/kg TT) примили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



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

#### 4.3.3. Примена mMSCs не мења заступљеност дендритских ћелија у јетри мишева којима је хепатитис изазван $\alpha$ -GalCer-ом

У даљем току истраживања је уочено да примена mMSCs ( $5 \times 10^5$ ) не утиче значајно на инфилтрацију инфламацијских CD11c<sup>+</sup> дендритских ћелија које експримирају CD11b, MHC молекуле II класе, ко-стимулаторне молекуле CD80 и CD86, као и дендритских ћелија које продукују IL-12 у јетри мишева са  $\alpha$ -GalCer хепатитисом (Фигура 5). Међу експерименталним групама такође није било статистички значајне разлике ( $p > 0.05$ ) ни у броју регулаторних дендритских ћелија, дефинисаних као CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> ћелије које продукују IL-10 (Фигура 5), што указује да mMSCs модулирају продукцију цитокина директним деловањем на NKT ћелије.

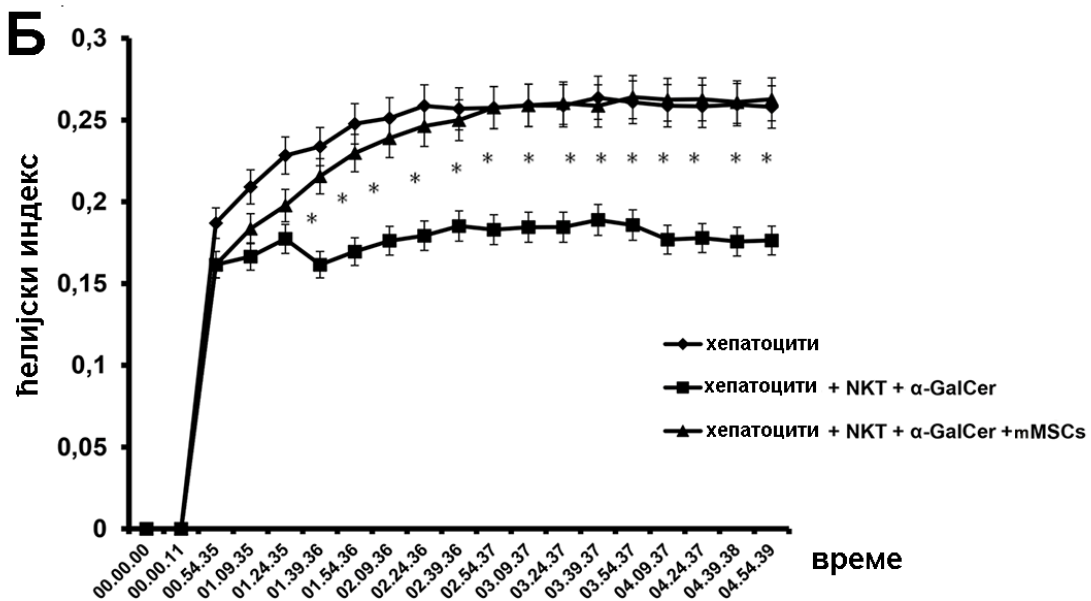
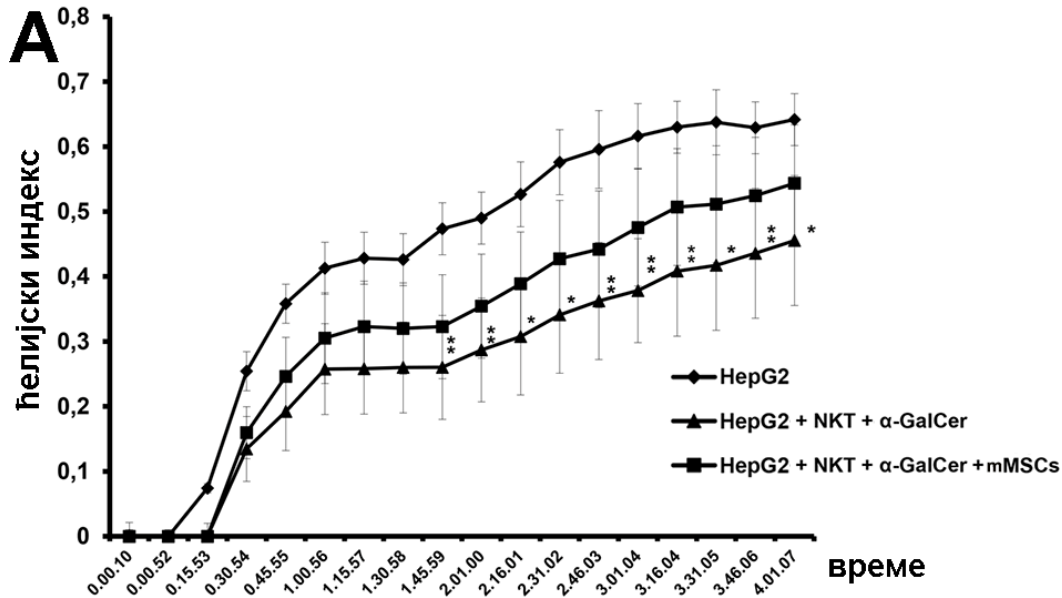


**Фигура 5.** Примена mMSCs не утиче значајно на фенотип дендритских ћелија које инфилтришу јетру мишева са  $\alpha$ -GalCer хепатитисом. Не постоји разлика ( $p > 0.05$ ) у процентуалној заступљености (А) инфламацијских и (Б) регулаторних дендритских ћелија у јетри мишева којима су дати  $\alpha$ -GalCer (50 $\mu$ g/kg TT) и  $5 \times 10^5$  mMSCs, у поређењу са мишевима који су примили само  $\alpha$ -GalCer. Резултати 2 експеримента са најмање 8 мишева по групи (средња вредност  $\pm$  SE).

#### 4.3.4. Интравенска апликација mMSCs смањује цитотоксичку активност NKT ћелија јетре

Пошто је у јетри мишева са  $\alpha$ -GalCer хепатитисом који су примили mMSCs показана јасна разлика у броју инфламацијских NKT ћелија, која није праћена разликом у броју активираних дендритских ћелија, у даљем току истраживања у циљу откривања механизма хепатопротективног ефекта mMSCs у NKT-посредованом хепатитису, испитан је цитотоксички потенцијал NKT ћелија јетре 2 сата након апликације  $\alpha$ -GalCer (50 $\mu$ g/kg TT), односно  $\alpha$ -GalCer и  $5 \times 10^5$  mMSCs. Цитотоксичност NKT ћелија јетре као ефекторских ћелија испитана је у 48-часовној култури са ћелијама хепатоцелуларног карцинома односно мишјим хепатоцитима (таргет ћелије), у односу ефектор: таргет 10:1, коришћењем xCELLigence система (Фигура 6).

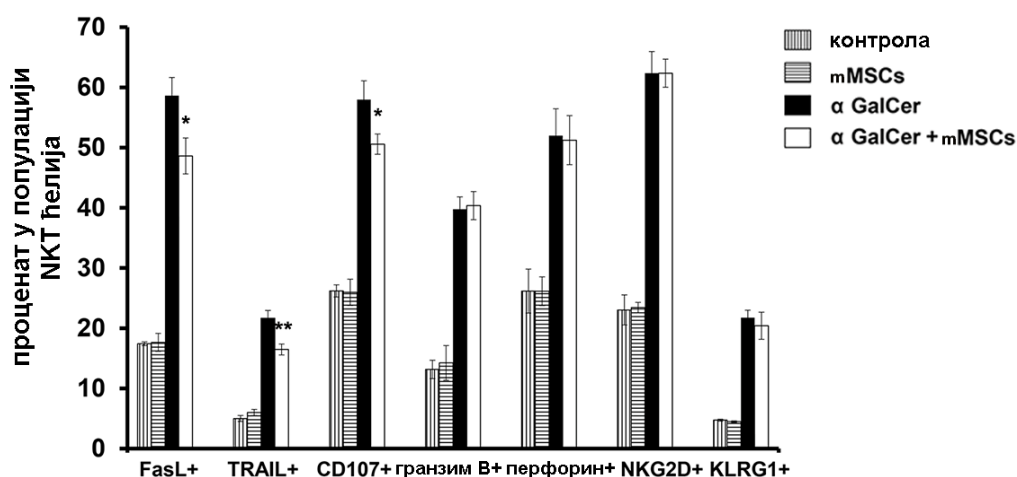
На графикону 10 је приказано да NKT ћелије изоловане магнетном сепарацијом из јетри мишева који су након  $\alpha$ -GalCer примили mMSCs показују значајно ( $p < 0.05$ ) мању цитотоксичку активност у поређењу са NKT ћелијама мишева којима је апликован само  $\alpha$ -GalCer, ова разлика је статистички убедљивија након 2 сата кокултивације. Смањен убилачки потенцијал NKT ћелија је највероватније последица имуномодулаторних активности убризганих mMSCs.



**Фигура 6. Системска апликација mMSCs смањује цитотоксичку активност NKT ћелија јетре према HerG2 туморским ћелијама.** Цитотоксичка активност NKT ћелија према (А) HerG2 таргет ћелијама и (Б) хепатоцитима испитивана је xCELLigence системом у трајању од 48 сати, однос ефектор: таргет 10:1. Резултати су представљени кроз ћелијски индекс таргет ћелија у реалном времену. Хепатотоксичност NKT ћелија изолованих из јетри мишева који су примили,  $\alpha$ -GalCer (50 $\mu$ g/kg TT) и  $5 \times 10^5$  mMSCs је значајно мања у поређењу са хепатотоксичношћу NKT ћелија изолованих из јетри мишева који су примали само  $\alpha$ -GalCer. Приказане вредности су средње вредности +/- SE; \*  $p < 0.05$ , најмање 8 мишева по групи.

#### **4.3.5. Примена mMSCs смањује процентуалну заступљеност FasL, TRAIL и CD107, али не утиче на заступљеност перфоринона, гранзима B, NKG2D и KLRG1 на NKT ћелијама у јетри мишева**

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

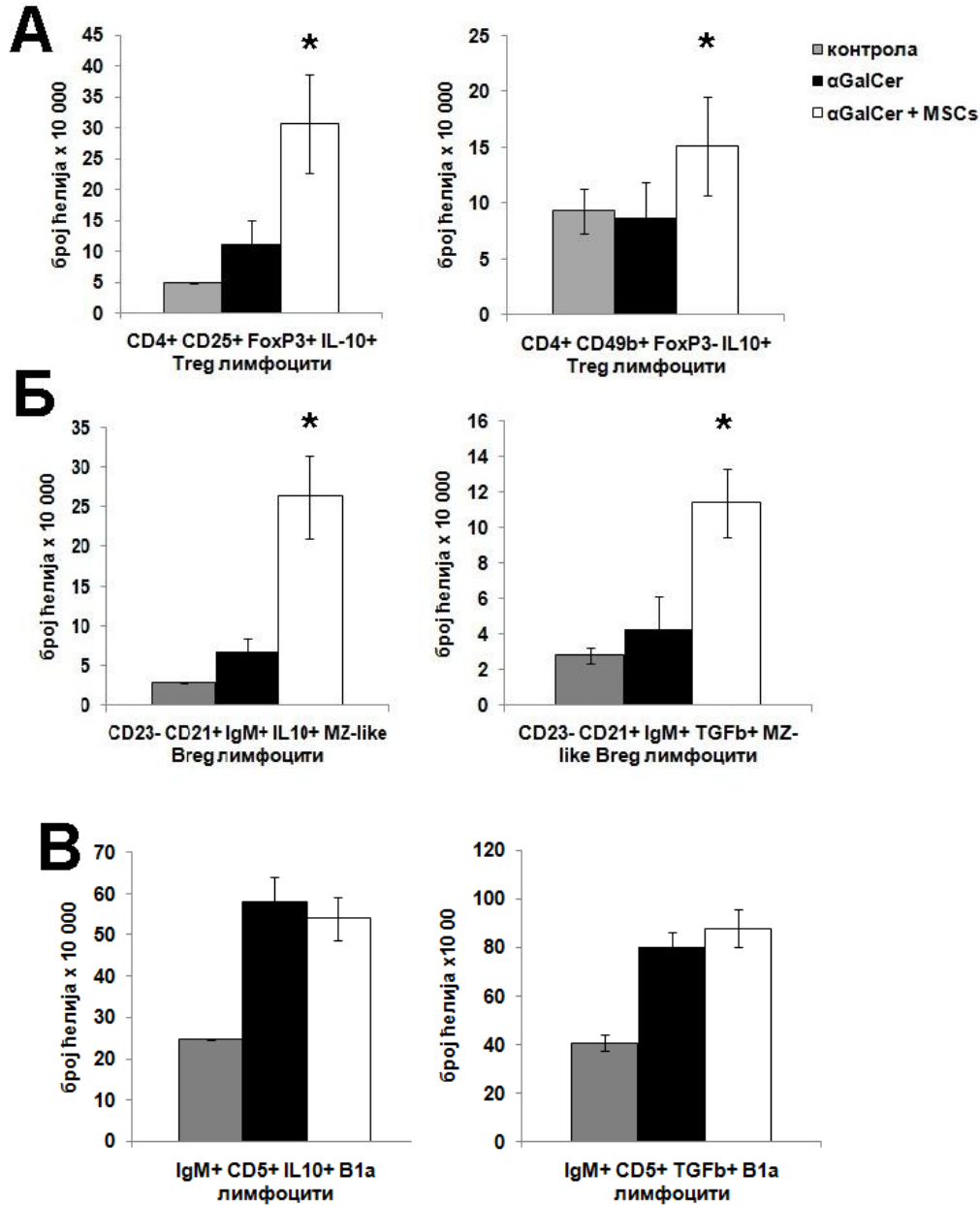


**Графикон 5.** Примена mMSCs смањује процентуалну заступљеност FasL, TRAIL и CD107 на NKT ћелијама, али не утиче на заступљеност перфоруина, гранзима В, NKG2D и KLRG1 на NKT ћелијама у јетри мишева. Мишеви који су након α-GalCer примили  $5 \times 10^5$  mMSCs, имају смањен проценат FasL, TRAIL и CD107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

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

Познато је да MSCs повећавају експресију транскрипционог фактора FoxP3 у лимфоцитима и промовишу настанак и експанзију  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Treg лимфоцита који продукују IL-10<sup>+</sup> (266, 267). Анализом фенотипа мононуклеарних ћелија које су инфилтрисале јетре мишева који су примили само α-GalCer (50μg/kg TT) односно α-GalCer и  $5 \times 10^5$  mMSCs, уочено је да апликација mMSCs значајно повећава присуство регулаторних ћелија у јетри. Као што се може видети на графикону, статистички значајно ( $p < 0.05$ ) већи број  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Treg лимфоцита који продукују IL-10 и  $CD4^+CD49b^+FoxP3^-$  лимфоцита који продукују IL-10 инфилтрисао је јетре мишева који су примили mMSCs 2 сата након апликовања α-GalCer, у поређењу са мишевима којима је дат само α-GalCer (Фигура 7А). Уз то, убризгавање mMSCs узроковало је статистички значајно ( $p < 0.05$ ) повећање апсолутног броја  $CD23^-CD21^+IgM^+$  MZ-like В лимфоцита који продукују IL-10 и TGF-β у јетри мишева са хепатитисом (Фигура 7Б).

Међутим, није било разлике у броју перитонеалних B1a регулаторних лимфоцита фенотипа  $IgM^+CD5^+$  који продукују IL-10 и TGF- $\beta$  нити у броју перитонеални  $IgM^+CD5^-$  B1b лимфоцита између експерименталних група (Фигура 7B).



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

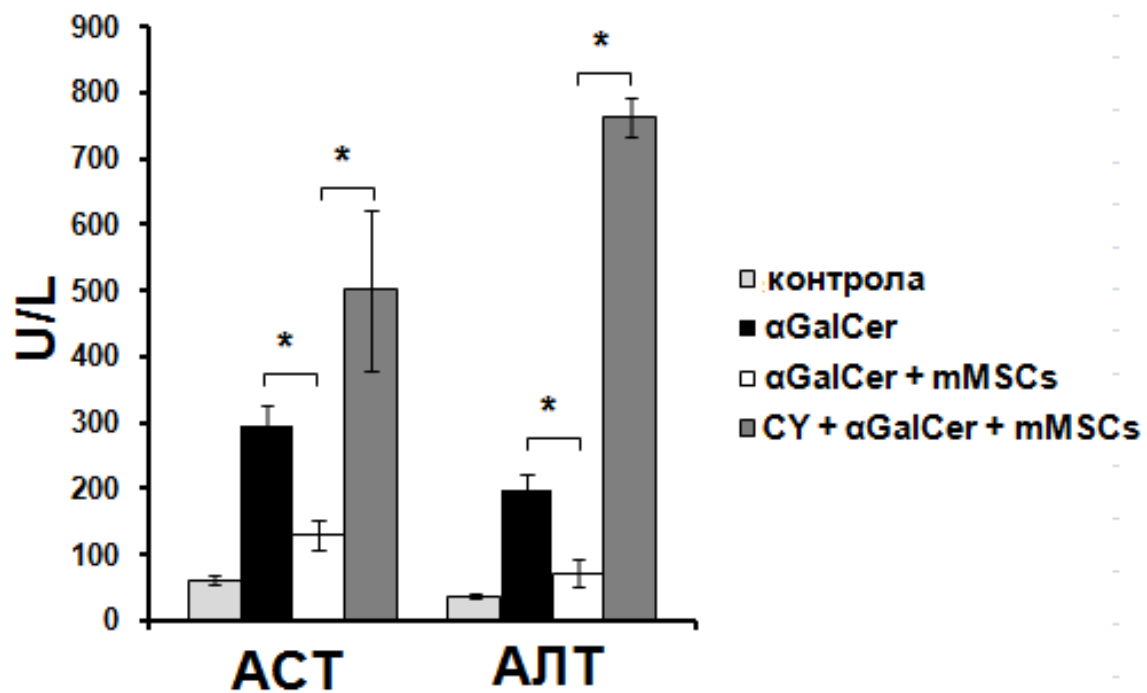


Добијени налази сугеришу да примена mMSCs повећава број Treg и MZ-like B лимфоцита у инфламираној јетри, што промовише стварање имуносупресивне микросредине и може бити један од механизма који се налази у основи хепатопротективног ефекта mMSCs у акутном оштећењу јетре у коме су NKT ћелије главне ефекторске ћелије.

