



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

НЕДА МИЛОСАВЉЕВИЋ

УТИЦАЈ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА НА СИГНАЛНИ
ПУТ IL-17 У МОДЕЛИМА АКУТНОГ ХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗЕ
ЈЕТРЕ

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

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

Крагујевац, 2018. године

Сажетак

Интерлеукин 17 (IL-17) игра значајну улогу у патогенези акутног хепатитиса и фиброзе јетре. Због својих имуномодулацијских карактеристика, мезенхималне матичне ћелије (енг. *Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) редукују акутно и хронично оштећење јетре, међутим молекулски механизам којим супримирају инфламацију у овим болестима још увек није разјашњен.

У циљу испитивања утицаја MSCs на сигнални пут IL-17 у патогенези акутног хепатитиса и фиброзе јетре, коришћени су експериментални модели акутног хепатитиса изазвани α -галактоцерамидом и угљен тетра хлоридом, док је у фибрози јетре коришћен експериментални модел изазван угљен тетра хлоридом.

У експерименталним моделима акутног хепатитиса, примена MSCs редукује хепатотоксичност NKT ћелија, паракриним механизмом који зависи од индоламин 2, 3-диоксигеназе (енг. *indolamine 2,3-dyoxigenase*, IDO). Интрацелуларно бојење ћелија јетре и мерење концентрације цитокина у серуму, је показало смањену концентрацију инфламаторног IL-17 и повишену концентрацију имносупресивног IL-10, смањен број NKT ћелија које продукују IL-17 (NKT17) и повећан број FoxP3+ NKT ћелија које продукују IL-10 (NKTreg) у јетрама мишева који су примили MSCs. Примена MSC-СМ резултује повећаним односом NKTreg/NKT17 у јетри мишева, слаби акутни хепатитис *in vivo* и значајно редукује хепатотоксичност NKT ћелија. Примена 1-метил триптофана (1-MT), фармаколошког инхибитора индоламин 2, 3-диоксигеназе у потпуности блокира ово својство MSCs.

У експерименталном моделу фиброзе јетре, примена MSCs значајно редукује фиброзу јетре изазвану угљен тетра хлоридом, смањењем серумске концентрације IL-17, повећањем концентрације IL-10, IDO и кинуренина. MSCs редукују број Th17 лимфоцита који продукују IL-17 и повећавају проценат CD4+IL-10+ Т лимфоцита. Примена MSC-СМ редукује број Th17 лимфоцита у јетри и смањује концентрацију IL-17 у серуму. MSC-СМ промовишу експанзију CD4+FoxP3+IL-10+ регулаторних Т лимфоцита и супримирају пролиферацију Th17 лимфоцита. Примена IDO инхибитора, 1-MT је укинула овај имуномодулацијски феномен.

Најважнији закључци ове дисертације су да у акутном оштећењу јетре, примена MSCs смањује секрецију IL-17 из интрахепатичних NKT ћелија, док у фибрози јетре редукује ослобађање IL-17 из CD4+T лимфоцита чиме значајно смањује оштећење хепатоцита.

Кључне речи: мезенхималне матичне ћелије, IL-17, акутни хепатитис, фиброза јетре.

САДРЖАЈ

1. УВОД	4
1.1. Јетра, морфолошке и функционалне карактеристике.....	4
1.2. Обољења јетре.....	5
1.2.1. Акутни хепатитис	9
1.2.1.1. Дефиниција и етиологија.....	9
1.2.1.2. Клиничка слика акутног хепатитиса	10
1.2.1.3. Улога ћелија имунског система у патогенези акутног хепатитиса	10
1.2.1.3.1. Урођеноубилачки Т лимфоцити.....	13
1.2.1.4. Улога цитокина у патогенези акутног хепатитиса.....	15
1.2.1.4.1. IL-17 у акутном хепатитису.....	16
1.2.1.5. Дијагноза акутног хепатитиса.....	17
1.2.1.6. Терапија акутног хепатитиса.....	17
1.2.2. Фиброза јетре	18
1.2.2.1. Дефиниција и етиологија.....	18
1.2.2.2. Патогенеза фиброзе јетре.....	18
1.2.2.3. Клиничка слика фиброзе јетре.....	20
1.2.2.4. Ћелије у фибрози јетре.....	21
1.2.2.4.1. CD4+ Т лимфоцити у фибрози јетре.....	22
1.2.2.4.2. Стелатне ћелије јетре.....	23
1.2.2.5. Цитокини у фибрози јетре.....	24
1.2.2.5.1. IL-17 у фибрози јетре.....	25
1.2.2.6. Дијагноза фиброзе јетре.....	26
1.2.2.7. Терапија фиброзе јетре.....	27
1.3. МЕЗЕНХИМАЛНЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ	28
1.3.1. Карактеристике мезенхималних матичних ћелија и улога у имунском одговору.....	28
1.3.2. Улога MSCs у акутном хепатитису и фибрози јетре.....	30

1.4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛ АКУТНОГ ХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ.....	31
1.4.1. Акутни хепатитис индукован CCl₄.....	31
1.4.2. Фиброза јетре изазвана CCl₄.....	32
1.4.3. Акутни хепатитис индукован α-GalCer-ом.....	33
2. ЦИЉ РАДА.....	35
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	36
3.1. Ћелијска линија мишијих мезенхималних матичних ћелија.....	36
3.2. Ћелијска линија хуманог карцинома јетре (HepG2).....	36
3.3. Кондиционирани медијум мезенхималних матичних ћелија (MSC- CM).....	37
3.4. Фармаколошка инхибиција индоламин 2,3 деоксигеназе (IDO).....	37
3.5. Експерименталне животиње.....	38
3.6. Индукција акутног хепатитиса и апликација MSCs.....	40
3.7. Индукција фибозе јетре и апликација MSCs.....	40
3.8. Трансплантација MSCs у развијеној фибрози изазваној CCl₄.....	41
3.9. Биохемијска анализа оштећења јетре.....	41
3.10. Патохистолошка анализа ткива јетре.....	42
3.10.1. Бојење хематоксилином и еозином (H&E).....	42
3.10.2. PicroSirius-Red бојење.....	43
3.11. Мерење концентрације цитокина и имуносупресивних фактора које продукују MSCs у серуму.....	44
3.12. Одређивање кинуренина у серуму.....	45
3.13. Одређивање профиброгенних протеина полимеризованом ланчаном реакцијом.....	46
3.13.1. Изолација РНК.....	46
3.13.2. Реверзна транскрипција.....	46
3.13.3. Реакција ланчаног умножавања у реалном времену.....	47
3.14. Изолација моноклеарних ћелија из јетре.....	48

3.15.	Фенотипизација мононуклеарних ћелија јетре проточном цитометријом.....	48
3.16.	Детекција MSCs у јетрама мишева третираних CCl ₄	53
3.17.	Изолација NKT ћелија из јетре.....	54
3.18.	Изолација спленоцита и сепарација CD4 ⁺ Т лимфоцита помоћу магнетних куглица.....	55
3.19.	Мерење цитотоксичности NKT ћелија употребом xCELLigence система.....	56
3.20.	Испитивање паракриних ефеката MSCs на хепатотоксичност NKT ћелија <i>in vitro</i>	57
3.21.	Испитивање паракриних ефеката MSCs на функцију CD4 ⁺ Т лимфоцита <i>in vitro</i>	57
3.22.	Изолација стелатних ћелија јетре.....	58
3.23.	Кокултивација CD4 ⁺ Т лимфоцита обележених MSCs са HSCs.....	59
3.24.	Статистичка обрада података.....	59
4.	РЕЗУЛТАТИ.....	60
4.1.	УТИЦАЈ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА НА СИГНАЛНИ ПУТ IL-17 У МОДЕЛУ АКУТНОГ ХЕПАТИТИСА.....	60
4.1.1.	Једнократна апликација MSCs значајно смањује акутно оштећење јетре које је изазвано CCl ₄ , смањује инфилтрацију инфламаторним ћелијама и серумски ниво IL-17.....	60
4.1.2.	Примена MSCs значајно смањује број NKT ћелија које продукују IL-17, али не утиче на број неутрофила, CD4 ⁺ и CD8 ⁺ Т лимфоцита који продукују IL-17 у акутном оштећењу јетре изазваном CCl ₄	64
4.1.3.	У експерименталном моделу акутног хепатитиса изазваног NKT ћелијама, мезенхималне матичне ћелије смањују укупан број NKT ћелија које продукују IL-17 ⁺ а повећавају број FoxP3 ⁺ IL-10 ⁺ NKT ћелија.....	65
4.1.4.	MSCs смањују хепатотоксичност NKT ћелија јетре.....	69

4.1.5.	MSCs, паракриним механизмом, утичу на продукцију IL-17 у NKT ћелијама.....	70
4.1.6.	Смањење хепатотоксичности NKT ћелија, посредством MSCs, зависи од индоламин 2, 3 деоксигеназе.....	73
4.2.	УТИЦАЈ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА НА СИГНАЛНИ ПУТ IL-17 У МОДЕЛУ ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ.....	76
4.2.1.	Интравенски ордиране MSCs мигрирају у јетру експерименталних животиња који су примали CCl ₄ и смањују изазвану фибозу.....	76
4.2.2.	Примена MSCs, као и у акутном хепатитису, значајно слаби фиброзу јетре, изазвану CCl ₄ , што је потврђено макроскопским и микроскопским карактеристикама, вредностима трансаминаза у серуму и квантитативном RT-PCR анализом.....	77
4.2.3.	MSCs смањују ниво IL-17 у серуму и инфилтрацију CD4 ⁺ Т лимфоцита који продукују IL-17 у јетрама мишева третираних CCl ₄	81
4.2.4.	MSCs паракриним механизмом супримирају Th17 лимфоците.....	84
4.2.5.	Примена 1-MT <i>in vivo</i> погоршава фиброзу јетре.....	90
4.2.6.	Терапијска примена MSCs смањује фиброзу јетре у развијеној болести.....	95
5.	ДИСКУСИЈА.....	98
5.1.	МЕЗЕНХИМАЛНЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ РЕДУКУЈУ АКУТНО ОШТЕЋЕЊЕ ЈЕТРЕ СМАЊЕЊЕМ БРОЈА NKT17 ЋЕЛИЈА И ПОВЕЋАЊЕМ ПРИСУСТВА РЕГУЛАТОРНИХ NKT ЋЕЛИЈА У ЈЕТРИ.....	98
5.2.	МЕЗЕНХИМАЛНЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ РЕДУКУЈУ ФИБРОЗУ ЈЕТРЕ СМАЊЕЊЕМ БРОЈА IL-17-ПРОДУКУЈУЋИХ Th17 ЛИМФОЦИТА У ЈЕТРИ.....	100
6.	ЗАКЉУЧЦИ.....	104
	СКРАЋЕНИЦЕ.....	105

7. РЕФЕРЕНЦЕ.....106

1. УВОД

У уводном делу је описана јетра, објашњене су морфологија и опште карактеристике обољења јетре и класификација обољења јетре. Објашњена је етиологија, клиничка слика, дијагноза и прогноза акутног хепатитиса и фиброзе јетре, улога ћелија имунског система, цитокина, а посебно IL-17 у имунопатогенези ових ентитета, описана је патогенеза експерименталног акутног хепатитиса и фиброзе јетре, имуномодулацијски ефекти мезенхималних матичних ћелија и описан је терапијски потенцијал који ове ћелије имају у лечењу акутног оштећења јетре.

1.1. Јетра: морфолошке и функционалне карактеристике

Јетра је витални орган, неопходан за функционисање организма сисара. Налази се у десном хемиабдомену, десном горњем квадранту, испод дијафрагме, покривена ребарним луком (1). Јетра поседује велики број функција: врши детоксификацију метаболита, синтетише протеине, укључујући ензиме, хормоне, факторе коагулације, цитокине (2), као и биохемијске продукте, неопходне за дигестију (1). Јетра филтрира крв из дигестивног тракта, која у њу долази путем *Venae portae*. Метаболише хемикалије, лекове и алкохол.

Игра значајну улогу у конвертовању амонијака у уреу, која се потом екскретује преко бубрега. Служи као депо за витамин В12, фолну киселину, гвожђе, витамин А, витамин D, витамин Е и витамин К.

Сходно наведеним улогама, јетра учествује у уклањању непотребних продуката организма, попут: леква, бактерија, гљивица, вируса, паразита, хемикалија, масти и алкохола (2). Има своје место у борби против инфекција, правилном згрушавању крви и дигестији (1).

1.2. ОБОЉЕЊА ЈЕТРЕ

Поремећаји у функционисању и оштећење јетре, настају као последица инфекција (вирусни хепатитиси) (3, 4), хроничне употребе алкохола (5), као последица примене бројних лекова (6) (парацетамол, амоксицилин, ципрофлоксацин, хлорпромазин, еритромицин и други) (7).

Код генетски подложних особа, може доћи до развоја аутоимунског обољења јетре, чија патогенеза још увек није разјашњена, а може се манифестовати у три клиничка ентитета: аутоимунски хепатитис, примарна билијарна цироза и примарни склерозирајући холангитис (4, 8, 9).

Оштећење јетре може бити последица функционалних или опструктивних поремећаја, као последица поремећаја депоновања (гликогена, холестерола, амилоида). У јетри се могу развити примарни тумори, попут хепатоцелуларног или холангиоцелуларног карцинома (1). Оштећење јетре може бити и васкуларне етиологије а обзиром на двоструку васкуларизацију и централно место у метаболизму, може бити седиште бројних метастаза малигних неоплазми (1).

Међутим, ниједна класификација болести није апсолутно адекватна, обзиром да су бројни етиолошки и патогенетски механизми још увек непознати (1, 4).

Наследне хипербилирубинемije

Gilbert-ов синдром

Crigler-Najjar-ов синдром, I и II тип

Dubin Jonson-ов синдром

Rotor-ов синдром

Вирусни хепатитиси

Хепатитис А

Хепатитис Б

Хепатитис Ц

Хепатитис Е

Остали (*Epstein-Barr* вирус- мононуклеоза)
Херпес вирус, хепатитис узрокован аденовирусом)
Криптогени хепатитис

Имунске и аутоимунске болести јетре

Примарна билијарна цироза
Аутоимунски хепатитис
Склерозирајући холангитис
Болест калем против домаћина (енг. *Graft-versus-host*)
Overlap синдром
Одбацивање алографта

Генетске болести јетре

Дефицијенција α 1 антитрипсина
Хемохроматоза
Вилсонова болест
Бенигна рекурентна интрахепатична холестаза
Прогресивна фамилијарна интрахепатична холестаза, типови I-III
Остало (галактоземија, тирозинемија, цистична фиброза, *Newman-Pick*-ова болест, *Gaucher*-ова болест)

Алкохолна болест јетре

Акутна стеатоза јетре
Акутни алкохолни циститис
Laennec-ова цироза

Неалкохолна стеатоза јетре

Стеатоза
Стеатозни хепатитис

Акутна стеатоза јетре у трудноћи

Обољења јетре у оквиру системских болести

Саркоидоза
Амилоидоза
Болест депоновања гликогена

Целијачна болест

Туберкулоза

Инфекција са *Mycobacterium avium-intracellulare*

Холестатски синдроми

Бенигна постоперативна холестаза

Жутица у оквиру сепсе

Жутица узрокована потпуном парентералном исхраном

Холестаза у трудноћи

Холангитис и холесциститис

Екстрахепатична билијарна опструкција (камен, стриктура, карцином)

Билијарна атрезија

Caroli-јева болест

Криптосторидоза

Лековима узрокована болест јетре

Доминатно хепатоцелуларно оштећење (изонијазид, ацетаминофен)

Доминатно холестатско оштећење (метилтестостерон)

Мешовита оштећења (сулфонамиди, фенитоин)

Микро- и макроваскуларна стеатоза (метотрексат, фиалуридин)

Васкулана оштећења јетре

Вено-оклузивна болест

Budd-Chiari синдром

Исхемијски хепатитис

Пасивна конгестија

Тромбоза вене порте

Нодуларна регенеративна хиперплазија

Лезије јетре

Хепатоцелуларни карцином

Холангиокарцином

Аденоми јетре

Фокална нодуларна хиперплазија

Метастаски тумори

Абсцеси

Цисте

Хемангиом

Табела 1: Класификација обољења јетре. Кориговано према: *Kasper, Dennis L., et al. Harrison's Principles of Internal Medicine. 19th edition. New York: McGraw Hill Education, 2015.*

Болести јетре, у зависности од тока и развоја симптома, се могу поделити на хиперакутне, акутне, субакутне и хроничне (10).