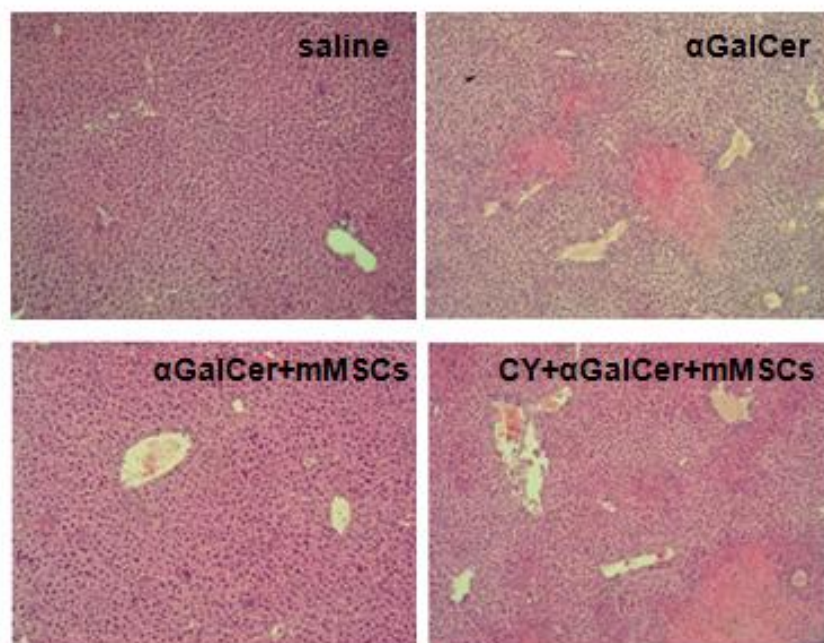
#### **4.3.7. Деплеција Treg лимфоцита циклофосфамидом значајно смањује капацитет mMSCs да редукују оштећење јетре узроковано активацијом NKT ћелија**

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

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



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

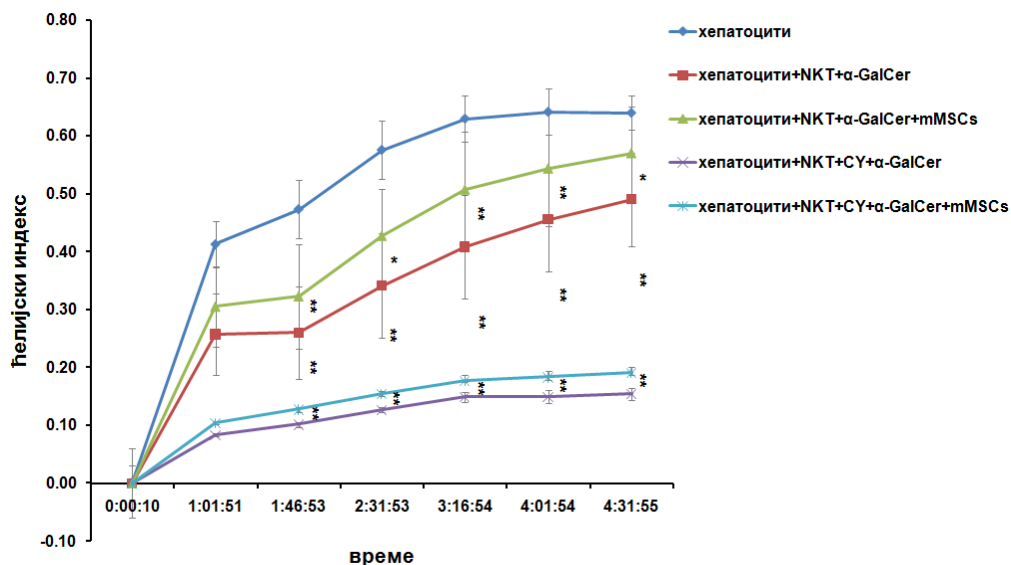


Слика 16. Репрезентативни исечци јетре мишева након примене CY. Стандарно патохистолошко бојење (H&E), увећање x 100.

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

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

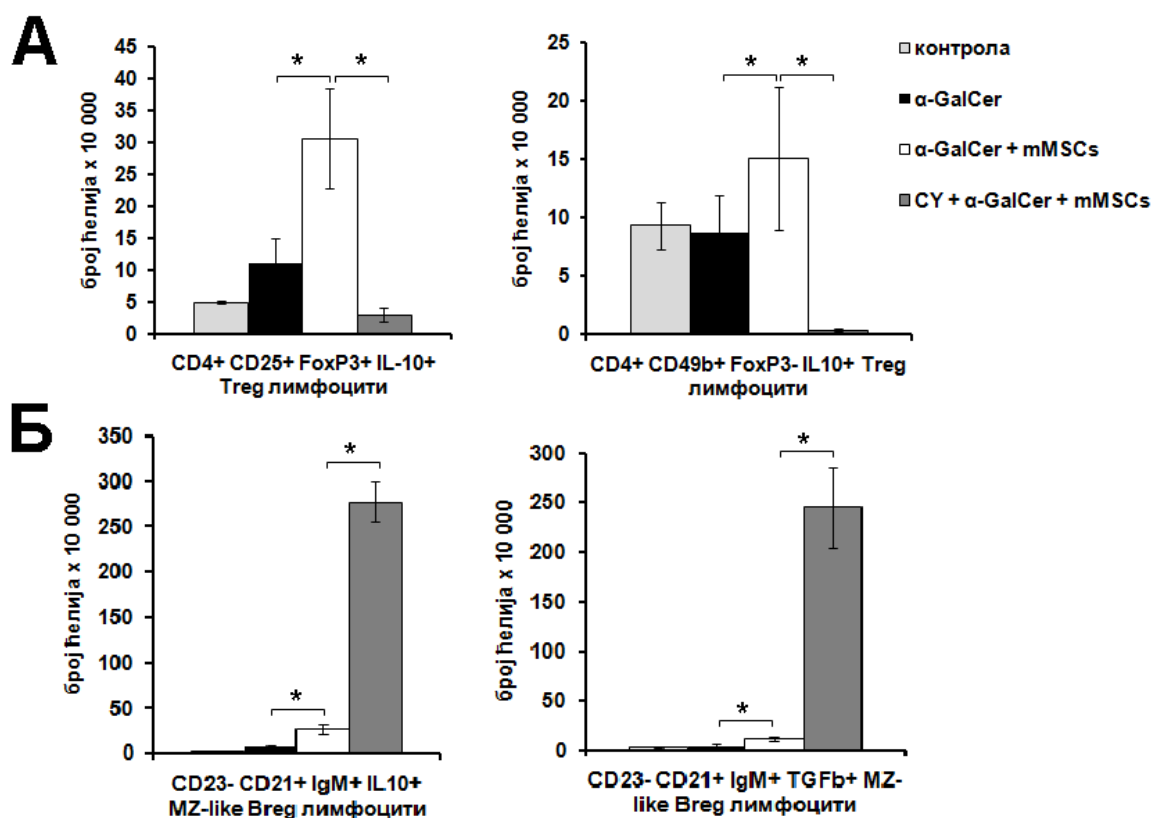
На графикону 7 је приказано да NKT ћелије изоловане магнетном сепарацијом из јетри мишева који су након  $\alpha$ -GalCer-а примили mMSCs показују статистички значајно ( $p < 0.05$ ) мању цитотоксичку активност у односу на NKT ћелије мишева којима су пре примене  $\alpha$ -GalCer и mMSCs деплетирани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



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

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

Интересантно, примена mMSCs након ефикасне деплеције Treg лимфоцита (Фигура 8А), подстиче активацију и инфлукс Vreg лимфоцита у јетру мишева којима је изазван хепатитис. Забележен је статистички значајно ( $p < 0.05$ ) већи број CD23<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> MZ-like Vreg лимфоцита у јетри животиња којима је пре  $\alpha$ -GalCer-а и mMSCs дат CY (Фигура 8Б), међутим, јасно се уочава да овај пораст броја Vreg лимфоцита није ублажио оштећење јетре (Графикон 6, слика 16).

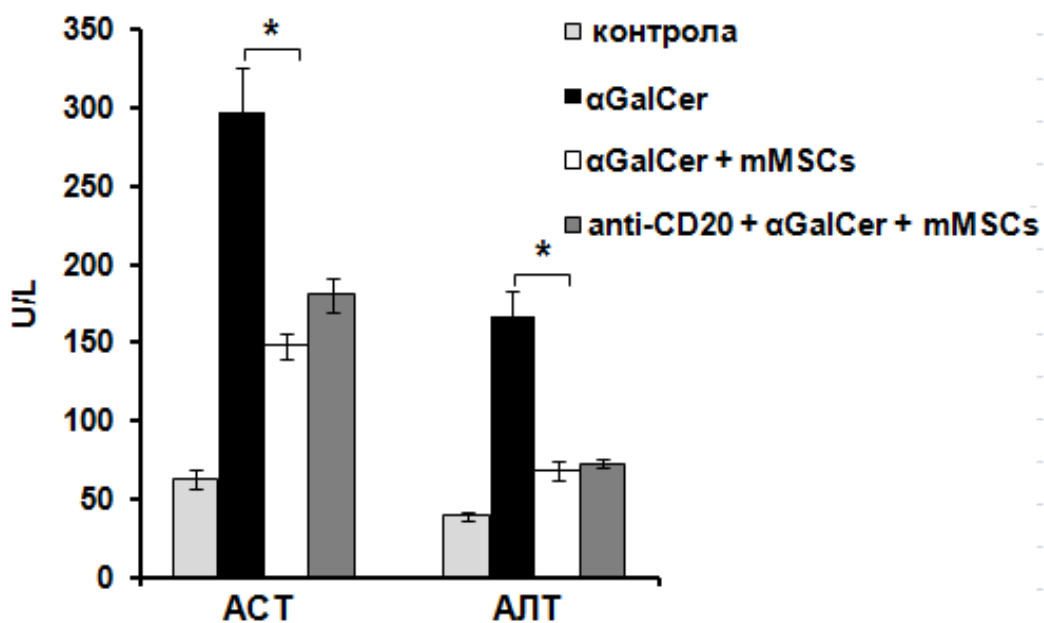


Фигура 8. Примена mMSCs код мишева са хепатитисом без Treg лимфоцита значајно повећава број Vreg лимфоцита у јетри. Мишеви који су пре  $\alpha$ -GalCer-а и mMSCs примили CY, имају већи број CD23<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> MZ-like Vreg лимфоцита који продукују IL-10 и TGF- $\beta$  у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

#### 4.3.10. Недостатак Vreg лимфоцита не утиче на хепатопротективан ефекат mMSCs у акутном хепатитису

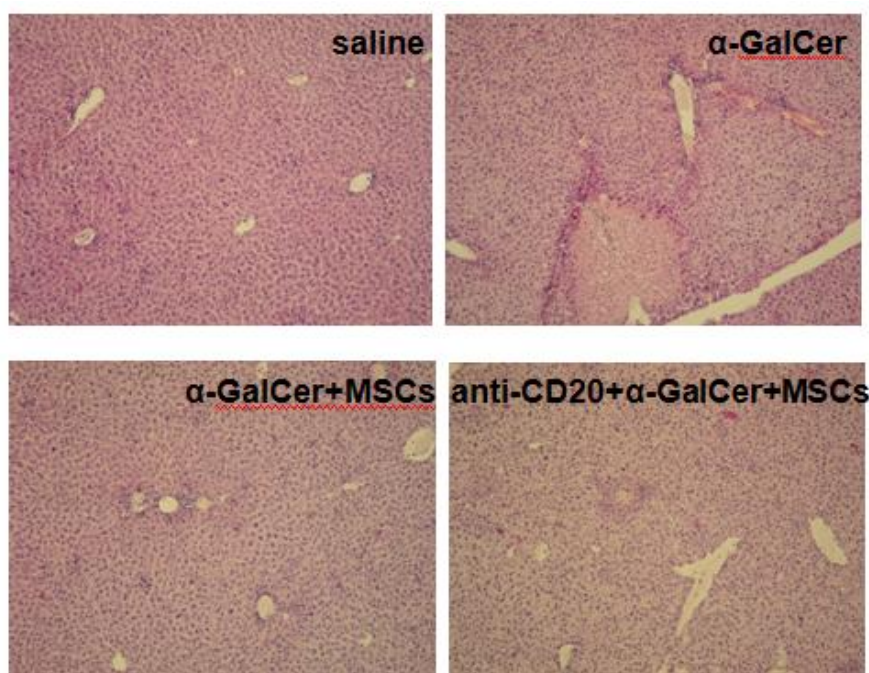
Након испитивања значаја популације Treg лимфоцита, наметнуло се испитивање улоге Vreg лимфоцита у имуносупресивном ефекту mMSCs у хепатитису изазваном  $\alpha$ -GalCer-ом.

Пре индукције хепатитиса и трансплантације mMSCs, експерименталним животињама су Vreg лимфоцити деплетирани применом anti-CD20 антитела. Недостатак ових ћелија није значајно утицао на имуносупресивни ефекат mMSCs у  $\alpha$ -GalCer-ом изазваном оштећењу јетре (Графикон 7). Није било статистички значајне разлике у концентрацији трансаминаза у серуму мишева којима су пре индукције болести и апликације mMSCs деплетирани Vreg лимфоцити у поређењу са животињама које нису примиле anti-CD20 антитело (Графикон 8). Као што се уочава на графикону, у обе експерименталне групе које су примиле матичне ћелије измерена концентрација АСТ и АЛТ је била статистички значајно мања од концентрације трансаминаза у мишева са хепатитисом који нису примили mMSCs (Графикон 8).



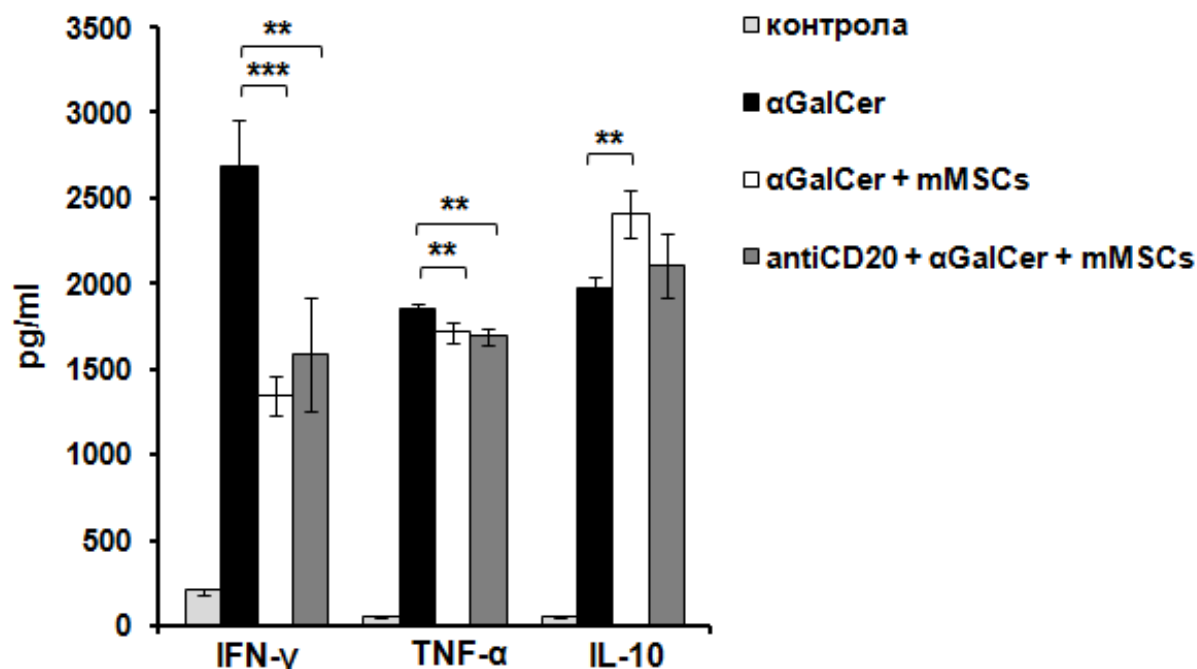
Графикон 8. Концентрација трансаминаза у серуму мишева након примене anti-CD20,  $\alpha$ -GalCer и mMSCs. Нема статистички значајне разлике у концентрацији АСТ и АЛТ у серуму мишева који су интравенски примили anti-CD20 пре  $\alpha$ -GalCer-а и mMSCs, у поређењу са мишевима којима није дато anti-CD20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

Патохистолошком анализом је потврђено да протективни ефекат mMSCs у експерименталном хепатитису не зависи Breg лимфоцита (Слика 17). На препаратима јетри оболелих мишева са/без Breg лимфоцита који су примили mMSCs уочавају се смањена инфилтрација инфламацијским ћелијама као и мања величина поља некрозе у односу на мишеве којима је апликован само  $\alpha$ -GalCer (Слика 17).



Слика 17. Репрезентативни исечци јетре мишева након примене anti-CD20 антитела. Стандарно патохистолошко бојење (H&E), увећање x 100.

Статистички значајно смањење концентрације IFN- $\gamma$  ( $p < 0.01$ ) и TNF- $\alpha$  ( $p < 0.01$ ) је утврђено у серуму мишева којима су пре интравенске примене  $\alpha$ -GalCer и mMSCs деплетирани Breg лимфоцити у поређењу са мишевима којима је дат само  $\alpha$ -GalCer (Графикон 9). Није било статистичке разлике ( $p > 0.05$ ) у концентрацији IL-10 у серуму животиња поменутих експерименталних група. Као што се може видети на графикону, у обе експерименталне групе које су примиле mMSCs, без обзира на деплецију Breg лимфоцита, концентрација проинфламацијских цитокина је била статистички значајно мања од концентрације у оболелих мишева који нису примили mMSCs (Графикон 9).



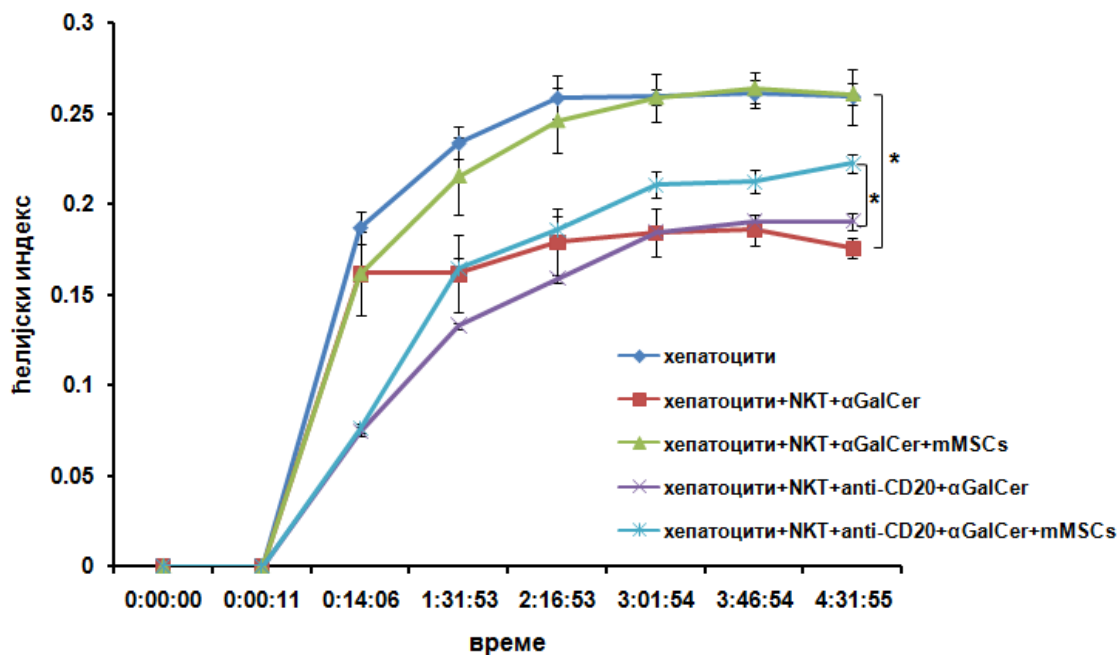
**Графикон 9.** Серумске вредности цитокина након примене mMSCs у мишева без Vreg лимфоцита којима је индукован хепатитис. Концентрација серумског IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  је статистички значајно мања код мишева који су после anti-CD20 антитела интравенски примили  $\alpha$ -GalCer и mMSCs у поређењу са мишевима којима је дат само  $\alpha$ -GalCer. Не постоји статистички значајна разлика у концентрацији серумског IL-10 између експерименталних група. Нема значајне разлике у концентрацији цитокина између мишева са и без Vreg лимфоцита којима су непосредно након изазивања хепатитиса дате mMSCs. Серумска концентрација цитокина је мерена 2 сата након интравенске апликације  $\alpha$ -GalCer-a (50 $\mu$ g/kg TT). Представљени резултати 2 експеримента са најмање 8 мишева по групи (средња вредност +/- SE; \* p<0.05; \*\* p<0.01; \*\*\* p<0.001).

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

Након што је биохемијском и патохистолошком анализом као и мерењем концентрације цитокина у серуму показано да деpleција Vreg лимфоцита не мења значајно имуномодулаторни капацитет mMSCs у акутном оштећењу јетре, испитан је утицај деpleције ових регулаторних ћелија на супресивни ефекат mMSCs на цитотоксичку активност NKT ћелија. Хепатотоксичност NKT ћелија јетре према мишјим хепатоцитима је праћена у реалном времену коришћењем xCELLigence система (Графикон 10). Није било статистички значајне разлике (p>0.05) у убилачком потенцијалу NKT ћелија изолованих из јетри мишева који су примили  $\alpha$ -GalCer и



mMSCs у односу на NKT ћелије животиња којима су пре примене  $\alpha$ -GalCer и mMSCs деплетирани Vreg лимфоцити, што сугерише да ова популација регулаторних лимфоцита не доприноси директно супресивном ефекту mMSCs на NKT ћелије јетре.



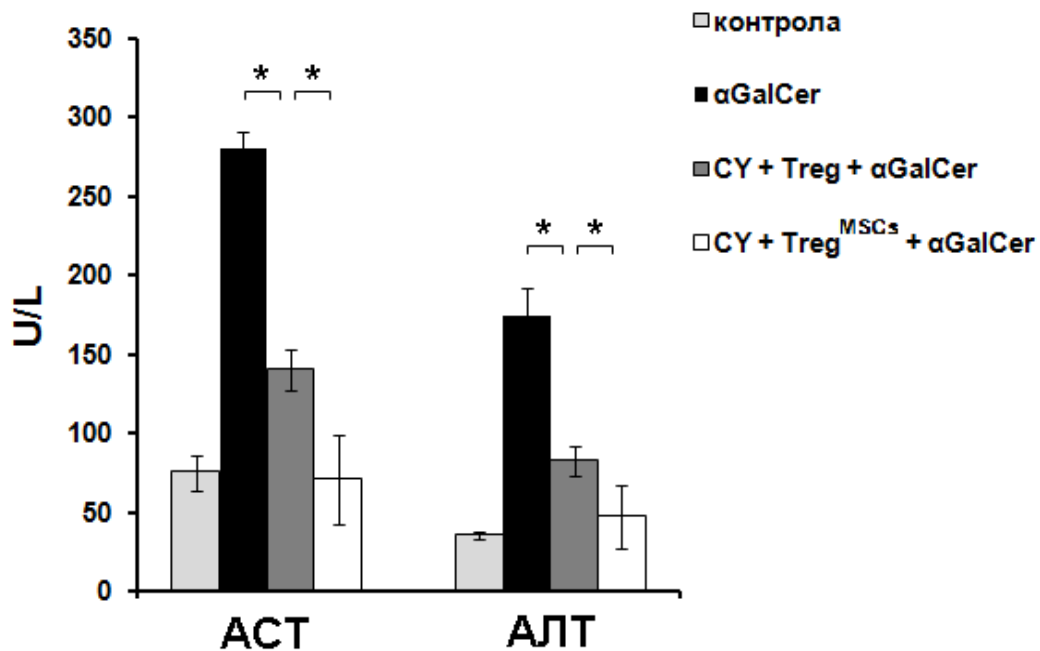
**Графикон 10. Системска примена anti-CD20 антитета не мења имуномодулаторни утицај mMSCs на NKT ћелије јетре.** Цитотоксичка активност NKT ћелија према хепатоцитима испитивана је xCELLigence системом у трајању од 48 сати, однос ефектор: таргет 10:1. Нема статистички значајне разлике у цитотоксичком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

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

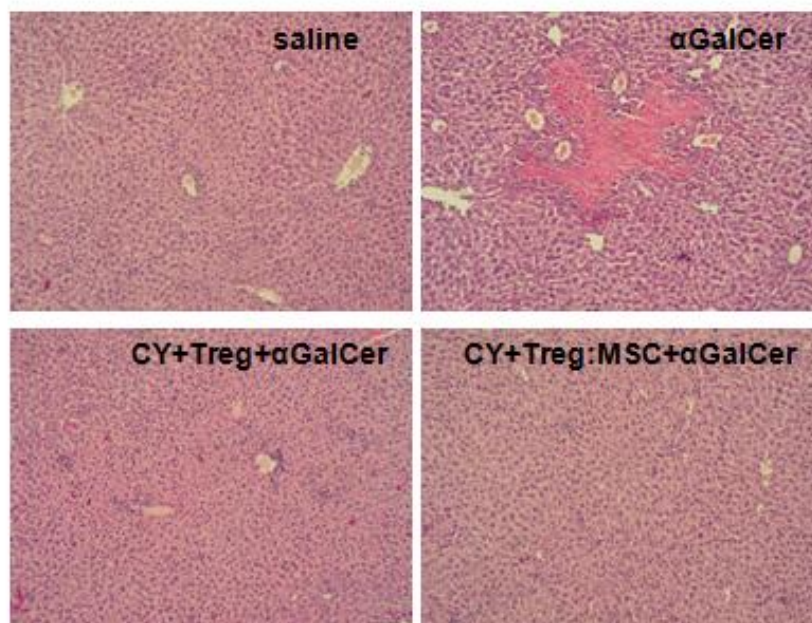
У експерименталној групи којој су након CY и индукције хепатитиса убризгани Treg лимфоцити кокултивисани са mMSC (Treg<sup>mMSCs</sup>), забележени су статистички значајно ( $p < 0.05$ ) смањење серумских трансаминаза и значајно мања некроза и инфилтрација



мононуклеарним ћелијама у јетри, у односу на ове параметре оштећења јетре у мишева којима су убризгани Трег лимфоцити, као и у односу на мишеве којима је апликовани само  $\alpha$ -GalCer (Графикон 11, слика 18). Добијени резултати сугеришу да интеракција Трег лимфоцита са mMSC значајно поспешује анти-инфламаторне ефекте Трег лимфоцита у акутном оштећењу јетре узрокованом активацијом NKT ћелија.



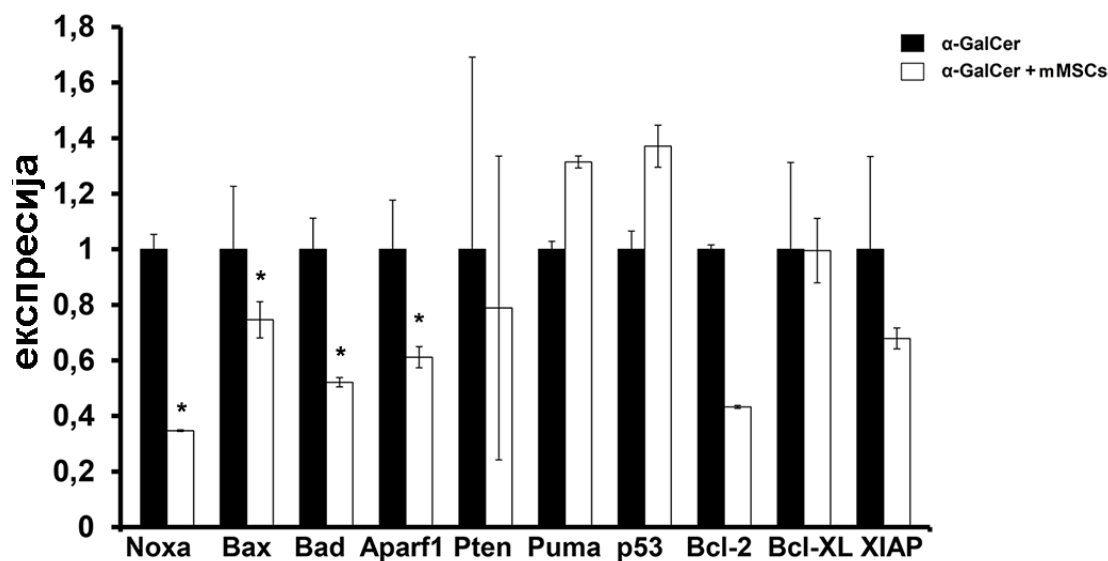
**Графикон 11. Концентрација трансминаза у серуму мишева са хепатитисом након адоптивног трансфера регулаторних лимфоцита.** Концентрација трансминаза (АСТ и АЛТ) је статистички значајно мања у серуму мишева којима је након примене CY (10 mg/kg TT) и  $\alpha$ -GalCer (50 $\mu$ g/kg TT) извршен адоптивни трансфер Трег лимфоцита кокултивисаних са mMSCs (Treg<sup>MSCs</sup>), у поређењу са мишевима којима су апликовани Трег лимфоцити. Представљени резултати 2 експеримента са најмање 10 мишева по групи (средња вредност +/- SE; \* p<0.05).



**Слика 18.** Репрезентативни исечци јетре мишева након примене CY. Стандарно патохистолошко бојење (H&E), увећање x 100.

#### 4.3.12. Примена mMSCs супримира проапоптотске гене

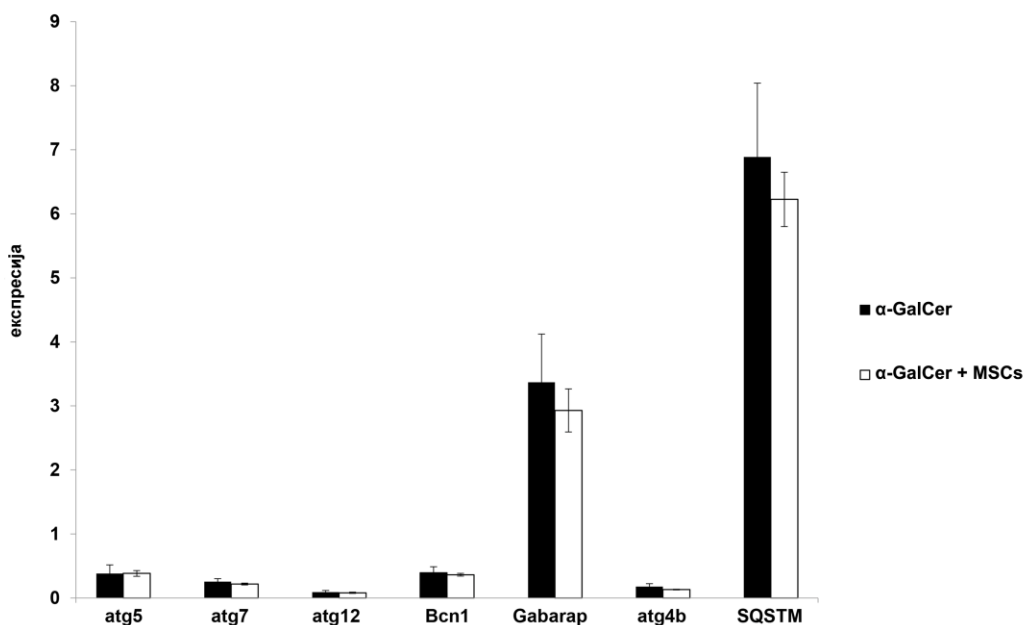
RT-PCR методом детектовано је значајно смањење нивоа iRNK за проапоптотске гене *Bax*, *Bad* и *Apafl* у хомогенатима јетре мишева који су примили  $5 \times 10^5$  mMSCs непосредно након  $\alpha$ -GalCer (50 $\mu$ g/kg TT) у поређењу са мишевима којима је дат само  $\alpha$ -GalCer (Графикон 12). Није било значајне разлике у нивоу iRNK за проапоптотске гене *Pten*, *Puma* и *p53* као и анти-апоптотске *Bcl-2*, *Bcl-xL* и *XIAP* између експерименталних група (Графикон 12). Ови резултати указују да mMSCs ублажавају  $\alpha$ -GalCer хепатитис супресијом цитотоксичке активности NKT ћелија и последичним смањењем апоптотске смрти хепатоцита.



Графикон 12. RT-PCR анализа експресије проапоптотских и анти-апоптотских гена у хомогенатима јетре након примене  $\alpha$ -GalCer и mMSCs. Експресија гена за *Bax*, *Bad* и *Aparf1* је била значајно смањена у хомогенатима јетри мишева који су примили  $5 \times 10^5$  mMSCs непосредно након  $\alpha$ -GalCer у поређењу са мишевима којима је дат само  $\alpha$ -GalCer ( $50\mu\text{g}/\text{kg}$  ТТ). Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност  $\pm$  SE (\* $p < 0.05$ ).

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

Експресија гена чији производи регулишу процес аутофагије (*atg4b*, *atg5*, *atg7*, *atg12* и *Bcn1*) је одређивана у ткиву јетре методом PCR. Разлика у експресији ових гена, није достигла статистичку значајност ( $p > 0.05$ ) у хомогенатима јетри мишева који су примили  $\alpha$ -GalCer ( $50\mu\text{g}/\text{kg}$  ТТ) и mMSCs ( $5 \times 10^5$ ) односно само  $\alpha$ -GalCer (Графикон 13).