Хиперакутно оштећење настаје року од седам дана од почетка првих симптома, акутно оштећење карактерише интервал јављања симптома између 8 и 28 дана, док се термин субакутни хепатитис користи за случајеве код којих се енцефалопатија јавља између 5 и 12 недеље. Хронично оштећење јетре карактеришу симптоми и знакови болести који настају након 12 недеље од почетка болести (1, 11).

Акутно оштећење јетре је животно угрожавајуће стање, које се карактерише брзом некрозом хепатоцита, а у одсуству претходног обољења јетре (12). Настала некроза хепатоцита доводи до брзог губитка функције јетре и карактерише се жутицом, израженом коагулопатијом и хепатичном енцефалопатијом (13).

Хронично оштећење јетре настаје као последица декомпензације, која настаје као последица фиброзних промена у јетри, те нарушавања нормалне архитектонике и функције јетре (14), у касном стадијуму болести (15) доводи до цирозе јетре (16). Карактерише се појавом жутице, асцита, енцефалопатије и гастроинтестиналним крварењима (17).

1.2.1. АКУТНИ ХЕПАТИТИС

1.2.1.1. Дефиниција и етиологија

Акутно оштећење јетре представља, често животно угрожавајући, синдром који се најчешће јавља код особа без претходног обољења јетре (11) у коме се симптоми и знакови болести јављају унутар осам недеља (12) и који се, додатно, у односу на временски след може поделити на хиперакутно, акутно и субакутно оштећење јетре (1).

Узроци акутног оштећења јетре су бројни и значајно се разликују између развијених земаља и земаља у развоју. Најчешћи узроци су вирусне инфекције, примена лекова, метаболичка оштећења, токсични продукти, иако је у великом броју случајева етиологија непозната (11, 18).

У већини земаља у развоју, вируси хепатитиса (А, В, С, и Е) су најзаступљенији узрочници акутног оштећења јетре, са процентом смртности и до 50 % (19-21). У ређе узрочнике се могу убројати хепатотропни вируси, као што су: херпес *simplex* вирус, цитомегаловирус, *Epstein-Barr* вирус и парвовируси (22).

У развијеним земљама, токсично дејство лекова је најчешћи узрочник акутног оштећења јетре (11, 23), када је проценат преживљавања мањи од 50% уколико трансплантација није могућа (24). Оштећења јетре могу зависити од дозе, као што је случај са парацетамолом (24, 25) те се могу предвидети, што у већини случајева није могуће. Акутно оштећење јетре могу изазвати и антибиотици (амоксицилин у комбинацији са клавуланском киселином, цефазолин, ципрофлоксацин) (26-28), туберкулостатици, хиполипемизи, биљни суплементи (29-31), као и одређени наркотици: екстази (*3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine*, MDMA) и кокаин (*benzoylecgonine*) (11).

Поред наведеног, оштећење јетре може бити последица исхемијског оштећења јетре, код болесника са примарним срчаним, васкуларним или респираторним поремећајима (30). Може бити последица малигнитета, аутоимунске реакције али и метаболичких болести, као што је Вилсонова болест (31-33).

Узрок акутног оштећења јетре може остати непознат, упркос детаљним претрагама а овакви узроци, најчешће имају субакутну презентацију и лошу прогнозу без трансплантације (11, 25).

1.2.1.2. Клиничка слика акутног хепатитиса

Симптоми акутног оштећења јетре су следећи: мучнина, повраћање, свраб, умор, малаксалост, бол у абдомену, губитак у телесној маси, мијалгија/артралгија. Физикалним прегледом се уочава жутица коже и видљиве слузокоже, хепатомегалија која може бити праћена спленомегалијом, и у мањем броју случајева присуством слободне течности у абдомену (асцит) (34, 35).

Стање пацијента се може додатно компликовати развојем кардиореспираторне инсуфицијенције, холестазом различитог интензитета, развојем бубрежне слабости, коагулопатијом због смањене способности јетре да синтетише факторе коагулације, настанком интракранијалне хипертензије, односно прогресивном хепатичном енцефалопатијом до стања коме и бројним метаболичким поремећајима (11, 36-40).

1.2.1.3. Улога ћелија имунског система у патогенези акутног хепатитиса

У акутном оштећењу јетре, изазваном различитим факторима, централну улогу има развој инфламацијског одговора, који обухвата и резидентне ћелије као и инфламацијске ћелије које инфилтришу јетру. Због своје улоге и чињенице да јетра прима и порталну, венску и артеријску крв, она представља значајну и критичну компоненту у одбрани организма од антигена из крви (41). Да би задовољила своју вишефункционалну улогу, јетра поседује бројне ћелије урођеног и стеченог имунског одговора (29, 42). Улога урођеног имунског одговора у оштећењу јетре настаје у зависности од етиолошког фактора који је изазвао оштећење (1).

У урођеном имунском одговору учествују моноцити, дендритске ћелије, макрофаги (Купферове ћелије), НК и НКТ ћелије, као и антимикробне компоненте (цитокини, хемокини, систем комплемента) (43).

Акумулација неутрофила на место оштећења у јетри настаје због тзв. механичког заробљавања ових ћелија у најближим синусоидалним крвним судовима, односно као последица измена како у самим активираним неутрофилима, тако и синусоидалним ендотелним ћелијама које експримирају CD44 и HA (енг. *hyaluronan ligand*), али и због смањеног протока крви у капиларима (44). Поред CD44 и HA, у миграцији неурофила у јетру су укључени и протеини комплемента, хемокини (као што је CXCL8) и цитокини (TNF- α и IL-1) (45).

Неутрофили као професионални фагоцити са бројним антимикробним молекулима (46), су прве ћелије на месту акутног оштећења у јетри (47), где активирани одлобађају реактивне облике кисеоника (енг. *reactive oxygen species*, ROS), оксидансе, кателицидине, дефенсине и лактоферин (46-50) као и хемокине и факторе попут TNF- α , IL-1 и GM-GCF, који привлаче нове неутрофиле одржавају инфламацијску реакцију (8, 47).

Експресивно накупљање неутрофила може довести до значајних проинфламаторних ефеката и оштећења ткива јетре (51), што је показано у бројним експерименталним моделима (52 - 54). Неутрофили могу оштетити хепатоците на различите начине: ослобађањем реактивних облика кисеоника и протеаза (44), продукцијом мијелопероксидазе (55), као и активношћу IL-17, посредством IL-8, што је показано у алкохолном хепатитису (5).

Моноцити су део монуклеарног фагоцитног система (56), чија се субпопулација може дефинисати на основу експресије површинских маркера (56, 57). Код мишева, моноцити експримирају следеће рецепторе за хемокине: CD62L (*L-selectin*), LFA-1 (α L β 2 *integrin*), Mac-1 (α M β 2 *integrin*), PECAM-1 (CD31), and VLA-4 (α 4 β 1) (58). На месту инфламације диферентују у макрофаге, и имају широку улогу, од уклањања оштећених ћелија до ремоделовања ткива (59).

Купферове ћелије су резидентни макрофаги јетре, присутни у јетри, дуж лумена синусоидалних простора (57, 59, 60). Имају фагоцитну улогу али и секреторну улогу

(продукују бројне цитокине, попут IL-1, IL-6, GM-CSF, TNF α и друге) (61), учествују у даљој регулацији моноцита и неутрофила (64).

Иако заштитна, њихова функција може довести до оштећења хепатоцита (62, 63). Могу да оштете здраве хепатоците продукцијом реактивних облика кисеоника, проинфламаторних цитокина и привлачењем неутрофила на место оштећења (64).

За разлику од класично активираних макрофага (или M1), алтернативно активирани макрофаги поседују антиинфламаторну, имуносупресивну улогу, чију активацију узрокују IL-4 и IL-13, секретују IL-10 и неопходни су за одржавање хомеостазе у јетри (65-67).

Експерименталне студије на анималним моделима показују да су Купферове ћелије укључене у бројне патогенетске механизме оштећења јетре (66).

Поред наведених и мастоцити су укључени у патогенезу оштећења хепатоцита (68). Налазе се у близини крвних судова јетре, жучних путева (69). Број мастоцита може бити повећан у хепатитису и фибрози јетре, карциному јетре и другим обољењима које погађају јетру (69-72).

Улога базофила у оштећењу јетре још увек није довољно испитана (41). Познато је да су могу иницирати Th2 одговор у присуству антигена и дендритских ћелија, те да мигрирају у јетру код одређених цревних инфекција (73, 74).

Еозинофили играју значајну улогу у патогенези примарне билијарне цирозе, примарног склерозирајућег холангитиса, оштећењу јетре које је изазвано лековима (75-77).

Дендритске ћелије (енг. *dendritic cells*, DCs) јетре имају значајну улогу у индукцији и регулацији имунског одговора и представљају везу између урођеног и стеченог имунског одговора у јетри (41).

NK ћелије (енг. *natural killer cells*, NK cells) су бројне у јетри и представљају прву линију одбране (39, 76). У хуманој јетри, NK ћелије (CD56+CD3-) чине и до 30% резидентних лимфоцита а код мишева чине 5-10% популације и дефинишу се као NK1.1 + CD3- (за C57BL/6 сој) или као DX5+CD3- (78, 79). Долазе веома рано на место оштећења у јетри и

одговарају на већи број хемокина (80). Имају улогу у ремоделовању и фибрози јетре, антивирусном одговору, те антитуморском одговору (41).

Специфични, цитотоксички CD8⁺ Т лимфоцити имају значајну улогу у хепатотропним вирусним инфекцијама (инфекције хепатитис В и С вирусима) и хепатоцелуларном карциному (81), обзиром да су ове ћелије способне да препознају инфициране или измењене ћелије и униште их (82-84).

Активирани CD4⁺ Т лимфоцити мигрирају на место инфламације у јетри, и у зависности од микросредине могу имати проинфламацијску или регулаторну улогу у акутном хепатитису (85). Регулаторни Т лимфоцити (*Tregs*) супримирају пролиферацију и функцију ефекторских Т лимфоцита (86). Т регулаторни лимфоцити имају значајну улогу у контроли имунског одговора у јетри (87). Показано је да CD4⁺CD25⁺ *Treg* ограничавају оштећење јетре изазвано Соп А, ангажујући TGF- β сигнални пут (88). Ефекторски Т лимфоцити, продукцијом цитокина, стимулишу остале ћелијске популације, које учествују у оштећењу јетре (89).

1.2.1.3.1. Урођеноубилачки Т лимфоцити

Урођеноубилачки Т лимфоцити (енг. *Natural Killer T cells*, NKT) су ћелије урођеног имунског система и представљају мост који повезује урођени и стечени имунски одговор (90, 91). NKT ћелије експримирају и Т ћелијски рецептор (енг. *T cell receptor*, TCR) и маркере урођеноубилачких (енг. *natural killer*, NK) ћелија као што су NK1.1, NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2E, Ly49a и CD49b (који су експримирани на мишијим ћелијама), док су на хуманим ћелијама експримирани следећи маркери NK ћелија: CD56, CD16 и CD161 (92, 93). NKT ћелије препознају гликолипидне антигене приказане у склопу CD1d молекула, неполиморфног MHC-like молекула I класе на мембрани ћелија које презентују антигене (енг. *antigen-presenting cells*, APC): дендритским ћелијама, Б и Т лимфоцитима и макрофагима (94, 95).

На основу фенотипа, NKT ћелије се деле на тип I, односно инваријантне NKT ћелије (енг. *invariant NKT cells*, iNKT) и тип II NKT ћелије које су знатно мање проучене (96, 97). iNKT

ћелије су многобројније у односу на тип II, код мишева и чине око 50% интрахепатичних лимфоцита (98, 99). iNKT ћелије експримирају инваријантни α ланац TCR-a, настао реаранжирањем V α 14–J α 18 ланца (у мишева), односно хомологог V α 24–J α 18 ланца (у хуманој популацији). Инваријантни α ланац TCR-a упарује се са β ланцем, ограничене хетерогености (код мишева: V β 8.2, V β 7 или V β 2, а код људи V β 11 ланац) (100, 101). Ове ћелије препознају α -галактоцерамид (енг. *α -galactosylceramide*, α -GalCer) приказан у склопу CD1d молекула (102, 103). NKT ћелије тип 2, које су бројније код људи, експримирају TCR молекулу који поседује већу разноликост (103-104) и препознаје хидрофобне антигене. Диференцијацијом хематопоезних прекурсора, iNKT ћелије настају у тимусу, где подлежу позитивној селекцији преко CD1d молекула експримираног на површини CD4⁺CD8⁺ тимоцита (105). У негативној селекцији iNKT ћелија у тимусу учествују CD1d⁺ дендритске ћелије, након чега iNKT ћелије мигрирају у периферне органе (106).

Активација NKT почиње по препознавању антигена у склопу CD1d молекула на APC или цитокинима (IL-12 или IL-2 које секретују APC у јетри) (94, 105-107). Поред ендогених липида, за овај молекулу се могу везати и активирати NKT ћелије и антигени микроорганизама (*Helicobacter pylori*, *Streptococcus pneumonia*) (108). Активиране NKT ћелије (применом IL-12, Соп А или α -GalCer-a) (109) продукују Th1 (TNF- α , IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-10) Th17 (IL-17, IL-22) цитокине (110-113) који могу да оштете хепатоците или ослабањањем FasL и серин протеаза (93, 94, 113) неколико часова по активацији. NKT ћелије продукују и бројне друге цитокине: IL-10, IL-3, IL-5, IL-9, IL-13, фактор некрозе тумора (енг. *Tumor necrosis factor alpha*, TNF- α), IL-17, IL-2, IL-21, IL-22 и колоностимулишући фактор гранулоцита и макрофага (енг. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) (114, 115). NKT ћелије, посредством CD40L-CD40 интеракције, стимулишу дендритске ћелије да продукују IL-12, који је важан за одржавање броја и активацију NKT ћелија (115, 116).

NKT ћелије, директно или индиректно, у јетри, могу имати проинфламацијску или антиинфламацијску улогу (117). NKT ћелије, током инфламације, у повећаном броју мигрирају у јетру, што је праћено повећаном експресијом CD1d на површини Купферових ћелија јетре (118).

Улога NKT ћелија у већем боју експерименталних модела болести јетре је потврђена, укључујући: акутни хепатитис, токсична оштећења јетре, исхемијска оштећења јетре, примарне билијарне цирозе, стеатозе јетре (119-122).

1.2.1.4. Улога цитокина у патогенези акутног хепатитиса

Цитокини играју значајну улогу у патофизиологији акутног хепатитиса, узрокујући некрозу хепатоцита, екстрахепатичне компликације и регенерацију хепатоцита (87, 123).

Каскада активације проинфламаторних цитокина (TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17) у акутном хепатитису је слична имунској парализи у сепси (89, 124).

У раној фази оштећења јетре, високе концентрације TNF- α штите хепатоците од апоптозе, док континуирано повећање индукује апоптозу и некрозу хепатоцита. Повећање TNF- α је праћено повећаном експресијом TNF- α рецептора 1 (125-128).

У акутном оштећењу јетре, NK ћелије и Т лимфоцити продукују IFN- γ који потом активира макрофаге (89). Улога IFN- γ у акутном оштећењу јетре је доказана у већем броју студија (128, 129). Смањена продукција IFN- γ у акутном оштећењу јетре редукује оштећење хепатоцита (129).