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

#### 4.4. mMSCs супримирају NKT ћелије паракриним механизмом

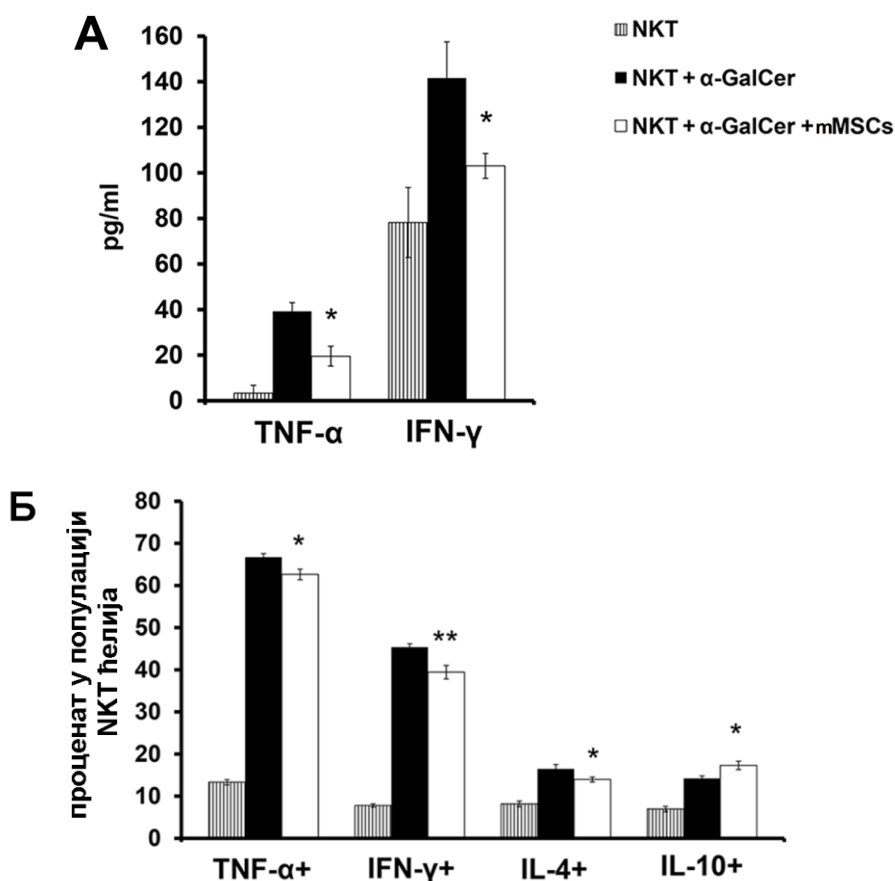
У раније публикованим истраживањима је показано да mMSCs супримирају ћелије имунског систем директним контактом или паракриним механизмом продукцијом солубилних фактора (221).

Након што су код мишева са α-GalCer хепатитисом после интравенске апликације mMSCs уочени смањена цитотоксичка активност и смањена продукција проинфламацијских цитокина у NKT ћелијама, испитано је да ли је за имуномодулаторно дејство mMSCs на NKT ћелије јетре неопходан директан међућелијски контакт.

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

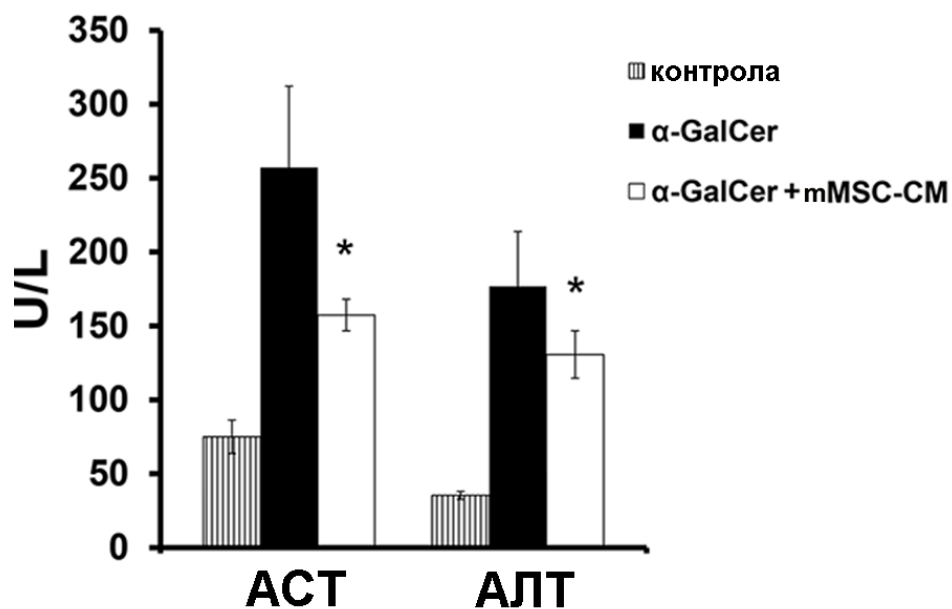
супернатантима *in vitro* активираних NKT ћелија које су биле у *transwell* систему са mMSCs у односу на концентрацију цитокина у супернатантима *in vitro* активираних NKT ћелија које су култивисане саме (Фигура 9А).

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



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

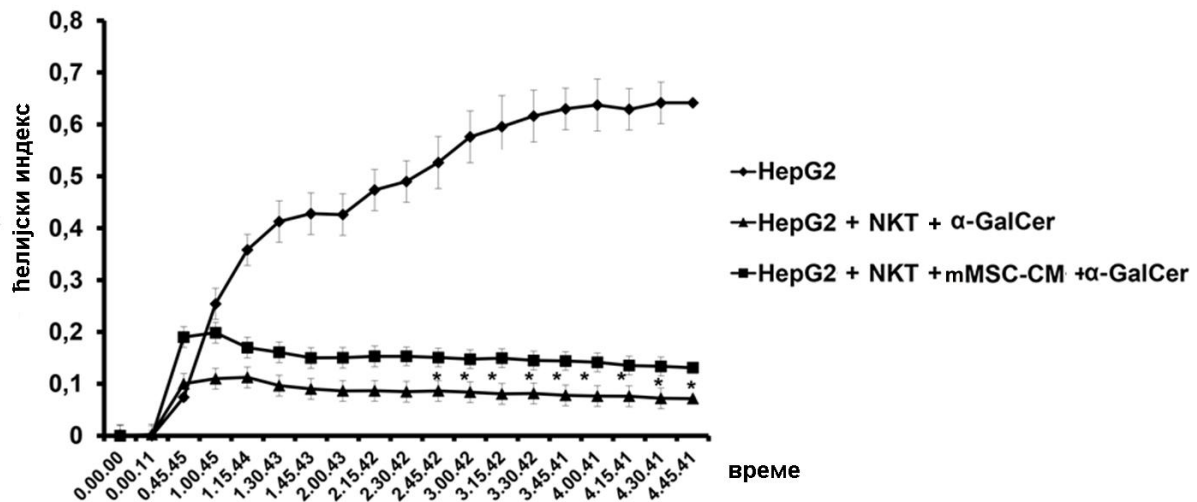
У циљу додатне потврде налаза да за имуносупресивни ефекат mMSCs на NKT ћелије јетре није неходан директан међућелијски контакт, испитано је да ли примена mMSC-СМ може да смањи оштећење хепатоцита у  $\alpha$ -GalCer-ом индукованом хепатитису. Концентрација трансаминаза (АСТ и АЛТ) у серуму мишева експерименталних група, мерена 16 сати након третмана, је показала да интравенска примена 200 $\mu$ l mMSC-СМ редукује хепатитис изазван  $\alpha$ -GalCer-ом (50 $\mu$ g/kg ТТ) (Графикон 14). Као што је приказано на графикону 15, концентрација АСТ и АЛТ је статистички значајно ( $p < 0.05$ ) мања у серуму мишева који су непосредно након апликовања  $\alpha$ -GalCer-а примили mMSC-СМ, у поређењу са мишевима којима је интравенски дат само  $\alpha$ -GalCer.



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

Обзиром да је системска администрација mMSC-СМ значајно смањила концентрације трансаминаза у серуму, у даљем току истраживања испитан је имуномодулаторни ефекат mMSC-СМ на цитотоксичку активност NKT ћелија јетре мишева оболелих од хепатитиса. Коришћењем xCELLigence система испитана је цитотоксичност NKT ћелија, изолованих из јетри животиња којима су апликовани  $\alpha$ -GalCer, односно  $\alpha$ -GalCer и mMSC-СМ (ефекторске ћелије), у 48-часовној култури са ћелијама

хепатоцелуларног карцинома (таргет ћелије). На графикону 15 се јасно уочава да NKT ћелије оболелих мишева који су примили 200 $\mu$ l mMSC-CM показују значајно ( $p < 0.05$ ) мању цитотоксичност у поређењу са NKT ћелијама мишева којима је апликован само  $\alpha$ -GalCer.

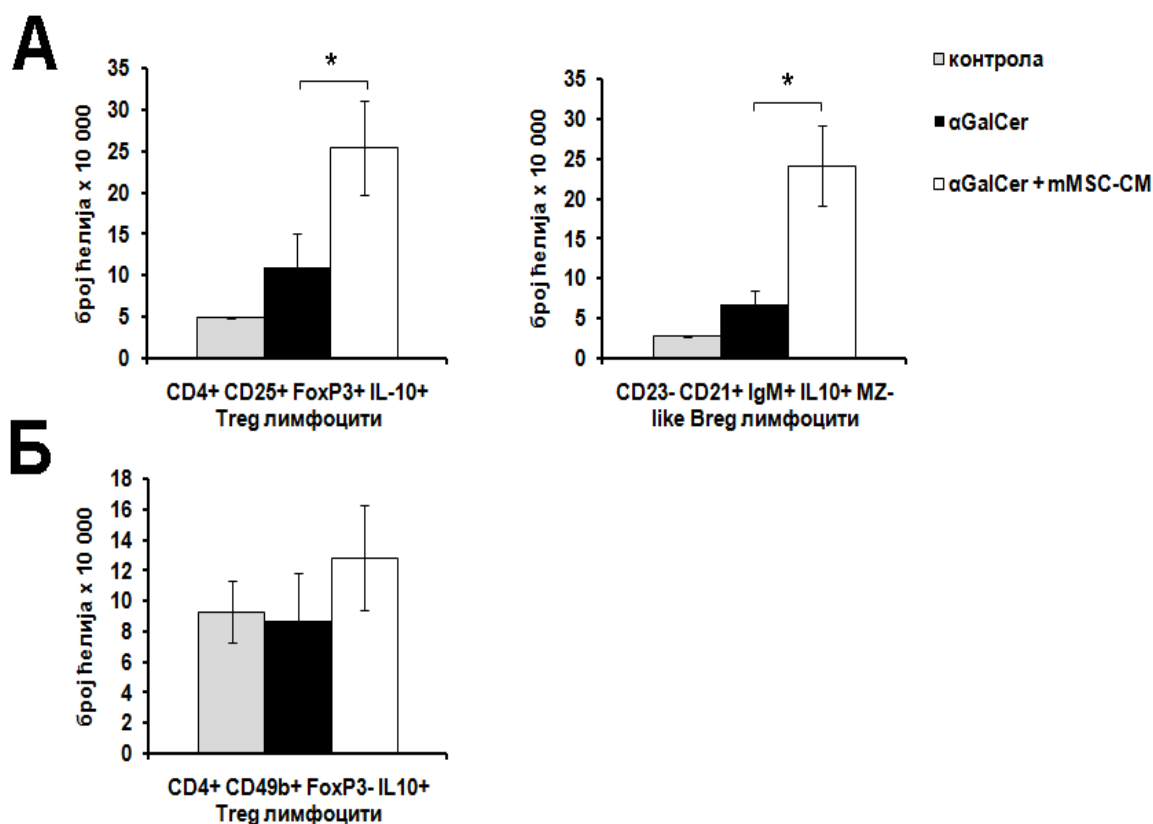


**Графикон 15.** Интравенска апликација mMSC-CM смањује цитотоксичност NKT ћелија јетре према HepG2 туморским ћелијама. Цитотоксичка активност NKT ћелија према HepG2 таргет ћелијама испитивана је xCELLigence системом у трајању од 48 сати, однос ефектор: таргет 10:1. Резултати су представљени кроз ћелијски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

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

Смањено оштећење јетре мишева који су након  $\alpha$ -GalCer-а примили mMSC-CM повезано је са статистички значајно ( $p < 0.05$ ) већим бројем CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg и CD23<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> MZ-like Breg лимфоцита у јетри, у поређењу са бројем ових популација регулаторних ћелија у мишева којима није апликован mMSC-CM (Фигура 10А). Разлика у броју протективних CD4<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>FoxP3<sup>-</sup> Treg лимфоцита који продукују IL-10 није достигла статистичку значајност између испитиваних група ( $p > 0.05$ ) (Фигура 10Б). Добијени резултати указују да mMSCs помоћу солубилних

фактора које секретују привлаче регулаторне ћелије у јетру животиња којима је изазвано акутно оштећење јетре.



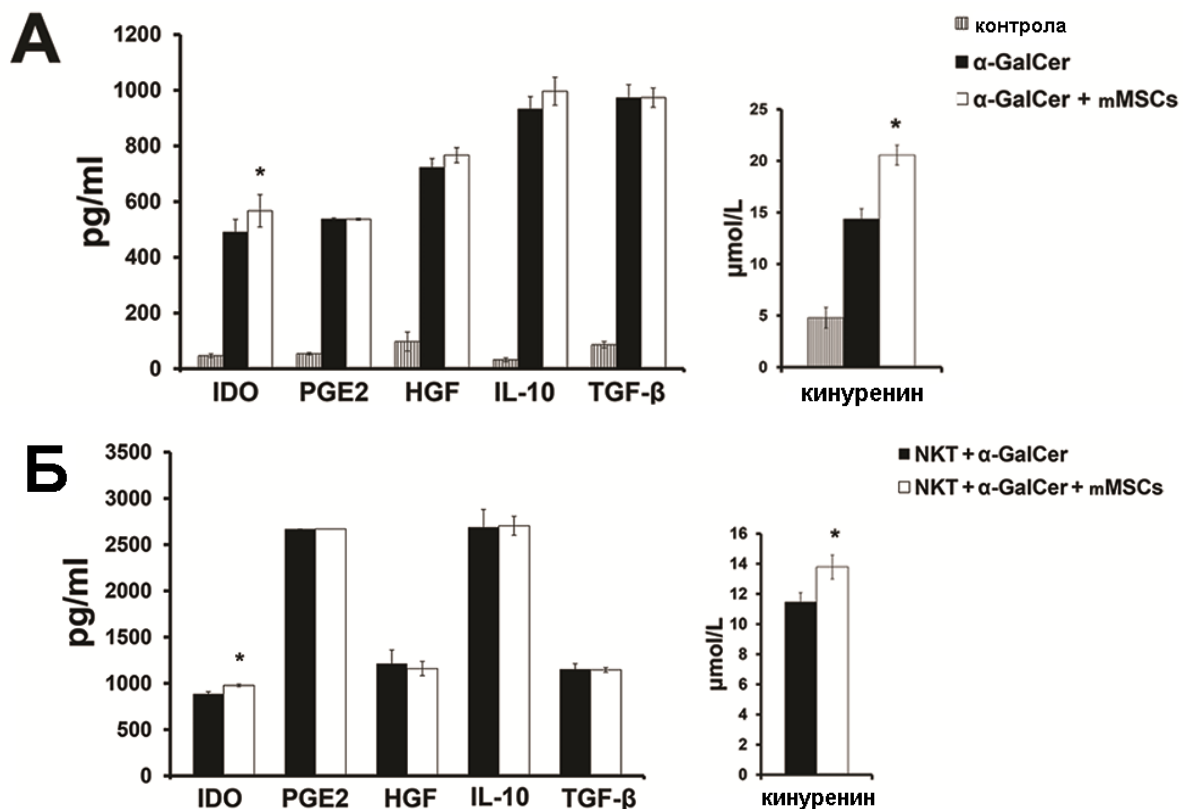
**Фигура 10. mMSC-CM повећава број регулаторних лимфоцита у јетри мишева са индукованим хепатитисом. (А)** Статистички значајно већи број CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> Treg и CD23<sup>-</sup>CD21<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup> MZ-like Breg лимфоцита у јетри мишева којима су дати  $\alpha$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

#### 4.5. mMSCs супримирају NKT ћелије активношћу ензима IDO и iNOS

Познато је да су IDO, PGE<sub>2</sub>, HGF, IL-10 и TGF- $\beta$  најважнији медијатори којима mMSCs супримирају ћелије имунског система и следствено смањују инфламацију. У циљу даљег испитивања паракриног механизма имуносупресивног ефекта mMSCs на NKT ћелије јетре, спектрофотометријском методом су измерене концентрације поменутих солубилних фактора у серуму мишева третираних  $\alpha$ -GalCer-ом односно  $\alpha$ -GalCer-ом и mMSCs, као и у супернатантима NKT ћелија јетре стимулираних  $\alpha$ -GalCer-ом култивисаних са или без mMSCs. Разлике у концентрацији PGE<sub>2</sub>, HGF, IL-10 и TGF- $\beta$  није било између група (Фигура 11А). Међутим, показано је да је концентрација IDO и



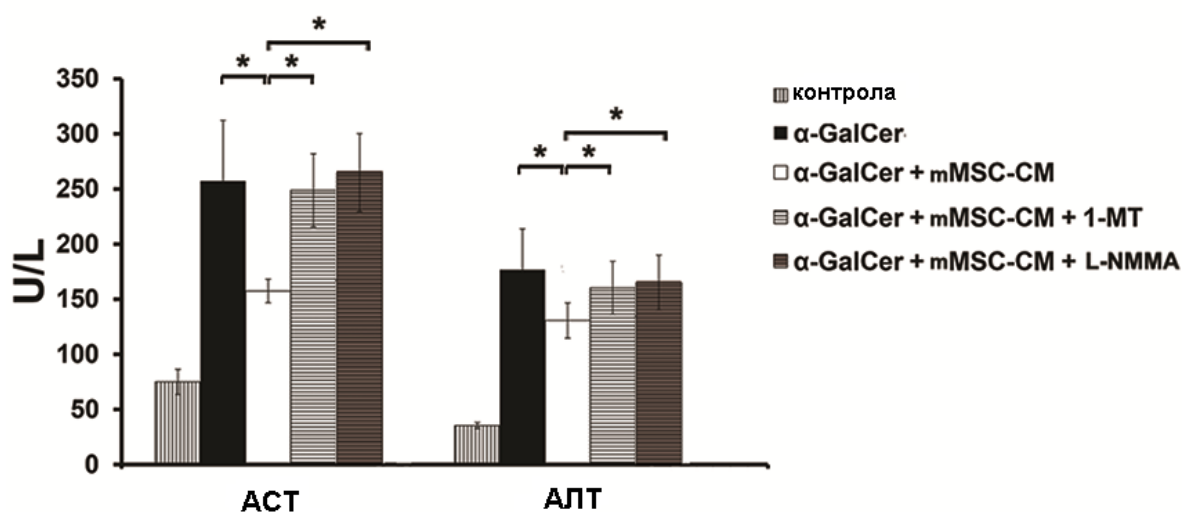
кинурина, продукта ензимске активности IDO, статистички значајно ( $p < 0.05$ ) већа у серуму мишева са  $\alpha$ -GalCer хепатитисом којима су апликоване mMSCs ( $5 \times 10^5$ ) у поређењу са мишевима са хепатитисом који нису примили mMSCs (Фигура 11А). Добијени налаз је верификован мерењем солубилних фактора које продукују MSCs у супернатантима културе. Статистички значајно ( $p < 0.05$ ) већа концентрација IDO и кинуренина је измерена у супернатантима  $\alpha$ -GalCer-ом стимулираних NKT ћелија кокултивисаних са mMSCs у *transwell* систему, док није било значајне разлике ( $p > 0.05$ ) у концентрацији осталих медијатора (Фигура 11Б). Добијени резултат је потврдио важну улогу IDO-а у ефикасној супресији ефекторских функција NKT ћелија.