IL-6 може имати проинфламацијску и антиинфламацијску улогу у акутном оштећењу јетре, где га продукују макрофаги и Т лимфоцити (131). Повећана експресија IL-6 је у корелацији са тежином оштећења јетре у акутном хепатитису (87, 131), док друге студије показују да IL-6 има протективну улогу у оштећењу јетре (у експерименталним моделима акутног хепатитиса, изазваног ConA, CCl₄ и оштећењу јетре изазваном лековима), путем индукције антиапоптотских протеина (Bcl-xL, Bcl-2 и FLIP), активације STAT3 сигналног пута и инхибиције секреције IFN- γ (132-134).

Антиинфламацијски и хепатопротективни IL-10 смањује продукцију проинфламацијских цитокина и инхибира активацију моноцита (преко сигналног пута NF- κ B) (87). Смањена концентрација IL-10 у серуму пацијената са акутним оштећењем јетре представља неповољан прогностички параметар (135).

1.2.1.4.1. IL-17 у акутном хепатитису

Интерлукин 17 (енг. *Interleukin-17* (IL-17)) је плеиотропни проинфламаторни цитокин, ког продукује већи број ћелија: NK и NKT ћелије, CD4⁺ Т лимфоцити, урођене лимфоидне ћелије, $\delta\gamma$ Т лимфоцити (136). Након активације iNKT ћелија (α -GalCer) оне производе, између осталог и IL-17A, IL-17F, IL-21, и IL-22 (137).

Описано је шест изоформи IL-17 (IL-17A - IL-17F), IL-17A је до сада најбоље описан, док IL-17F поседује 60% хомологије са IL-17A, али има 10 пута мањи афинитет за своје рецепторе (138). Може формирати холодимере или хетеродимере, а када се веже за свој рецептор IL-17RA, који воде регрутовању инфламацијских ћелија, нпр неутрофила, и развоју инфламацијског одговора (139). Секретијом IL-17 управљају IL-6 и IL-23, путем JAK-STAT сигналног пута и преко PI3K киназе NF- κ B. (140, 141). STAT3 и/или NF- κ B, у овом случају се транслоцирају у једро где промовишу продукцију IL-17 (141).

Постоји различитих хетеродимерних рецептора за IL-17, при чему је IL-17 RA експримиран на великом броју ткива (јетра, плућа, црева, масно ткиво) и ћелијским популацијама (ћелије имунског система и ендотелне ћелије) (140, 141). На свим ћелијама јетре (укључујући хепатоците, Купферове ћелије, синусоидалне ендотелне ћелије) се могу наћи рецептори за IL-17 (142).

IL-17 има значајну улогу у патогенези обољења јетре (142). Укључен је у мобилизацију, регрутовање и активацију инфламацијских ћелија (87). У инфекцији изазваној хепатитис В вирусом, IL-17 стимулише продукцију IL-8, који учествује у регрутовању неутрофила у јетру (143). Серумски ниво IL-17 је значајно повишен код пацијената кој болују од алкохолног хепатитиса, а Т лимфоцити који продукују IL-17, као и неутрофили, могу се наћи у инфламацијском инфилтрату јетре (142, 144). У оштећењу јетре, IL-17 се поставља као кључни регулатор оштећења које је изазвано неутрофилима (145). Изражена експресија IL-17 доводи до масивне некрозе хепатоцита, док блокирање IL-17 значајно смањује акутно оштећење хепатоцита (146).

У експерименталном моделу токсичног оштећења јетре, серумски ниво IL-17 и трансаминаза су повишени, док администрација неутралишућег анти-IL-17 антитела, снижава серумске вредности трансаминаза (147). Код особа оболелих од вирусног

хепатитса В и С, израженији Th17 одговор је сличан и удружен је са повишеном концентрацијом серумских трансминаза и појачаном активацијом моноцита (148, 149). У HBV инфекцији је показано да Th17 лимфоцити индукују активацију макрофага (преко CD86, CD83, B7H1, B7DC) и стимулишу продукцију проинфламацијских цитокина (IL-1 β , IL-6, TNF α , IL-23p19 и IL-12p35) који учествују у оштећењу хепатоцита (150). Постоје студије које говоре и о протективној улози овог цитокина у акутном хепатитису (151).

1.2.1.5. Дијагноза акутног хепатитиса

Дијагноза акутног и хроничног оштећења јетре се поставља на основу клиничке слике, тј присуства наведених симптома, повишених вредности трансминаза (АСТ и АЛТ) у серуму оболелих, повишених вредности ГГТ и билирубина. Неопходна је додатна дијагностика, у смислу радиолошке визуелизације јетре (применом ултразвука, компјутеризоване томографије или магнетне резонанце) а дефинитивна дијагноза се поставља биопсијом и патохистолошком верификацијом промена на јетри (1, 13, 152).

1.2.1.6. Терапија акутног хепатитиса

Иако је прогноза пацијената са акутним и хроничним оштећењем јетре донекле побољшана интензивном симптоматском терапијом (метаболичка и нутритивна потпора, симптоматском терапијом насталих компликација, применом екстракорпоралних направа у смислу биоартефицијалне јетре) или каузалном терапијом, када је познат узрочник, трансплантација јетре остаје једина куративна опција за ову популацију пацијената (1, 153, 154), међутим, овакав вид лечења има бројна ограничења, у смислу недовољног броја донора јетре, честих хируршких компликација током и након трансплантације, присутне имуносупресије (155).

Зато је неопходно испитати примену других терапијских опција у циљу лечења и превенције акутног оштећења јетре.

1.2.2 ФИБРОЗА ЈЕТРЕ

1.2.2.1. Дефиниција и етиологија

Фиброза јетре настаје као последица динамичких молекуларних, ћелијских и ткивних процеса, а прогредира до хроничне болести јетре или цирозе и терминалног губитка функције, развоја портне хипертензије или развоја хепатоцелуларног карцинома (156-158). Интеракција ових процеса одређује да ли ће фиброза јетре бити самоограничавајућа, или неконтролисана (159).

Након акутног оштећења јетре, чак иако је већи део овог органа оштећен, јетра поседује способност самообнављања масе и физиолошке архитектуре у кратком временском периоду (160-163). Насупрот томе, прогресивно хронично оштећење, услед понављаног оштећења ткива слаби регенеративне капацитете, одржава инфламацијски одговор и екцесивно стварање компоненти екстрацелуларног матрикса, трајно нарушавајући архитектонику и функцију јетре (157).

Настаје као одговор на различита паренхимска оштећења, иницирана инфламацијом (160). Фиброзу јетре може изазвати већи број етиолошких фактора: вирусне инфекције (хепатитис вирус Б и Ц), конзумирање алохола, метаболички поремећаји, токсини, стеатоза јетре и холестаза (161) (Табела 2).

1.2.2.2. Патогенеза фиброзе јетре

Као што је наведено, након акутног оштећења јетре, паренхимске ћелије се могу регенерисати и заменити некротичне или апоптотске ћелије, што је праћено развојем инфламацијског одговора и ограниченим депоновањем ЕЦМ, међутим, ако оштећење траје или се понавља, хепатоцити бивају замењени фиброзним ткивом, чија дистрибуција зависи од иницијалне ноксе која је изазвала оштећење. Тако, у хроничним вирусним хепатитисима и поремећајима која укључују холестазу, фиброзно ткиво се најпре формира око портних

простора, а код оштећења изазваног конзумирањем алкохола промене су у перичентралним и перисинусоидалним зонама (157, 162).

Фиброзу јетре карактеришу измене у квантитету (и до 6 пута више) и саставу компоненти ЕЦМ-а (колаген тип 1, 3, 4), фибронектин, еластин, протеоглигани, ламинин, што настаје као последица повећане синтезе и смањене деградације ових компоненти (163, 164).

Баланс између матрикс металопротеиназа (енг. *matrix metalloproteinases* (MMPs)) и њихових ткивних инхибитора (енг. *tissue inhibitors of metalloproteinase* (TIMPs)) је круцијална за хомеостазу ЕЦМ (165).

Фиброза се на основу хистолошкох карактеристика може поделити на 5 стадијума (Табела 2).

А: Компаративни патохистолошки систем скорирања инфламације јетре		
IASL (<i>International Association for Study of the Liver</i>)	Batts-Ludwig	Metavir
Минимални хронични хепатитис	Градус 1	A1
Благи хронични хепатитис	Градус 2	A1
Умерени хронични хепатитис	Градус 3	A2
Тешки хронични хепатитис	Градус 4	A3

Б: Компаративни патохистолошки систем скорирања фиброзе јетре			
СКОР	IASL (<i>International Association for Study of the Liver</i>)	Batts-Ludwig	Metavir
0	Фиброза није присутна	Фиброза није присутна	Фиброза није присутна
1	Блага фиброза	Иницијалне порталне фиброзне промене	Иницијалне перипорталне фиброзне промене

2	Умерена фиброза	Појединачни фиброзни мостови или септе	Перипорталне фиброзне септе (>1)
3	Тешка фиброза	Бројни фиброзни мостови или септе	Порталне/централне фиброзне септе
4	Цироза	Цироза	Цироза

Табела 2: А: Компаративни патохистолошки систем скорирања инфламације јетре; Б: Компаративни патохистолошки систем скорирања фиброзе јетре. Кориговано према: *Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB; American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. Hepatology. 2009;49:1335-74.*

1.2.2.3. Клиничка слика фиброзе јетре

Клиничку слику фиброзе јетре одређује природа и тежина иницијалног обољења које је изазвало фиброзу (166). Манифестације обољења имају широк спектар, од стања без симптома и знакова болести до терминалног оштећења јетре. И до 40% пацијената је асимптоматско, али фиброза јетре има прогресивни ток и када се развију асцит, крварења из варикса и енцефалопатија, бележи се 50% морталитета у петогодишњем праћењу (156, 167, 168).

Најчешћи симптоми су: мучнина, крварења (гастрезофагусни варикси), жутица, губитак апетита, повраћање, ментални поремећаји (услед развоја хепатичне енцефалопатије), изражени крвни судови (*Caput medusa* на предњем трбушном зиду) (163, 166).

Поред наведеног, бројне компликације прате фиброзу јетре, односно хронично оштећење јетре: портна хипертензија, асцит, кардиолошке манифестације, спленомегалија, хеморагијски синдроми, али и учестале инфекције, потхрањеност, хепатична енцефалопатија која може прогредирати до коме. Фиброза јетре, уколико се не третира може бити узрок хепатоцелуларног карцинома. Такође, може се јавити акутизација

симптома, тј акутно оштећење јетре на терену већ развијене фиброзе, које се карактерише акутном декомпензацијом постојећег обољења, праћеном отказивањем органа и високом стопом краткорочног морталитета, када 40-50% пацијената нема идентификован узрок, док је код осталих најчешће узрок: релапс вирусног хепатитиса, сепса, алкохол (166, 169).

1.2.2.4. Ћелије у фибрози јетре

Развој хроничне инфламације и фиброзе јетре представља баланс између ткивних макрофага, ефекторских ћелија урођене и стечене имуности и локалних фибробласта (170).

Купферове ћелије јетре чине 15% ћелијске популације у јетри и имају најзначајнију улогу у обезбеђивању антиинфламацијске средине и имунолошке толеранције у јетри (171).

У зависности од стимулуса који је активирао макрофаге, диферентују у класично (M1) или алтернативно активирани макрофаге (M2). Активирани M1 макрофаги експримирају антигене у склопу МНС молекула II класе и ослобађају проинфламаторне цитокине, тј у одговору на иницијални стимулус, M1 макрофаги промовишу инфламацију и на крају, развој фиброзе. M2 макрофаги се регрутују из циркулације и стимулишу активацију HSCs (170). Активирани бактеријским продукцима, Купферове ћелије продукују проинфламаторне цитоине и профиброгене медијаторе: трансформишући фактор раста $\beta 1$ (енг. *transforming growth factor TGF- $\beta 1$*), фактор раста сличан инсулину (енг. *insulin-like growth factor, IGF*) или фактор раста тромбоцита (енг. *platelet-derived growth factor, PDGF*) који промовишу експресију гена у фибробластима за иницијацију ремоделовања ЕЦМ (170-172). Показано је да деплеција Купферових ћелија смањује хистолошке карактеристике фиброзе у експерименталном моделу фиброзе јетре индукованој CCl₄ (173).

NK ћелије се налазе у јетри у великом броју (174) и експримирају различите TLRs, који учествују у фибрози јетре (170). Активацијом TLR3 и продукцијом IFN- γ , инхибишу фиброзу јетре и елиминишу активирани HSCs (енг. *hepatic stellate cells, HSCs*) (175, 176). Деплеција NK ћелија доприноси развоју фиброзе јетре (176, 177).

NKT ћелије се налазе у здравом ткиву јетре и њихов број се повећава у инфламацији и присутној некрози хепатоцита, док је код хроничних вирусних хепатитиса показано да NKT

ћелије секретују Th2 инфламацијске цитокине (IL-4 и IL-13) који поспешују развој фиброзе (178). NKT ћелије, продукцијом цитокина, стимулишу развој фиброзе јетре (170). У експерименталном моделу фиброзе јетре, индукованом CCl₄, показано је да деплеција NKT ћелија има протективну улогу (179) а у хуманој популацији је повећан број интрахепатичних NKT ћелија у односу на периферне (170).

1.2.2.4.1. CD4⁺ Т лимфоцити у фибрози јетре

CD4⁺ Т *helper* лимфоцити играју значајну улогу у антимикробном одговору, хепатоцелуларном оштећењу и развоју аутоимунских болести јетре (180, 181). У зависности од врсте антигена који је довео до активације, активираће се један од следећих субсетова CD4⁺ Т *helper* лимфоцита (182): Th1, Th2, Th17 или Treg лимфоцити.

Th1 субсет се карактерише продукцијом инфламацијског IFN- γ , који је неопходан за активацију макрофага и одбрану од интрацелуларних микроорганизама, а такође учествује у ћелијски посредованим аутоимунским болестима. Th2 лимфоцити продукују IL-4, IL-5 и IL-13, имају улогу у алергијама и одговору на паразитарне инфекције и друге екстрацелуларне патогене (183-185).

Регулаторни Т лимфоцити (Treg) су заслужени за контролу одговора Т лимфоцита тј супримирају функционалне имунске реакције Т лимфоцита, продукцијом IL-10 и TGF- β (186). Карактеришу се експресионим факторима Foxp3 и STAT5, као и површинском експресијом CD25 (187).

Показано је да Treg и Th17 субсетови имају супротну улогу у имунским одговорима и да баланс између ова два субсета може бити веома значајан за хомеостазу, тј да поремећај односа Treg и Th17 може довести до развоја хроничне инфламације (188).

Th17 субсет лимфоцита се разликује од Th1 и Th2 субсетова по развоју и функцији (182). За диференцијацију је неопходна комбинована акција TGF- β , IL-6 и IL-21 код мишева, односно IL-23 или IL-1 β код људи. Наведени цитокини индукују експресију ROR γ t код мишева, односно ROR γ c у хуманој популацији. (189, 190).

Активирани Th17 лимфоцити продукују IL-17A, IL-17F, IL-21 и IL-22 и TNF- α , промовишући инфламацију ткива индукцијом других проинфламацијских медијатора и регрутовањем леукоцита на место инфламације (182, 191).

Обзиром да је јетра извор TGF- β и IL-6, може се објаснити поларизација ка Th17 субсету (189), а поред тога на свим ћелијама јетре (укључујући хепатоците, Купферове ћелије, HSCs, синусоидалне ендотелне ћелије) се могу наћи рецептори за IL-17 (142).

1.2.2.4.2. Стелатне ћелије јетре

Стелатне ћелије јетре (енг. *hepatic stellate cells*, HSCs) се још називају и Ито ћелије или перисинусоидалне ћелије а налазе се у Disse-овим просторима у нормалној јетри и главна улога им је депоновање ретиноида (170).