**Фигура 11.** mMSCs супримирају ефекторске функције NKT ћелија каталитичком активношћу ензима IDO. (А) Концентрација IDO и кинуренина у серуму мишева који су после  $\alpha$ -GalCer-а примили mMSCs је статистички значајно већа у поређењу са концентрацијом у мишева којима је дат само  $\alpha$ -GalCer. (Б) Статистички значајно већа концентрација IDO и кинуренина је у супернатантима *in vitro* активираних NKT ћелија јетре кокултивисаних у *transwell*-у са mMSCs. Нема значајне разлике у концентрацији PGE<sub>2</sub>, HGF, IL-10 и TGF- $\beta$  између група. (средња вредност +/- SE; \*  $p < 0.05$ ).

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

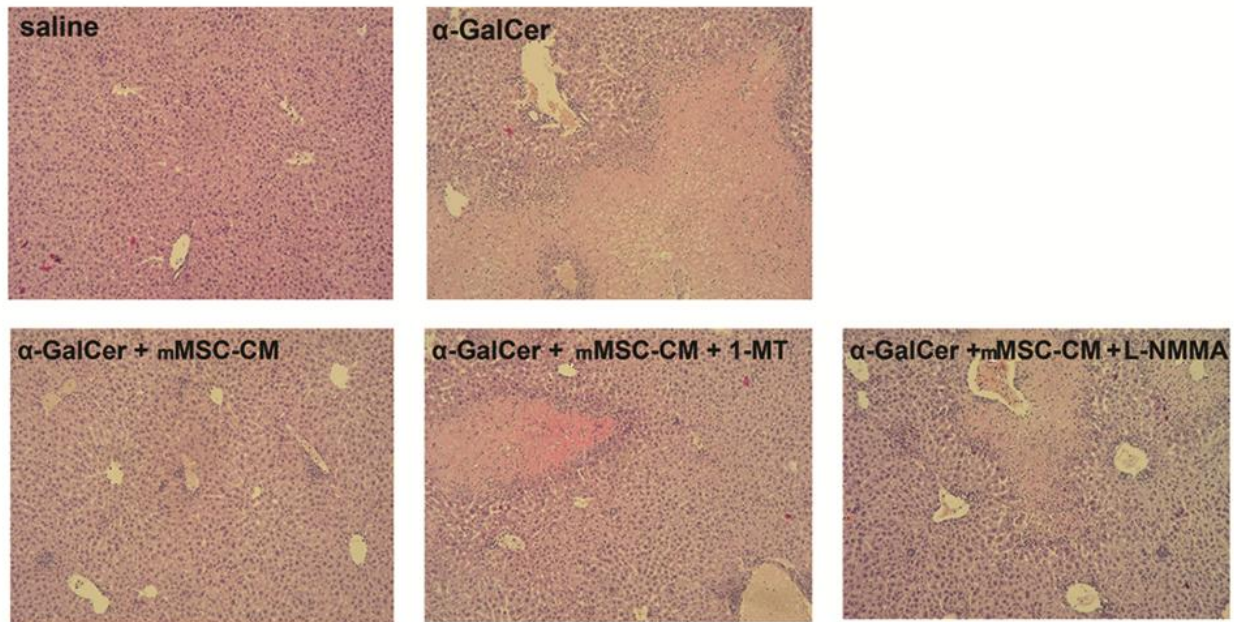
функција NKT ћелија јетре, коришћени фармаколошки инхибитори поменутих ензима. Мишевима је непосредно након индуковања хепатитиса  $\alpha$ -GalCer-ом (50 $\mu$ g/kg TT), апликован mMSC-CM (200 $\mu$ l) у који је претходно растворен 1-MT (1mM), фармаколошки инхибитор IDO, односно L-NMMA (1mM), инхибитор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



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

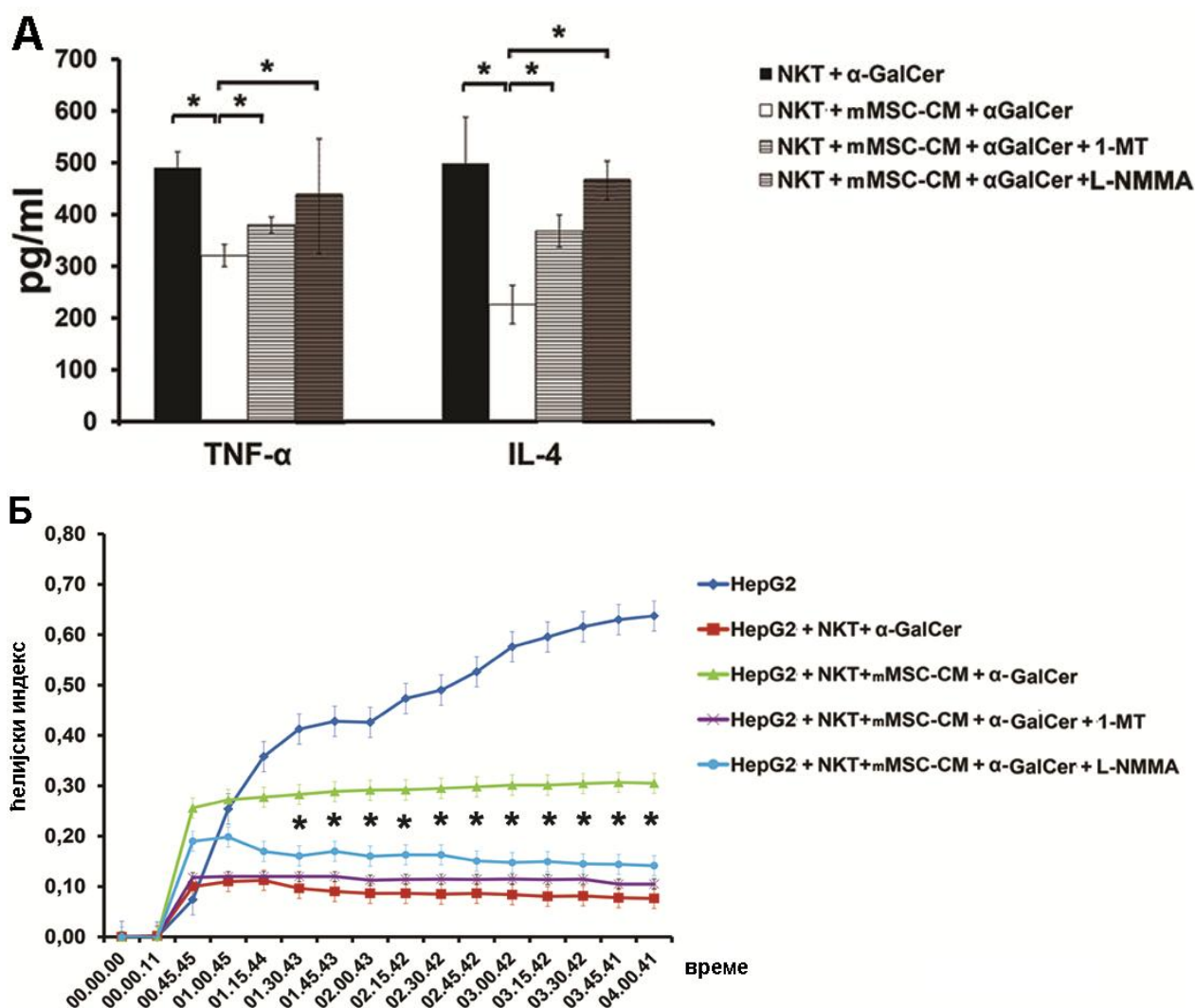
Патохистолошка анализа ткива јетре експерименталних животиња је потврдила резултате биохемијских испитивања (Слика 19). У јетри мишева који су након интравенске апликације  $\alpha$ -GalCer-а примили mMSC-CM у којем су фармаколошки блокирани ензими IDO и iNOS уочава се масовна, дисеминована некроза хепатоцита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

јетре мишева који су примили mMSC-CM после  $\alpha$ -GalCer-a. Као што се може видети на слици 6, јетре мишева обе контролне групе су биле непромењене грађе.



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

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

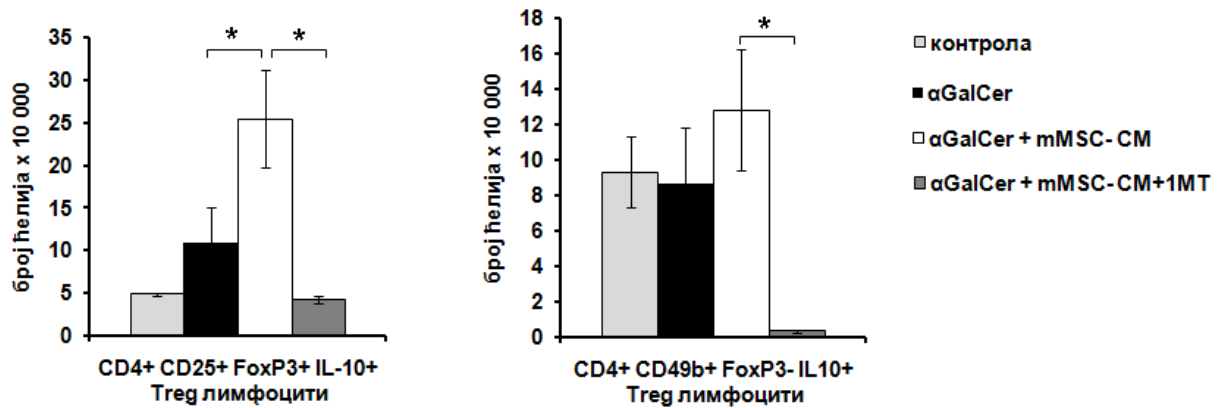


**Фигура 12.** Имуносупресивни утицај mMSCs на ефекторске функције NKT ћелија зависи од IDO и iNOS. *In vitro* стимулисане NKT ћелије ( $\alpha$ -GalCer; 100ng/ml) су култивисане у трајању од 48 сати у mMSC-CM, mMSC-CM + 1-MT односно mMSC-CM + L-NMMA. Присуство 1-MT (1 mM), односно L-NMMA (1 mM) у mMSC-CM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

#### 4.5.1. Ефекат mMSC-CM на експанзију Treg лимфоцита су губи у присуству 1-метил триптофана

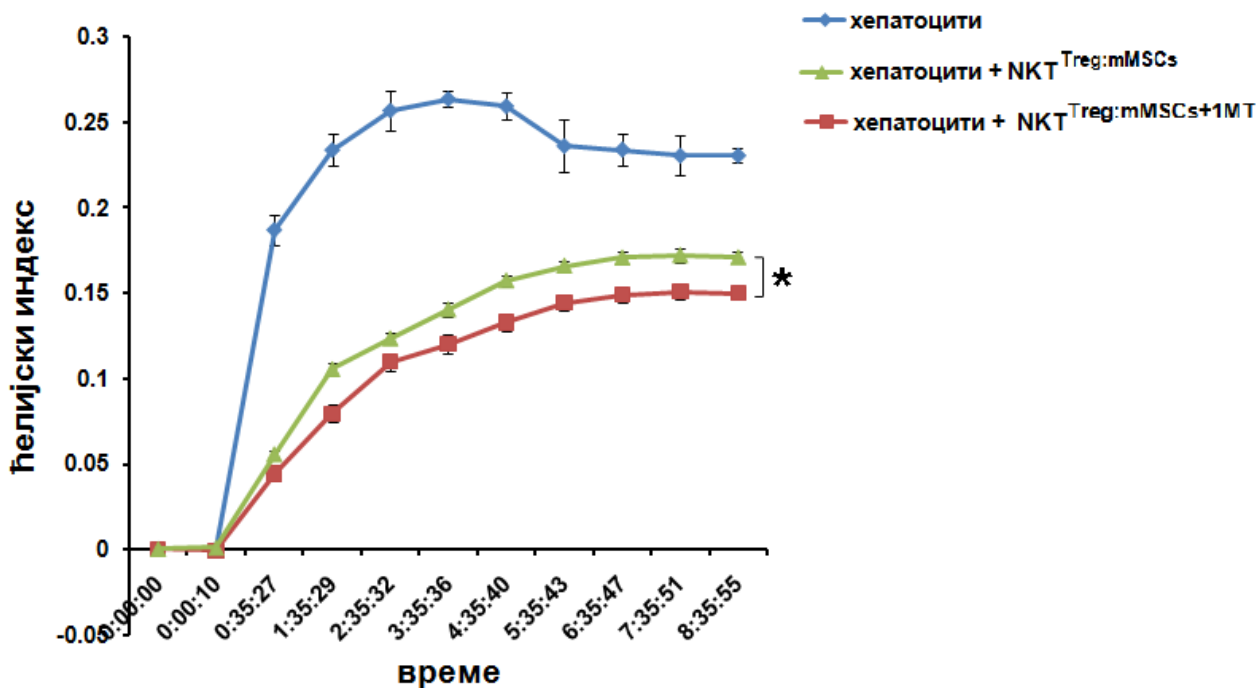
Након што је показано да mMSCs супримирају ефекторске функције NKT ћелија каталитичком активношћу ензима IDO, а обзиром да је добро познато да IDO промовише настанак Treg лимфоцита *in vitro* и *in vivo* (183), испитано је какав је ефекат овог ензима пореклом из mMSCs на накупљање регулаторних ћелија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

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



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

У циљу бољег разумевања интеракције Treg лимфоцита и mMSCs и имунорегулаторног ефекта Treg<sup>mMSCs</sup> у NKT-посредованом хепатитису, испитан је цитотоксички потенцијал NKT ћелија након 48 сати директне кокултивације са Treg лимфоцитима који су претходно били у *transwell*-у са mMSCs са или без присуства 1-MT. Цитотоксичност NKT ћелија јетре као ефекторских ћелија је испитана према мишјим хепатоцитима, у односу ефектор: таргет 10:1, коришћењем xCELLigence система (Графикон 18). NKT ћелије које у биле у кокултури су Treg<sup>mMSCs</sup> показују значајно ( $p < 0.05$ ) мању цитотоксичку активност у поређењу са NKT ћелијама које су биле у кокултури са Treg<sup>mMSCs+1MT</sup>.



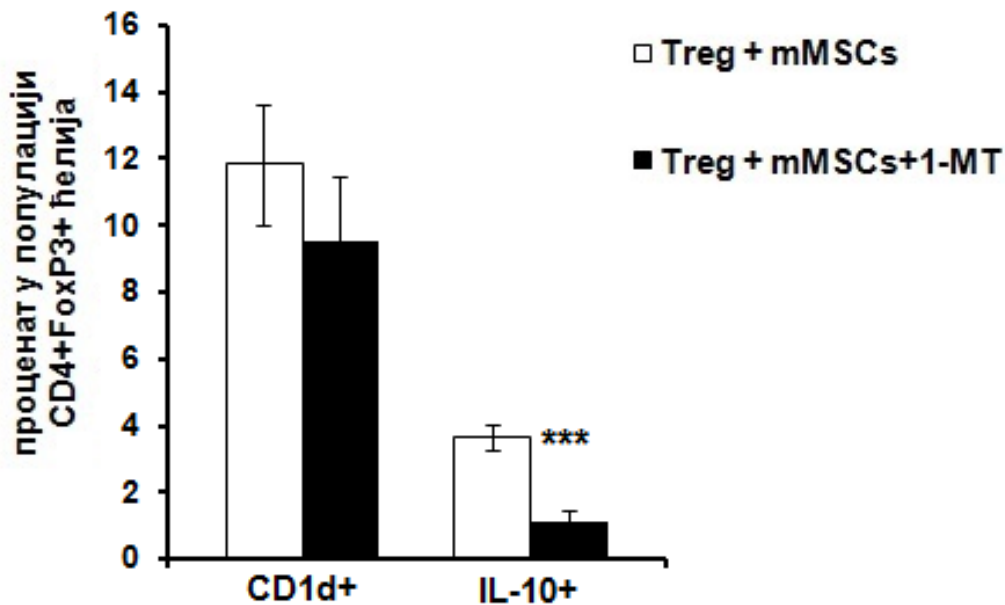
Графикон 18. Присуство 1-МТ у култури Трег лимфоцита и mMSCs смањује капацитет Трег лимфоцита да супримирају хепатотоксичност NKT ћелија. NKT ћелије које су култивисане са Трег<sup>mMSCs</sup> показују значајно ( $p < 0.05$ ) мању цитотоксичку активност према хепатоцитима у поређењу са NKT ћелијама које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

Претходне студије су показале да у  $\alpha$ -GalCer-ом изазваном хепатитису, Трег лимфоцити директним контактом са NKT ћелијама јетре, посредством CD1d молекула који исказују својој на мембрани, као и продукцијом имуносупресивних цитокина значајно смањују пролиферацију, индукују апоптозу и супримирају продукцију цитокина у NKT ћелијама (315). Због тога је, након што је забележено да је IDO медијатор којим mMSCs повећавају број протективних Трег лимфоцита у јетри мишева са  $\alpha$ -GalCer хепатитисом, у даљем току истраживања испитан утицај IDO-а пореклом из mMSCs на експресију молекула којим Трег лимфоцити остварују супресивне ефекте на NKT ћелије у овом моделу хепатитиса.

У оквиру изоловане популације Трег лимфоцита, анализирана је експресија CD1d молекула и IL-10 након 48 сати кокултивације са mMSCs у *transwell* систему. На графикону 17 се уочава да Трег лимфоцити који су били у *transwell*-у са mMSCs у присуству фармаколошког инхибитора IDO-а статистички значајно ( $p < 0.001$ ) мање



продукују имуносупресивни IL-10 у поређењу са Treg лимфоцитима који су кокултивисани са mMSCs без инхибитора. Истовремено, процентуална заступљеност CD1d молекула на Treg лимфоцитима је била смањена при додатку инхибитора IDO-а у културу, међутим ова разлика није достигла статистичку значајност ( $p > 0.05$ ).



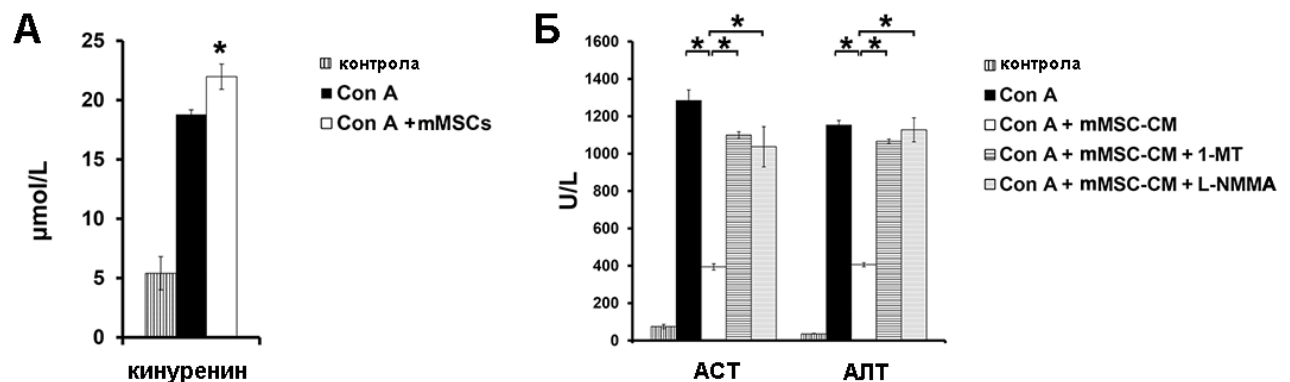
**Графикон 17.** Процентуална заступљеност CD1d+ и IL-10+ Treg лимфоцита након култивације у mMSC-CM са или без 1-MT. Treg лимфоцити су култивисани у трајању од 48 сати у mMSC-CM односно mMSC-CM + 1-MT. Присуство 1-MT (1 mM) у mMSC-CM смањило је процентуалну заступљеност CD1d+ и IL-10+ Treg лимфоцита у култури. Приказане вредности су средње вредности +/- SE; \*\*\*  $p < 0.001$ .

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

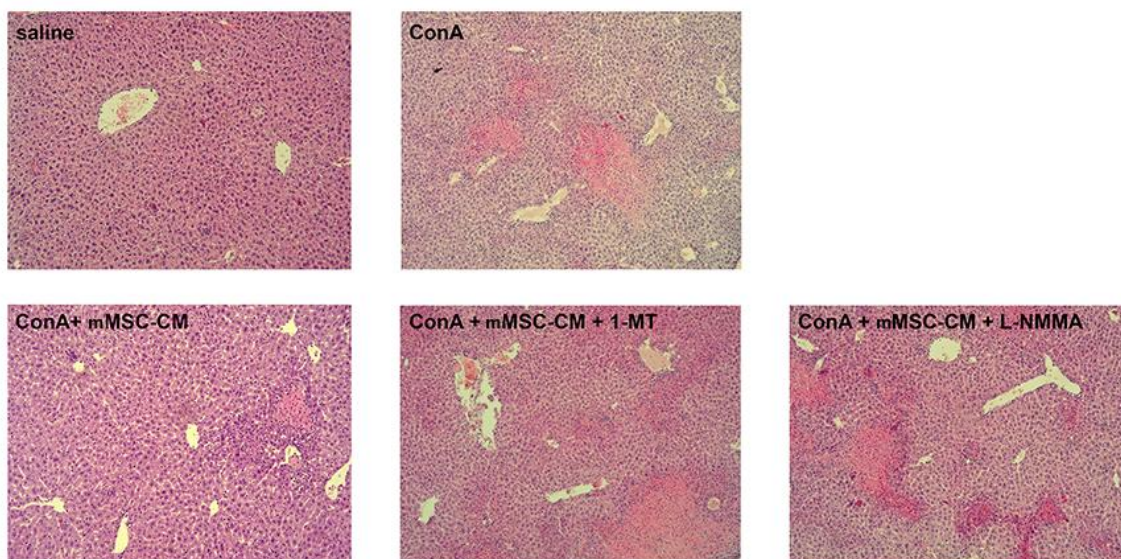
Како је биохемијским тестовима, патохистолошком анализом и испитивањем ефекторских функција NKT ћелија показано да примена mMSC-CM у коме су фармаколошки инактивирани ензими IDO и iNOS не ублажава експериментални хепатитис изазван  $\alpha$ -GalCer-ом, испитано је како изостанак активности поменутих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

Претходно је спектрофотометријском методом показано да интравенска примена  $5 \times 10^5$  mMSCs узрокује статистички значајан ( $p < 0.05$ ) пораст концентрације кинуренина у серуму експерименталних животиња којима је акутно оштећење јетре изазвано

апликацијом Con A (12mg/kg TT) (Фигура 14А). Уочени су значајно ( $p < 0.05$ ) већа концентрација трансаминаза (АСТ и АЛТ) (Фигура 14Б), већа некроза хепатоцита као и већа инфилтрација мононуклеарних ћелија у јетри (Слика 20) C57BL/6 мишева који су примили mMSC-CM+1-MT, односно mMSC-CM+ L-NMMA у поређењу са мишевима којима је након Con A апликован mMSC-CM.



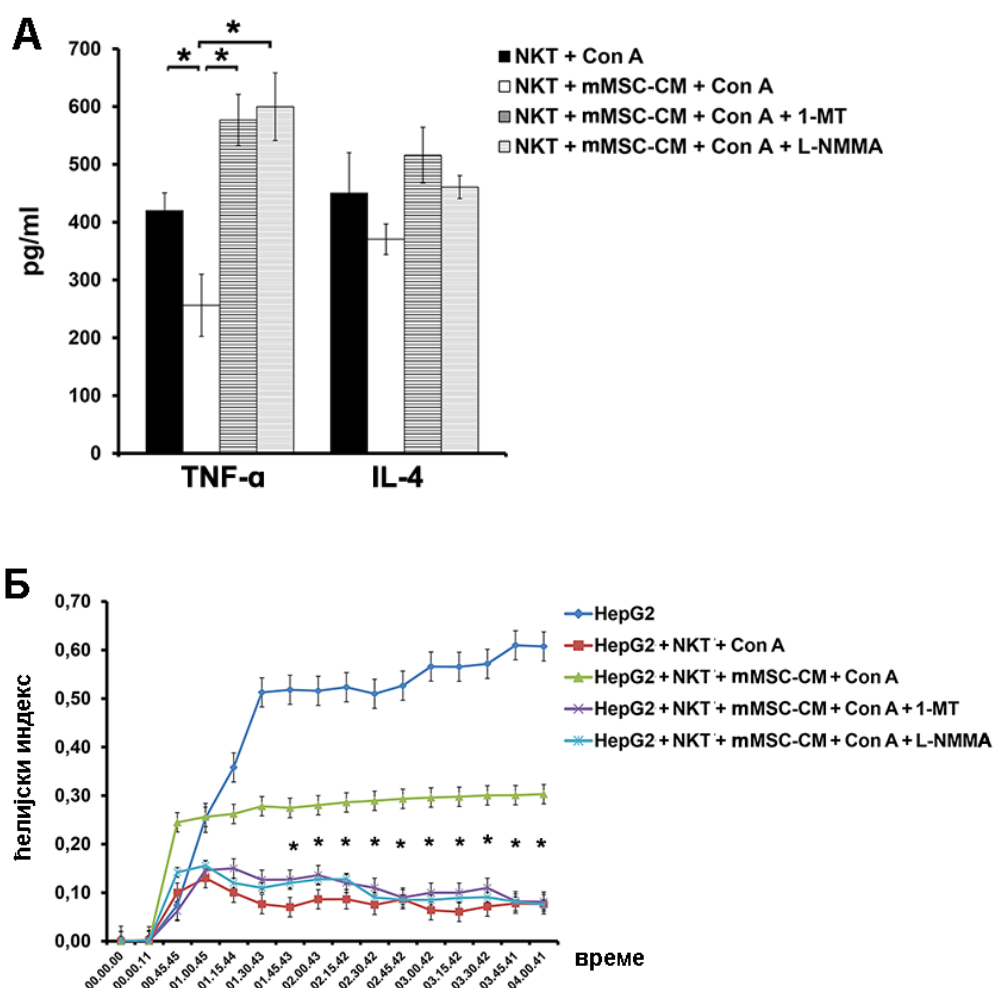
**Фигура 14. mMSCs паракриним механизмом редукују акутно оштећење јетре мишева изазвано Con A. (А)** Концентрација кинуренина у серуму мишева који су после Con A (12 mg/kg TT) интравенски примили  $5 \times 10^5$  mMSCs је статистички значајно већа у поређењу са концентрацијом у мишева којима је дат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



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



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

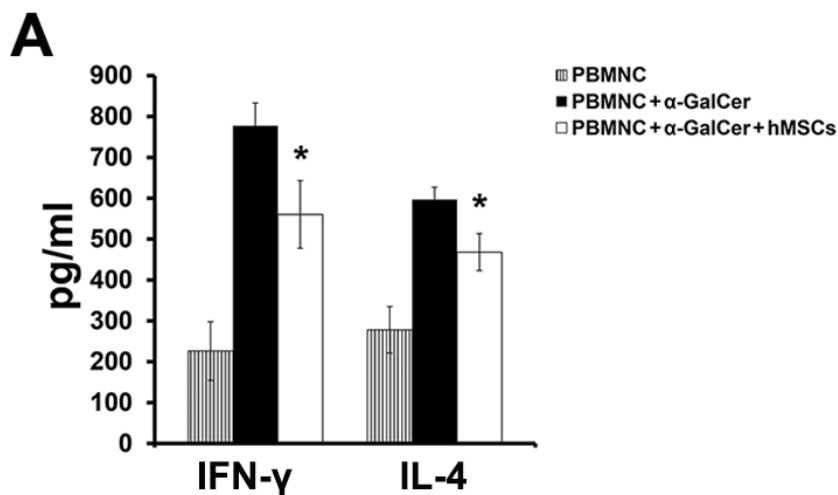


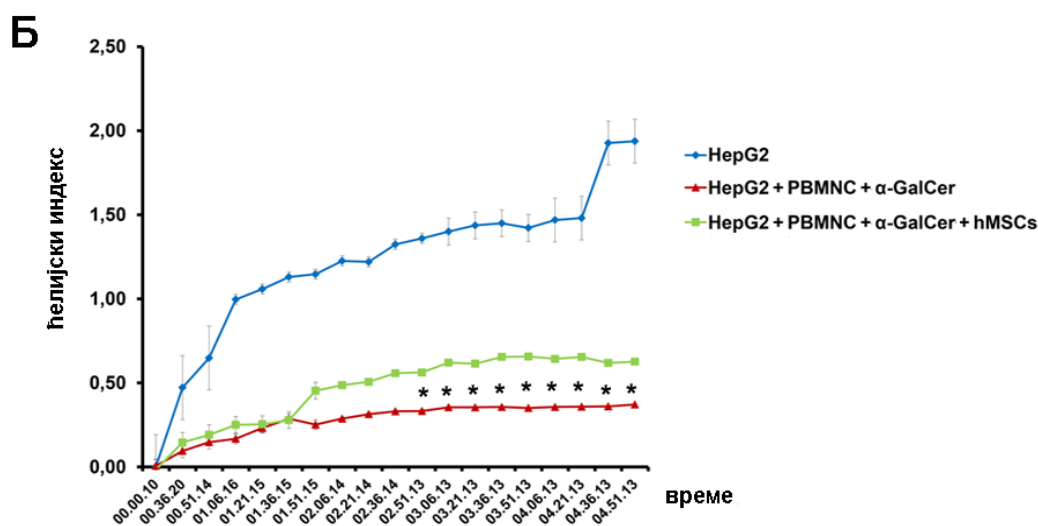
**Фигура 15. Имуносупресивни утицај mMSCs на ефекторске функције NKT ћелија зависи од IDO и iNOS.** *In vitro* стимулисане NKT ћелије су култивисане у трајању од 48 сати у mMSC-CM, mMSC-CM + 1-MT односно mMSC-CM + L-NMMA. Присуство 1-MT (1 mM), односно L-NMMA (1 mM) у mMSC-CM је укинуло супресивни утицај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

#### 4.7. Продукцијом IDO и iNOS hMSCs модулирају ефекторске функције $\alpha$ -GalCer-ом стимулираних хуманих PBMNCs

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

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

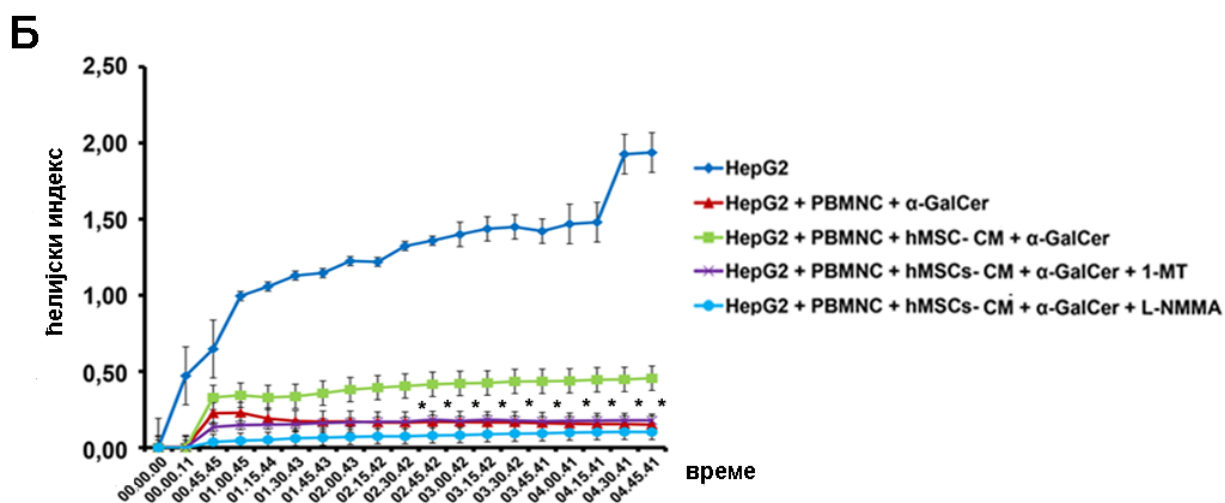
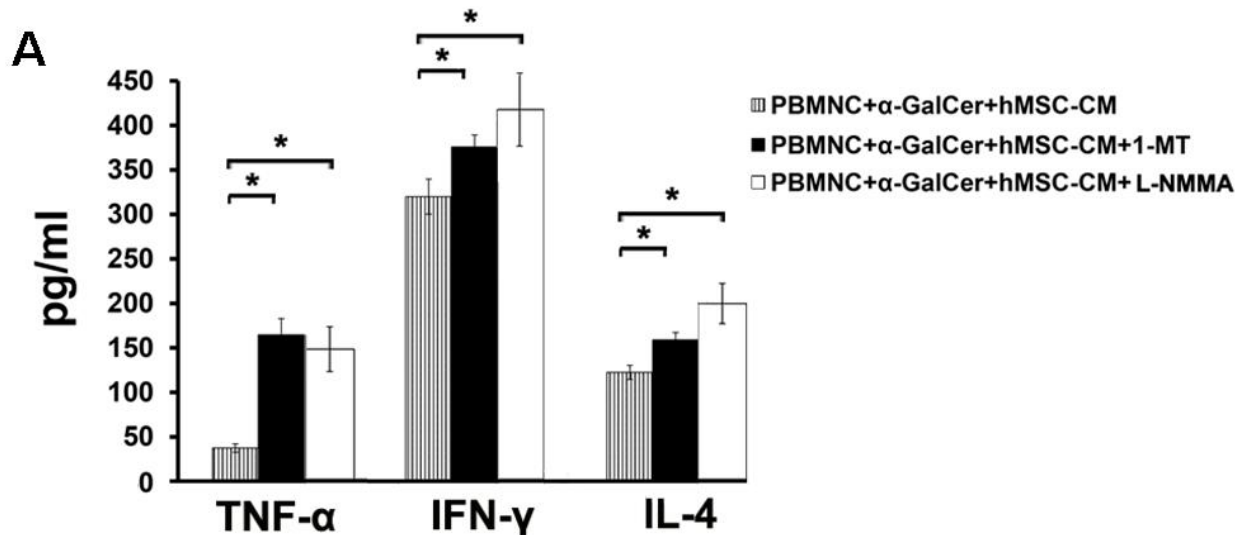




**Фигура 16.** hMSCs супримирају ефекторске функције хуманих NKT ћелија паракриним механизмом. (А) Смањена концентрација IFN- $\gamma$  и IL-4 у супернатантима *in vitro*  $\alpha$ -GalCer-ом стимулираних хуманих PBMNC кокултивисаних у *transwell* систему са hMSCs, у трајању од 48 сати (однос 10:1).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

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

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



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

## 5. ДИСКУСИЈА

Основни закључак спроведеног истраживања указује да примена MSCs смањује инфламацију у моделу акутног оштећења јетре узрокованог активацијом NKT ћелија.