Услед хроничног оштећења, HSCs се активирају и диферентују у ћелије миофибробластног облика, које поседују са израженим пролиферативним потенцијалом, које се акумулирају на месту оштећења и промовишу акумулацију ЕЦМ-а (192-194). Након вишеструких оштећења или пролонгираног излагања цитокинима, као што су PDGF, TGF- β , IL-1, TNF- α , стелатне ћелије се активирају, што представља критичан корак у иницијацији и прогресији фиброзе јетре (170, 194). PDGF је најдоминантнији митоген за активирание HSCs. Повећана синтеза mRNA колагена повећава продукцију колагена у HSCs (195).

Док су у стању мировања, HSCs експримирају маркере карактеристичне за адипоците (PPAR γ , SREBP-1c, и лептин), а активирание HSCs експримирају следеће маркере: глаткомишићни α актин (енг. *α smooth muscle actin*, α -SMA), *c-myc*, и MEF-2 (енг. *myocyte enhancer factor-2*) (157).

У развоју фиброзе, ћелије имунског система играју значајну улогу, било да промовишу оштећење јетре или механизме репарације (157). Инфламацијске ћелије стимулишу активирание HSCs да синтетишу колаген, а активирание HSCs секретују инфламацијске цитокине, експримирају адхезионе молекуле и утичу на активацију лимфоцита, стварајући зачаран круг (196-198). Показано је да и сами хепатоцити могу директно активирати HSCs не само продукцијом проинфламацијских и профиброгенних цитокина (199-201).

Активација HSCs се карактерише пролиферацијом и миграцијом ћелија, синтезом и депонувањем колагена, секрецијом хемотаксних и вазоактивних фактора и секретовањем матрикс металопротеиназа (ММП) и ткивних инхибитора металопротеиназа (202). Све наведене динамичке измене фаворизују развој и прогресију фиброзе.

1.2.2.5. Цитокини у фибрози јетре

Улога цитокина је предмет многих истраживања *in vivo* и *in vitro*, због регулације инфламацијског одговора у развоју фиброзе јетре (203). Најзначајнији цитокини који се продукују у јетри су: TGF- β , TNF- α , IL-6 и IL-10. Продукују их резидентни макрофаги, а измене у цитокинском профилу су доказане у бројним хроничним обољењима јетре (198).

У серуму оболелих од акутне и хроничне болести јетре, повишена је концентрација IL-6 (204), који се преко gp80/ gp130 сигналних молекула везује директно за хепатоците (205). Такође, повећана експресија IL-6 у серуму је у директној корелацији са прогресијом хроничног обољења јетре (206).

Мишеви дефицијентни за IL-6 показују израженије оштећење хепатоцита након апликације CCl₄, што резултује израженијим развојем фиброзе јетре (132). Показано је да системска апликација IL-6, након интрахепатичне апликације MSCs редукује оштећење хепатоцита и успорава развој фиброзе јетре (207).

Улога IL-12 у фибрози јетре је показана у експерименталним анималним моделима бактеријских и паразитарних инфекција (208). Повећана продукција IL-12 активира цитотоксичке Т лимфоците који елиминишу заражене хепатоците (208).

IL-13 је удружен са прогресијом фиброзе јетре и индукује продукцију гена за колаген, TGF- β и друге профиброгене гене у HSCs (209, 210), док блокада IL-13 у већ развијеној фибрози јетре указује на терапијски потенцијал овог Th2 цитокина.

IL-10 је један од најзначајнијих антиинфламацијских цитокина у јетри, који има хепатопротективну улогу (211), а продукују га бројне ћелијске популације: Т и В

лимфоцити, моноцити, хепатоцити, Купферове ћелије, HSCs и синусоидалне ендотелне ћелије (212).

Мишеви дефицијентни за IL-10, у експерименталном моделу фиброзе јетре изазваној CCl₄, показују израженију фиброзу јетре, са већим формирањем инфламаторних инфилтрата (213), јер HSCs експримирају рецептор за IL-10 (IL-10R) и саме га продукују у стању мировања (214, 215).

Поред наведених механизма у редукцији фиброзе јетре, IL-10 и директно смањује продукцију колагена и секрецију TGF- β (215, 216).

TGF- β представља кључни медијатор у развоју фиброзе код људи (216). Стимулише активацију HSCs, синтезу протеина екстрацелуларног матрикса и инхибише њихову деградацију. Блокирање синтезе TGF- β или блокирање сигналног пута TGF- β значајно редукује фиброзу јетре у експерименталним моделима (217).

1.2.2.5.1. IL-17 у фибрози јетре

IL-17 има значајну улогу у патогенези јетре (142). Изражена експресија IL-17 доводи до масивне некрозе хепатоцита, док блокирање IL-17 смањује акутно оштећење хепатоцита (146). У јетри, поред CD4⁺ Т лимфоцита, IL-17 продукују и Купферове ћелије (218).

Кокултура CD4⁺ Т лимфоцита са непаренхимским ћелијама јетре индукује продукцију IL-17, указујући да интрахепатична микросредина погодује поларизацији CD4⁺ Т лимфоцита ка Th17 субсету. *Knock out* мишеви за IL-2R α спонтано развијају оштећење јетре које подсећа на примарну билијарну цирозу код људи, и код њих се у серуму региструје повишена концентрација IL-17 у серуму (219), што је у складу са сазнањем да експресија IL-2 негативно утиче на Th17 диференцијацију (220).

Током хроничне инфламације јетре, IL-17 продукују Th17 лимфоцити у јетри, који су у повећаном броју присутни у јетрама пацијената који болују од фиброзе јетре (5), где стимулишу HSCs, активацијом STAT3, да повећају продукцију *Collagen-1*, α SMA и TGF- β 1 и промовишу фиброзу јетре (218, 220-222)

Наиме, серумски ниво IL-17 је значајно повишен код пацијената кој болују од алкохолног хепатитиса, а Т лимфоцити који продукују IL-17, као и неутрофили, могу се наћи у инфламацијском инфилтрату јетре (5). У оштећењу јетре, IL-17 се поставља као кључни регулатор оштећења које је изазвано неутрофилима (145).

Индукција Th17 субсета је запажена и код експерименталног модела неалкохолне стеатозе јетре, где се у серуму мишева региструје повишена концентрација IL-17 и значајно увећан број Th17 у јетри (223).

У анималном моделу карциногенезе јетре, индукованој трансплантацијом *Hepa1-6* ћелија, показана је улога IL-17, јер *knock out* мишеви за показују смањен раст тумора, праћен повећаним бројем цитотоксичких Т лимфоцита (224).

1.2.2.6. Дијагноза фиброзе јетре

Рана фиброза јетре је обично асимптоматска (225). Иако биопсија јетре представља метод избора за постављање дијагнозе, она има већи број ограничења: инвазивна је метода, репрезентативност узорка може бити доведена у питање, обзиром да фиброза не захвата целокупну површину јетре (226-227). Патохистолошка дијагноза може потврдити и стадијум фиброзе јетре (Табела 2, према различитим утврђеним системима скорирања) (228, 229).

На основу процента уступљености колагена на исечку (енг. collagen proportional area (CPA)), може се квантификовати фиброза (230).

Имунохистохемијском методом, може се анализирати присуство маркера као што су: цитокератин-7 (маркер дукталне пролиферације), α -SMA као маркер активације HSCs, или CD34 као маркер LSEC капиларизације, обезбеђујући функционалну информацију о насталој фибрози (231).

У лабораторијским анализама, могу се мерити MMP, субтипови колагена, хијалуронска киселина и други маркери (232, 233). Индиректни показатељи оштећења јетре се односе на број тромбоцита, који рефлектује појаву спленомегалије као последице портне

хипертензије, АСТ и АЛТ као маркере инфламације јетре, цитокератин-18 као маркер апоптозе хепатоцита и ИНР (енг. *international normalized ratio*) као индикатор малфункције хепатоцита (234, 235).

Комбинација наведених параметара даје прецизнију дијагнозу хроничног оштећења јетре.

Радиолошке визуелизационе технике (ултразвук абдомена, магнетна резонаца, компјутеризована томографија) имају значајно место у дијагнози и праћењу фиброзе јетре (236).

Транзијентна еластографија (ТЕ, *Fibroscan*) мери ригидитет јетре и добијени резултат је у блиској корелацији са стадијумом фиброзе јетре. Док МР еластографија даје прецизније резултате и на тумачење ових резултата не утиче гојазност или присуство асцита (237-238).