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

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

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

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

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

перфорин/гранзим система и продукција проинфламацијских цитокина IFN- $\gamma$ , IL-4 и TNF- $\alpha$  (74).

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

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

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

У складу са овим резултатима су подаци из новијих студија које су документовале да MSCs изоловане из масног ткива снижавају вредности трансминаза у BALB/c односно C57BL/6 мишева којима је хепатитис индукован Con A (291, 298). За разлику од Con A који је поликлонални активатор лимфоцита,  $\alpha$ -GalCer специфично активира NKT ћелија, стога резултати овде приказаног истраживања, недвосмислено указују да mMSCs имају протективни ефекат у хепатитису који је узрокован активацијом NKT ћелија.

## **5.2. Примена MSCs смањује инфламацију у јетри**

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

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

*Higashimoto* и сарадници су недавно показали да терапијски ефекти MSCs пореклом из масног ткива у Con A хепатитису настају услед супресије ћелија мијелоидне лозе и CD4<sup>+</sup>T лимфоцита (298). Резултати поменуте групе аутора су указали да MSCs смањују број CD11b<sup>+</sup>, Gr-1<sup>+</sup> и F4/80<sup>+</sup> ћелија у јетри експерименталних мишева, као и експресију TNF- $\alpha$ , IL-10 и CXCL10 у CD4<sup>+</sup> T лимфоцитима и CD11b<sup>+</sup> ћелијама (298).

Стога је у даљем току овде приказаног истраживања било неопходно испитати да ли се у основи имунорегулаторног ефекта MSCs на NKT ћелије налази директна међућелијска интеракција или индиректни ефекат MSCs посредован ћелијама које презентују антигене у јетри. Зато је истраживање настављено на другом моделу фулминантног хепатитиса, који је мишевима индукован  $\alpha$ -GalCer-ом, специфичним и снажним активатором NKT ћелија. Примена mMSCs статистички значајно је смањила инфлукс TNF $\alpha$ <sup>+</sup>, IFN $\gamma$ <sup>+</sup> и IL-4<sup>+</sup> NKT ћелија у јетру и следствено томе значајно смањила оштећење ткива јетре изазвано  $\alpha$ -GalCer-ом (Фигура 4, слика 15). Уз то, овде приказани резултати су показали да mMSCs нису утицале на продукцију цитокина, поларизацију дендритских ћелија нити на способност ових ћелија да презентују антигене у јетри мишева којима је индукован хепатитис (Фигура 5).

На основу ових резултата, закључено је да протективни ефекат mMSCs у акутном оштећењу јетре узрокованом активацијом NKT ћелија није посредован ћелијама које

презентују антигене већ се заснива на директном имуносупресивном ефекту на NKT ћелије.

## 5.2. Примена mMSCs смањује апоптозу у јетри

$\alpha$ -GalCer повећава експресију FasL и TRAIL молекула на NKT ћелијама, рецептора одговорних за индукцију апоптозе хепатоцита и цитотоксичност, доприноси оштећењу јетре (307). У акутном оштећењу јетре је показано да MSCs инхибирају апоптозу хепатоцита тако што смањују експресију *Bax* и *Bad* проапоптотских гена (323). *Bax* интерагује са продуктом гена *Noxa*, чија је експресија индукована IFN- $\gamma$  на p53 независан начин (324). Са друге стране, експресија проапоптотског гена *PUMA* је индукована на p53-зависан начин и има важну улогу у митохондријском (унутрашњем) путу активације апоптозе на тај начин што интерагује са антиапоптоским протеином (*Bcl-2*) (325, 326). IDO пореклом из MSCs супримира експресију NKG2D рецептора на CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима, као и активационих рецептора NKp30, NKp44 и NKG2D на NK ћелијама (270, 273). У складу са налазима поменутих студија, резултати овог истраживања су показали да MSCs редукују експресију лиганата који индукују апоптозу хепатоцита FasL и TRAIL, дегранулационог маркера CD107 што за последицу има смањење хепатотоксичке активности NKT ћелија (Графикон 5). mMSCs супримирају и активацију каспазе-3 и експресију проапоптотских гена *Noxa*, *Bax*, *Bad* и *Apaf1*, смањујући оштећење ткива јетре (Графикон 10). На основу резултата описане студије, може се закључити да mMSCs смањују експресију проапоптотских медијатора али без утицаја на p53-зависну *PUMA*-индуковану активацију антиапоптотских гена као што је *Bcl-2*.

## 5.3. mMSCs супримирају ефекторске функције NKT ћелија паракриним механизмом

Добро је познато да MSCs могу супримирати имунски одговор на тај начин што остварују директни контакт са ћелијама имунског система (ангажовање инхибиторних молекула након адхезије) или тако што продукују солубилне медијаторе. Резултати овде приказане студије по први пут показују да mMSCs, паракриним механизмом смањују цитотоксички потенцијал као и способност NKT ћелија да продукују инфламацијске цитокине, што резултира значајном редукцијом оштећења јетре. Експерименти у којима се ћелије кокултивисане у *transwell* систему су недвосмислено



показали да директан контакт ћелија-ћелија није неопходан за имуносупресивни утицај mMSCs на NKT ћелије (Фигура 9).

#### **5.4. Фармаколошка инактивација IDO и iNOS у mMSCs смањује имуномодулаторни ефекат MSCs на NKT ћелије**

Доступни подаци у литератури везани за паракрини ефекат MSCs на ћелије имунског система указују да су потенцијални медијатори који учествују у интеракцији MSCs и NKT ћелија IDO, iNOS, TGF- $\beta$ , HGF, PGE<sub>2</sub> и IL-10 (221).

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

Такође, фармаколошка инхибиција IDO и iNOS у mMSC-СМ, у којем су култивисане  $\alpha$ -GalCer-ом стимулисане NKT ћелије јетре мишева, поништила је имуносупресивни ефекат mMSC-СМ на NKT ћелије *in vitro*. NKT ћелије стимулисане  $\alpha$ -GalCer-ом, култивисане у mMSC-СМ у којем су блокирани поменути имуносупресивни ензими, продуковале су значајно више проинфламацијских цитокина TNF- $\alpha$  и IL-4 и испољиле већи цитотоксички потенцијал према HepG2 ћелијској линији, у поређењу са стимулираним NKT ћелијама које су култивисане у mMSC-СМ без присуства инхибитора (Фигура 12). На овај начин је недвосмислено потврђена важна улога оба сигнална пута, и IDO и iNOS, пореклом из mMSCs, у модулацији ефекторских функција NKT ћелија.

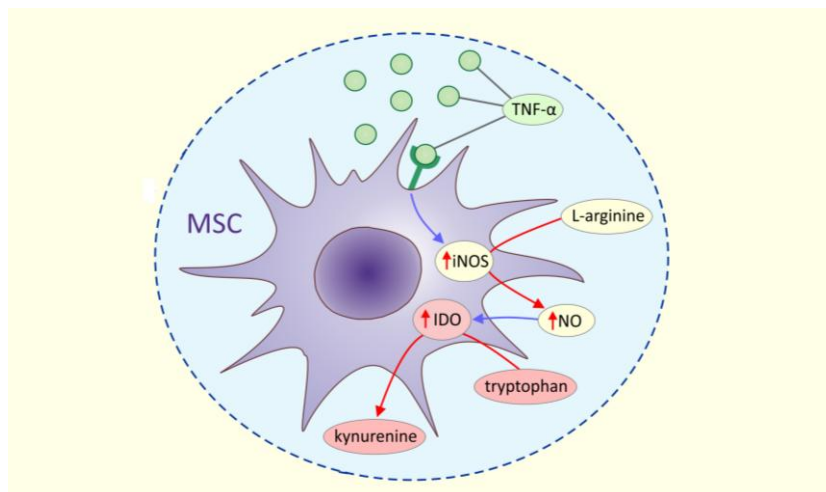
IDO је интрацелуларни ензим који катализује почетну реакцију разградње есенцијалне аминокиселине триптофан у оквиру кинуренинског пута. IDO је првобитно описан као молекул који учествује у одржавању матуралне толеранције и стога се сматра једним од еволутивно најважнијих механизма имунске компетенције и хумане репродукције (327). Овај ензим игра важну улогу у инфекцији, аутоимуности и онкогенези. IDO поседује снажну имуномодулаторну активност која се објашњава на два начина. Локална деплеција триптофана у ткивној микросредини односно медијуму, као и

накупљање кинуренинских метаболита повећавају експресију GCN2 киназе што за последицу има редукцију пролиферације, повећање апоптозе и оштећену функцију Т лимфоцита у условима стреса (328, 329). У моделима аутоимунских болести је показано да IDO помера Th1/Th2 баланс на страну Th2 лимфоцита и повећава удео Treg лимфоцита у регулацији имунског одговора. Познато је да фармаколошка инхибиција IDO узрокује померање цитокинског одговора NKT ћелија у правцу Th2 фенотипа. Насупрот томе, катаболити триптофана, L-кинуренин, 3-хидрокси-кинуренин, и 3-хидрокси-антранилна киселина померају Th1/Th2 баланс у корист Th1 цитокинског профила (319) Смањење продукције IL-4 у NKT ћелијама јетре мишева којима су након изазивања акутног оштећења јетре Con A или  $\alpha$ -GalCer, апликоване MSCs, може се објаснити чињеницом да иако се IL-4 сматра Th2 (антиинфламацијским) цитокином, у контексту NKT-посредованог хепатитиса показано је да IL-4 има снажна проинфламацијска својства (55).

Синтеза IDO у MSCs може бити индукована директно (присуством IFN- $\gamma$  у микросредини) или индиректно аутокрином стимулацијом матичних ћелија секретованим PGE<sub>2</sub>. Spaggiari и сарадници су у контексту NK-MSCs интеракције показали да оба механизма доприносе продукцији IDO у MSCs. IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  пореклом из активираних NK ћелија, индукују продукцију PGE<sub>2</sub> у MSCs, који аутокрино промовише синтезу и активност ензима IDO у MSCs (273). При кокултивацији у односу 1:1 или 10:1, IDO је кључни фактор којим MSCs супримирају пролиферацију, продукцију IFN- $\gamma$ , као и цитотоксичку активност NK ћелија (273). Такође, познато је да IDO пореклом из MSCs супримира пролиферацију и индукује апоптозу Т и В лимфоцита услед деловања кинуренина и токсичних метаболита (хинолинске и 3-хидрокси-антранилне киселине) насталих каталитичком активношћу IDO, на ћелијски циклус лимфоцита. Li и сарадници су показали да супресивни ефекат солубилних фактора (IDO, PGE<sub>2</sub> и TGF- $\beta$ ), на пролиферацију, продукцију цитокина и цитотоксичност CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима, поспешује интеракција (MIC) A/B, лиганда експримираног на MSCs, и NKG2D рецептора на CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима (307). IDO фаворизује диференцијацију моноцита у IL-10<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> имуносупресивне M2 макрофаге који индиректно доприносе супресији имунског одговора (281).

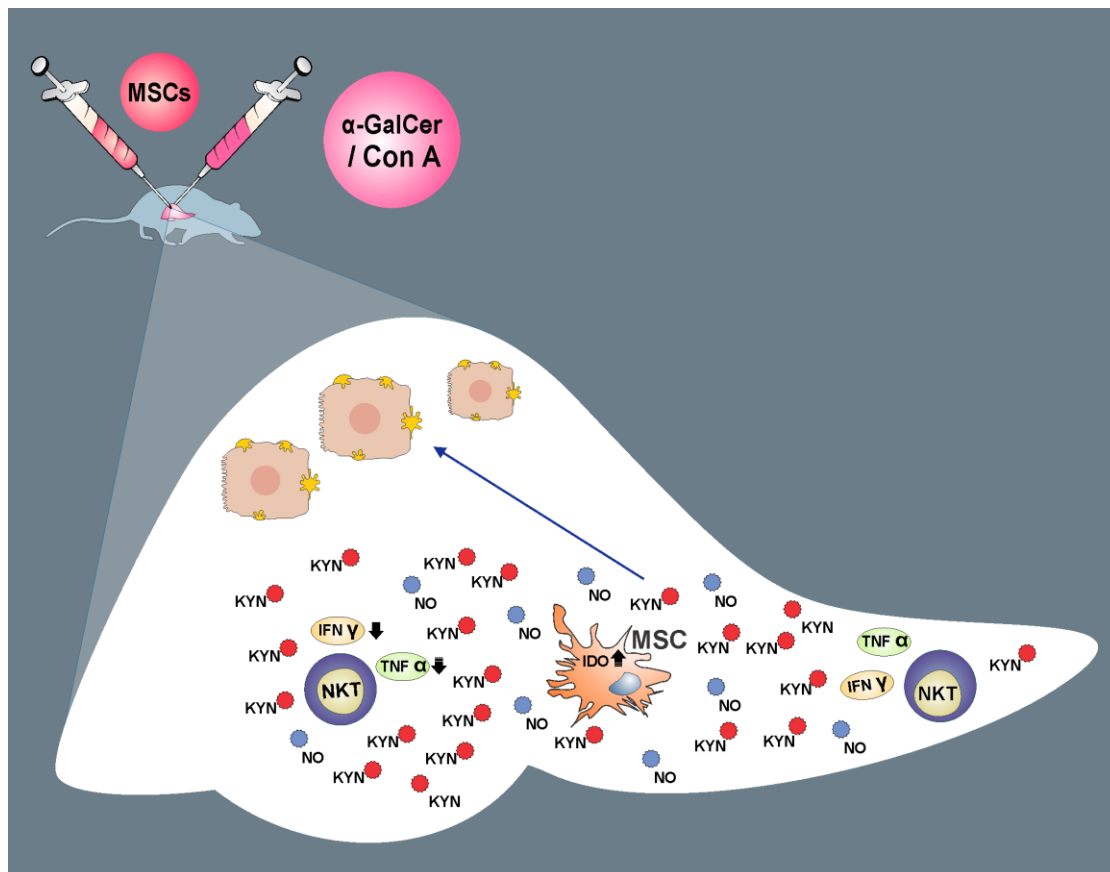
Продукцију NO, брзо дифундујућег гаса и биоактивног молекула из аминокиселине L-аргинин катализује ензим NOS (239,330). NOS је код људи и мишева детерминиран са три гена: iNOS, прво откривен у макрофагима, nNOS у неуронима и eNOS у ендотелним ћелијама. Експресија гена за iNOS је индуцибилна и има важну улогу у

имунорегулацији. Настали NO и реактивни азотни радикали модулирају утиче на TCR сигнализацију, експресију цитокинских рецептора и фенотип T лимфоцита (331). Високе концентрације NO инхибирају пролиферацију T лимфоцита и продукцију цитокина (331, 332). Познато је и да овај оксид утиче на активност бројних ензима, јонских канала и рецептора (333, 334). NO који продукују MSCs супримира фосфорилацију STAT5 молекула и што за последицу има застој ћелијског циклуса (239). У приказаној студији је показано да трансплантација mMSCs повећава концентрацију кинуренина у серуму мишева којима је хепатитис изазван применом Con A односно  $\alpha$ -GalCer-а и следствено смањује оштећење ткива јетре. Ren и сарадници су недавно показали да mMSCs углавном активношћу ензима iNOS и продукцијом NO директно супримирају пролиферацију и продукцију цитокина у лимфоцитима (238). Међутим, пошто је NO веома нестабилан молекул и зато делује само локално, имунске ћелије морају бити у непосредној близини mMSCs како би продуковани NO остварио свој имуносупресивни ефекат (239).



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

Инфламацијски цитокини и хемокини које ослобађају оштећени хепатоцити и имунске ћелије које инфилтришу ткиво јетре, наводе mMSCs у јетру (308). У инфламаторној средини, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  стимулишу mMSCs да експримирају iNOS (223). Пошто у присуству проинфламацијских цитокина, мале молекуларне концентрације NO узрокују повећање активности IDO (335), може се претпоставити да након стимулације  $\alpha$ -GalCer-ом или Con A, активирание NKT ћелије секретују TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$  који индукују експресију iNOS у mMSCs и следствену продукцију NO, што за последицу има повећану активност IDO и супресију цитотоксичности NKT ћелија (Слика 21, 22).



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

На основу добијених резултата може се закључити да IDO и iNOS, пореклом из mMSCs, смањују цитотоксички потенцијал NKT ћелија и њихову способност да продукују проинфламцијске цитокине, што за последицу има мање оштећење ткива јетре у експерименталном моделу хепатитиса узрокованом активацијом NKT ћелија. Резултати ове студије допринеће бољем разумевању имуномодулаторних ефеката матичних ћелија на оштећено ткиво јетре, као и потенцијалној клиничкој примени MSCs у болестима посредованим имунским механизмима.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

Из свега претходно описаног, могу се извести следећи закључци:

### 1. Примена MSCs смањује оштећење хепатоцита у Соп А хепатитису.

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

### 2. Примена MSCs редукује оштећење јетре у $\alpha$ -GalCer хепатитису.

- 2.1. Примена MSCs утиче на значајно смањење концентрације маркера инфламације у серуму и редукује инфламацију у јетри.
- 2.2. Примена MSCs смањује инфлукс ефекторских NKT ћелија при чему не утиче на заступљеност дендритских ћелија у јетри.
- 2.3. MSCs инхибирају секрецију проинфламацијских цитокина у NKT ћелијама и смањују цитотоксичку активност ових ћелија, смањујући експресију лиганата који индукују апоптозу хепатоцита у инфламираној јетри, што је потврђено и *in vitro* кокултивацијом MSCs и стимулираних NKT ћелија.
- 2.4. Примена MSCs супримира експресију про-апоптотских гена у  $\alpha$ -GalCer хепатитису.
- 2.5. Кључни фактори које продукују MSCs и чијом ензимском активношћу супримирају ефекторске функције NKT ћелија и смањују оштећење ткива јетре у хепатитису узрокованом активацијом NKT ћелија су IDO и iNOS.

## СКРАЋЕНИЦЕ

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

## 7. РЕФЕРЕНЦЕ

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

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



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

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

- natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood* 2002; 99:1259-66.
51. Galli G, Nuti S, Tavarini S, Galli-Stampino L, De Lalla C, Casorati G, Dellabona P, Abrignani S. CD1d-restricted Help To B Cells By Human Invariant Natural Killer T Lymphocytes. *J Exp Med* 2003; 197:1051-1057.
  52. Swain MG. Natural Killer T Cells within the Liver: Conductors of the Hepatic Immune Orchestra. *Digestive Diseases* 2010 28: 7-13.
  53. De Santo C, Arscott R, Booth S, Karydis I, Jones M, Asher R, Salio M, Middleton M, Cerundolo V. Invariant NKT cells modulate the suppressive activity of IL-10-secreting neutrophils differentiated with serum amyloid A. *Nat Immunol* 2010; 11:1039-1046.
  54. Wingender G, Hiss M, Engel I, Peukert K, Ley K, Haller H, Kronenberg M, von Vietinghoff S. Neutrophilic Granulocytes Modulate Invariant NKT Cell Function in Mice and Humans. *J Immunol* 2012; 188:3000-3008.
  55. Swain MG. Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clin Sci (Lond)* 2008; 114: 457-466.
  56. Harada K, Isse K, Tsuneyama K, Ohta H, Nakanuma Y. Accumulating CD57 + CD3 + natural killer T cells are related to intrahepatic bile duct lesions in primary biliary cirrhosis. *Liver Int* 2003; 23:94-100.
  57. Kita H, Naidenko OV, Kronenberg M, Ansari AA, Rogers P, He XS, Koning F, Mikayama T, Van De Water J, Coppel RL, Kaplan M, Gershwin ME. Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer. *Gastroenterology* 2002; 123:1031-1043.
  58. Tajiri K, Shimizu Y. Role of NKT Cells in the Pathogenesis of NAFLD. *Int J Hepatol* 2012; 2012:6.
  59. Tajiri K, Shimizu Y, Tsuneyama K, Sugiyama T. Role of liver-infiltrating CD3+CD56+ natural killer T cells in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2009; 21:673-680.
  60. Adler M, Taylor S, Okebugwu K, Yee H, Fielding C, Fielding G, Poles M. Intrahepatic natural killer T cell populations are increased in human hepatic steatosis. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 1725-31.
  61. Cheriñavsky AC, Paladino N, Rubio AE, De Biasio MB, Periolo N, Cuarterolo M, Goñi J, Galoppo C, Cañero-Velasco MC, Muñoz AE, Fainboim H, Fainboim L. Simultaneous expression of th1 cytokines and IL-4 confers severe characteristics to type I autoimmune hepatitis in children. *Human Immunology* 2004; 65:683-691.

62. de Lalla C, Galli G, Aldrighetti L, Romeo R, Mariani M, Monno A, Nuti S, Colombo M, Callea F, Porcelli SA, Panina-Bordignon P, Abrignani S, Casorati G, Dellabona P. Production of Profibrotic Cytokines by Invariant NKT Cells Characterizes Cirrhosis Progression in Chronic Viral Hepatitis. *J Immunol* 2004; 173:1417-1425.
63. Fisicaro P, Valdatta C, Boni C, Massari M, Mori C, Zerbini A, Orlandini A, Sacchelli L, Missale G, Ferrari C. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut* 2009; 58:974-982.
64. Yamagiwa S, Matsuda Y, Ichida T, Honda Y, Takamura M, Sugahara S, Ishikawa T, Ohkoshi S, Sato Y, Aoyagi Y. Sustained response to interferon- $\alpha$  plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C is closely associated with increased dynamism of intrahepatic natural killer and natural killer T cells. *Hepatology* 2008; 38: 664-672.
65. Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000; 192:921-30.
66. Jin Z, Sun R, Wei H, Gao X, Chen Y, Tian Z. Accelerated liver fibrosis in hepatitis B virus transgenic mice: Involvement of natural killer T cells. *Hepatology* 2011; 53:219-229.
67. Wu SJ, Yang YH, Tsuneyama K, Leung PS, Illarionov P, Gershwin ME, Chuang YH. Innate immunity and primary biliary cirrhosis: activated invariant natural killer T cells exacerbate murine autoimmune cholangitis and fibrosis. *Hepatology* 2011; 53:915-925.
68. Wehr A, Baeck C, Heymann F, Niemietz PM, Hammerich L, Martin C, Zimmermann HW, Pack O, Gassler N, Hittatiya K, Ludwig A, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Chemokine Receptor CXCR6-Dependent Hepatic NK T Cell Accumulation Promotes Inflammation and Liver Fibrosis. *J Immunol* 2013; 190:5226-5236.
69. Ishikawa S, Ikejima K, Yamagata H, Aoyama T, Kon K, Arai K, Takeda K, Watanabe S. CD1d-restricted natural killer T cells contribute to hepatic inflammation and fibrogenesis in mice. *J Hepatol* 2011; 54:1195-1204.
70. Syn WK, Oo YH, Pereira TA, Karaca GF, Jung Y, Omenetti A, Witek RP, Choi SS, Guy CD, Fearing CM, Teaberry V, Pereira FE, Adams DH, Diehl AM. Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2010; 51:1998-2007.
71. Schrupf E, Jiang X, Zeissig S, Pollheimer MJ, Anmarkrud JA, Tan C, Exley MA, Karlsen TH, Blumberg RS, Melum E. The role of natural killer T cells in a mouse model with spontaneous bile duct inflammation. *Physiol Rep* 2017; 5:e13117.

72. Chuang YH, Lian ZX, Yang GX, Shu SA, Moritoki Y, Ridgway WM, Ansari AA, Kronenberg M, Flavell RA, Gao B, Gershwin ME. Natural killer T cells exacerbate liver injury in a transforming growth factor beta receptor II dominant-negative mouse model of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2008; 47:571-80.
73. Li B, Sun R, Wei H, Gao B, Tian Z. Interleukin-15 prevents concanavalin A-induced liver injury in mice via NKT cell-dependent mechanism. *Hepatology* 2006; 43:1211-1219.
74. Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97:5498-5503.
75. Biburger M, Tiegs G. Alpha-galactosylceramide-induced liver injury in mice is mediated by TNF-alpha but independent of Kupffer cells. *J Immunol* 2005; 175: 1540-1550.
76. Cao Z, Dhupar R, Cai C, Li P, Billiar TR, Geller DA. A Critical Role for IFN Regulatory Factor 1 in NKT Cell-Mediated Liver Injury Induced by  $\alpha$ -Galactosylceramide. *J Immunol* 2010; 185:2536-2543.
77. Minagawa M, Deng Q, Liu ZX, Tsukamoto H, Dennert G. Activated natural killer T cells induce liver injury by Fas and tumor necrosis factor- $\alpha$  during alcohol consumption. *Gastroenterology* 2004; 126:1387-1399.
78. Syn WK, Agboola KM, Swiderska M, Michelotti GA, Liaskou E, Pang H, Xie G, Philips G, Chan IS, Karaca GF, Pereira Tde A, Chen Y, Mi Z, Kuo PC, Choi SS, Guy CD, Abdelmalek MF, Diehl AM. NKT-associated hedgehog and osteopontin drive fibrogenesis in non-alcoholic fatty liver disease. *Gut* 2012; 61:1323-1329.
79. Deng ZB, Liu Y, Liu C, Xiang X, Wang J, Cheng Z, Shah SV, Zhang S, Zhang L, Zhuang X, Michalek S, Grizzle WE, Zhang HG. Immature myeloid cells induced by a high-fat diet contribute to liver inflammation. *Hepatology* 2009; 50:1412-1420.
80. Shimamura K, Kawamura H, Nagura T, Kato T, Naito T, Kameyama H, Hatakeyama K, Abo T. Association of NKT cells and granulocytes with liver injury after reperfusion of the portal vein. *Cell Immunol* 2005; 234:31-38.
81. Arrenberg P, Maricic I, Kumar V. Sulfatide-Mediated Activation of Type II Natural Killer T Cells Prevents Hepatic Ischemic Reperfusion Injury In Mice. *Gastroenterology* 2011; 140:646-655.

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

242. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi, F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 2005; 105:2821–2827.
243. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99:3838–3843.
244. Nasef A, Chapel A, Mazurier C, Bouchet S, Lopez M, Mathieu N, Sensebé L, Zhang Y, Gorin NC, Thierry D, Fouillard L. Identification of IL- 10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expr* 2007; 13:217–226.
245. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105:1815–1822.
246. Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 2010; 1:2.
247. Chabannes D, Hill M, Merieau E, Rossignol J, Brion R, Souillou JP, Anegón I, Cuturi MC. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood* 2007; 110:3691–3694.
248. Pae HO, Oh GS, Choi BM, Chae SC, Kim YM, Chung KR, Chung HT. Carbon monoxide produced by Heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation by inhibition of IL2 production. *J Immunol* 2004; 172:4744–4751.
249. Bright JJ, Kerr LD, Sriram S. TGF-beta inhibits IL-2- induced tyrosine phosphorylation and activation of Jak-1 and Stat 5 in T lymphocytes. *J Immunol* 1997; 159:175–183.
250. Kalinski P. Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J Immunol* 2012; 188:21–28.
251. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Ex Cell Res* 2005; 305:33–41.
252. Nasef A, Mazurier C, Bouchet S, François S, Chapel A, Thierry D, Gorin NC, Fouillard L. Leukemia inhibitory factor: role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cell Immunol* 2008; 253:16–22.

253. Sioud M, Mobergslien A, Boudabous A, Floisand Y. Evidence for the involvement of galectin-3 in mesenchymal stem cell suppression of allogeneic T-cell proliferation. *Scand J Immunol* 2010; 71:267–274.
254. Lepelletier Y, Lecourt S, Renand A, Arnulf B, Vanneaux V, Femand JP, Menasché P, Domet T, Marolleau JP, Hermine O, Larghero J. Galectin-1 and semaphorin-3A are two soluble factors conferring T-cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. *Stem Cells Dev* 2010; 19:1075–1079.
255. Sivanathan KN, Gronthos S, Rojas-Canales D, Thierry B, Coates PT. Interferon-gamma modification of mesenchymal stem cells: implications of autologous and allogeneic mesenchymal stem cell therapy in allotransplantation. *Stem Cell Rev* 2014; 10:351–375.
256. Bassi ÊJ, de Almeida DC, Moraes-Vieira PM, Câmara NO. Exploring the role of soluble factors associated with immune regulatory properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* 2012; 8:329–342.
257. Duffy MM, Pindjakova J, Hanley SA, McCarthy C, Weidhofer GA, Sweeney EM, English K, Shaw G, Murphy JM, Barry FP, Mahon BP, Belton O, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor. *Eur J Immunol* 2011; 41:2840–2851.
258. Nauta A, Kruisselbrink A, Lurvink E, Willemze R, Fibbe W. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34<sup>+</sup>-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2006; 177:2080–2087.
259. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam E, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* 2007; 83:71–76.
260. Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, Deng W, Zhao RC. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev* 2004; 13:263–271.
261. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2005; 105:4120–4126.
262. Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Pence P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of

- dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* 2007; 25:2025–2032.
263. Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* 2009; 113:6576–6583.
264. Beyth S, Borovsky Z, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 2005; 105:2214–2219.
265. Liu WH, Liu JJ, Wu J, Zhang LL, Liu F, Yin L, Zhang MM, Yu B. Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. *PLoS One* 2013; 8:e55487.
266. Ghannam S, Pène J, Moquet-Torcy G, Jorgensen C, Yssel H. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *J Immunol* 2010; 185:302–312.
267. Del Papa B, Sportoletti P, Cecchini D, Rosati E, Balucani C, Baldoni S, Fettucciari K, Marconi P, Martelli MF, Falzetti F, Di Ianni M. Notch1 modulates mesenchymal stem cells mediated regulatory T-cell induction. *Eur J Immunol* 2013; 43:182–187.
268. Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica* 2005; 90:516–525.
269. Rasmusson I, Uhlin M, Le Blanc K, Levitsky V. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2007; 82:887–893.
270. Li M, Sun X, Kuang X, Liao Y, Li H, Luo D. Mesenchymal stem cells suppress CD8(+) T cell-mediated activation by suppressing natural killer group 2, member D protein receptor expression and secretion of prostaglandin E2, indoleamine 2, 3-dioxygenase and transforming growth factor- $\beta$ . *Clin Exp Immunol* 2014; 178:516–524.
271. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis A D, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 2006; 24:74–85.

272. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24:386–398.
273. Spaggiari G, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008; 111:1327–1333.
274. Prigione I, Benvenuto F, Bocca P, Battistini L, Uccelli A, Pistoia V. Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and gammadelta T cells or invariant natural killer T cells. *Stem Cells* 2009; 27:693–702.
275. Prockop DJ. Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. *Stem Cells* 2013; 31:2042–2046.
276. Eggenhofer E, Hoogduijn MJ. Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transplant Res* 2012; 1:12.
277. Melief SM, Schrama E, Brugman MH, Tiemessen MM, Hoogduijn MJ, Fibbe WE, Roelofs H. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* 2013; 31:1980–1991.
278. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, Mezey E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009; 15: 42–49.
279. Choi H, Lee RH, Bazhanov N, Oh JY, Prockop DJ. Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- $\kappa$ B signaling in resident macrophages. *Blood* 2011; 118:330–338.
280. Melief S, Geutskens S, Fibbe W, Roelofs H. Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica* 2013; 98:888–895.

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



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

301. van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology* 2008; 47:1634–1643.
302. Xagorari A, Siotou E, Yiangou M, Tsolaki E, Bougiouklis D, Sakkas L, Fassas A, Anagnostopoulos A. Protective effect of mesenchymal stem cell conditioned medium on hepatic cell apoptosis after acute liver injury. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6:831–840.
303. Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, Kobayashi N, Tilles AW, Berthiaume F, Yarmush ML. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363:247–252.
304. Huang B, Cheng X, Wang H, Huang W, la Ga Hu Z, Wang D, Zhang K, Zhang H, Xue Z, Da Y, Zhang N, Hu Y, Yao Z, Qiao L, Gao F, Zhang R. Mesenchymal stem cells and their secreted molecules predominantly ameliorate fulminant hepatic failure and chronic liver fibrosis in mice respectively. *J Transl Med* 2016; 14:45.
305. Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, Nam HY, Kim YH, Kim B, Park CG. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med* 2009; 41:315-324.
306. Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One* 2014; 9: e107001.
307. Huang JR, Tsai YC, Chang YJ, Wu JC, Hung JT, Lin KH, Wong CH, Yu AL.  $\alpha$ -Galactosylceramide but not phenyl-glycolipids induced NKT cell anergy and IL-33-mediated myeloid-derived suppressor cell accumulation via upregulation of egr2/3. *J Immunol* 2014; 192:1972-1981.
308. Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Müller S, Seifried E, Gille J, Henschler R. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 2006; 108:3938-3944.
309. Strick-Marchand H, Masse G, Weiss M, Di Santo J. Lymphocytes support oval cell-dependent liver regeneration. *J of Immunol* 2008; 181:2764 -2771.
310. Apte R, Niederhorn J, Mayhew E, Alizadeh H. Angiostatin produced by certain primary uveal melanoma cell lines impedes the development of liver metastases. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:1805-1809.
311. Pala P, Hussel T, Openshaw PJM. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Meth* 2000; 243: 107-124.

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

323. Cai Y, Zou Z, Liu L, Chen S, Chen Y, Lin Z, Shi K, Xu L, Chen Y. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells inhibits hepatocyte apoptosis after acute liver injury. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8:107-116.
324. Sun Y, Leaman DW. Involvement of Noxa in cellular apoptotic responses to interferon, double-stranded RNA, and virus infection, *J Biol Chem* 2005; 280:15561-15568.
325. Yu J, Zhang L. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene* 2008; 27 Suppl 1:S71-83.
326. Biswas S. Context Dependent Role of P53 Up-Regulated Modulator of Apoptosis (Puma) During Liver Degeneration and Regeneration. *J Liver Res Disord Ther* 2016; 2:00027.
327. Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998; 281:1191-1193.
328. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3- dioxygenase. *Immunity* 2005; 22:633-642.
329. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC, Puccetti P. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 2006; 176:6752-6761.
330. Stamler JS, Singel DJ, and Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 258:1898–1902.
331. Niedbala W, Cai B, Liew FY. Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Ann Rheum Dis* 2006; 65:iii37–iii40.
332. Hoffman RA, Mahidhara RS, Wolf-Johnston AS, Lu L, Thomson AW, Simmons RL. Differential modulation of CD4 and CD8 T-cell proliferation by induction of nitric oxide synthesis in antigen presenting cells. *Transplantation* 2002; 74:836–845.
333. Edwards TM, Rickard NS. New perspectives on the mechanisms through which nitric oxide may affect learning and memory processes. *Neurosci Biobehav Rev* 2007; 31:413–425.
334. Murad F. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N Engl J Med.* 2006; 355:2003–2011.

335. López AS, Alegre E, Díaz A, Mugueta C, González A. Bimodal effect of nitric oxide in the enzymatic activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in human monocytic cells. *Immunol Lett* 2006; 106:163-171.