1.2.2.7. Терапија фиброзе јетре

Не постоји, до сада, стандардизована терапија фиброзе јетре. Иако бројне експерименталне студије показују таргет молекуле у фибрози јетре код мишева, ефикасност ових молекула није доказана у хуманој популацији (239).

Терапија се базира на симптоматској потпори (примена антиоксиданаса код алкохолног хепатитиса, кортикостероида код аутоимунског и алкохолног хепатитиса), а уклањање узрока и даље представља најефикаснији третман фиброзе јетре. Код пацијената са развијеним компликацијама фиброзе јетре и цирозом, трансплантација и даље остаје једина терапијска мера која продужава преживљавање и побољшава квалитет живота (166, 239).

1.3. МЕЗЕНХИМАЛНЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ

1.3.1. Карактеристике мезенхималних матичних ћелија и улога у имунском одговору

Мезенхималне матичне ћелије (енг. *Mesenchymal stem cells*, MSCs) су адултне матичне ћелије које се могу наћи у свим постнаталним органима, укључујући и јетру (240).

Карактеришу се брзом пролиферацијом, дугорочним одржавањем могућности диференцијације (241).

MSCs експримирају велики опсег површинских антигена, а чија експресија зависи од ткива из ког су добијене. Међународно друштво за ћелијску терапију је дефинисало критеријуме за карактеризацију MSCs: мултипотентност, адхерентност за пластику, експресија маркера: CD105, CD73, CD90 и одсуство хематопоетских маркера: CD45, CD34, CD14, CD31, CD79 α и МНС молекула II класе (242).

MSCs се карактеришу брзом миграцијом у оштећена ткива (243) и способношћу да утичу на имунски одговор, тј да регулишу пролиферацију, активацију и ефекторске функције свих ћелија имунског система, укључујући Т лимфоците, дендритске ћелије, макрофаге, В лимфоците и NK ћелије (244, 245).

На месту инфламације, проинфламацијски цитокини IL-1, IFN- γ TNF- α индукују експресију адхезивних молекула који учествују у миграцији MSCs у оштећено ткиво (244), интеракцијом CXCL12 хемокина и CXCR4 рецептора, експримираног на површини MSCs. Ефекат у модулацији имунског одговора остварују директно, или продукцијом солубилих медијатора (TGF- β , HGF, PGE₂, IDO, индуцибилна азот оксид синтаза (енг. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS), IL-10, IL-6, леукемијски инхибиторни фактор (енг. *leukemia inhibitory factor*, LIF), хумани леукоцитарни антиген G (енг. *human leukocyte antigen-G*, HLA-G) и хем оксигеназа 1 (енг. *heme oxygenase 1*, HO-1) (244, 245).

У зависности од микросредине у којој се одиграла инфламација, MSCs супримирају или промовишу инфламацију (244).

У раним фазама запаљења, у присуству ниских концентрација проинфламацијских цитокина (TNF- α , IFN- γ и IL-1 β) стичу проинфламацијски фенотип (246), симулишући одговор Т лимфоцита, редукују апоптозу неутрофила, промовишу фагоцитозу (247, 248).

Током касне фазе имунског одговора (када су присутне високе концентрације TNF- α и IFN- γ), у макрофагима и моноцитима индукују експресију IL-10, који поседује антиинфламацијску улогу (249) и развијају имуносупресивну улогу на ефекторске ћелије имунског система (248, 250), утичући на успостављање хомеостазе.

MSCs утичу на функције CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита директним контактом и паракриним механизмима. Директни утицај је последица контакта између инхибиторног PD-1 молекула (енг. *programmed death 1*) са његовим лигандима (PD-L1 и PD-L2) на Т лимфоцитима (245), а обзиром да не експримирају ко-стимулаторне молекуле CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2), MSCs изазивају анергију Т лимфоцита (243, 250).

Поред директног контакта, MSCs могу утицати на имунски одговор продукцијом солубилних фактора (IDO, iNOS, HLA-G5, PGE2, TGF- β , IL-10), (251-254)

Најзначајнији солубилни фактори, у супресији Т лимфоцита су: IDO и iNOS (255).

IDO метаболише триптофан до кинуренина и токсичних метаболита (хинолна киселина и 3-хидрокси антранилина киселина), који супримирају пролиферацију и индукују апоптозу активираних Т лимфоцита.

Ензим iNOS из L-аргинина синтетише NO, сигнални молекул, који инхибира фосфорилацију STAT5 сигналног молекула (енг. *signal transducer and activator of transcription-5*) у Т лимфоцитима, прекидајући њихов ћелијски циклус (256-258).

У условима инфламације који фаворизују развој Th1 и Th2 субсетова лимфоцита, индоламин 2, 3 деоксигеназа (енг. *indoleamine 2,3-dioxygenase*, IDO) има најзначајнију улогу у имуномодулацији ћелија имунског система, и док мишије MSCs имају значајно нижу активност IDO, те обично за имуномодулацију користе индуцибилну синтетазу азот монооксида (енг. *inducible nitric oxide synthase*, iNOS). У условима активације Th17 лимфоцита, мишије MSC не продукују iNOS, већ своје имуномодулацијске ефекте остварују посредством других медијатора, као што је IDO (255, 258, 260).

MSCs супримирају пролиферацију и цитотоксички потенцијал NK ћелија и њихову продукцију IFN- γ (260, 261).

Показано је да MSCs инхибирају експанзију NKT ћелија, директно и продукцијом солубилних фактора (262) и путем продукције iNOS и IDO смањују њихову хепатотоксичност (263).

1.3.2. Улога MSCs у акутном хепатитису и фибрози јетре

Због способности да диферентују у хепатоците, тестирају се у многим претклиничким и клиничким студијама, као терапијска мера у лечењу акутног и хроничног оштећења јетре (264, 265).

Резултати експерименталних студија показују да солубилни молекули MSCs, који се налазе у кондиционираном медијуму смањују апоптозу хепатоцита и подстичу њихову пролиферацију (266) па могу представљати терапијски агенс у оштећењу јетре, као замена за трансплантацију MSCs (266, 267), обзиром да MSCs мигрирају у оштећени орган, где поред индиректног, наведеног дејства имају и директно, имуносупресивно дејство на ћелије имунског система.

У Cop-A моделу акутног оштећења јетре, примена MSCs смањује серумске вредности трансaminaза и патохистолошке параметре оштећења јетре, праћено смањењем продукције проинфламацијских цитокина (233, 268, 269) и повећава експресију хепатопротективног IL-10 (270).

У моделу акутног оштећења јетре изазваном угљен тетрахлоридом (CCl₄), MSC-СМ смањује апоптозу ћелија јетре посредством IL-6 и FGL-1 (енг. *fibroblast like protein-1*) (267). Показано је да MSCs могу смањити хронично оштећење, односно фиброзу јетре, због могућности диференцијације у хепатоците, имуномодулативних и антифиброгенних карактеристика (271).

Продукцијом наведених солубилних фактора, стимулишу пролиферацију регулаторних Т лимфоцита, супримирају пролиферацију ефектроских Т лимфоцита инхибирају матурацију дендритских ћелија и смањују цитотоксичност НК ћелија (272-278).

MSCs експримирају факторе раста (HGF (енг. *hepatocyte growth factor*), VEGF(енг. *vascular endothelial growth factor*)), цитокине и хемокине, који редукују инфламацију јетре, апоптозу и фиброзу, и стимулишу ангиогенезу и регенерацију ткива јетре (279).

Улога MSCs је показана у различитим анималним моделима фиброзе срца, јетре, бубрега, плућа (280).

MSCs редукују пролиферацију HSCs и синтезу колагена, директним контактом или продукцијом солубилних медијатора (IL-10, HGF, TGF- β и TNF- α), док HGF и NGF (енг.

nerve growth factor) промовишу апоптозу HSCs (281, 282). MSCs регулишу експресију MMPs и TIMPs. (282-284).

И поред наведених сазнања, јш увек није познато да ли примена MSCs редукује акутни хепатитис и фиброзу јетре, дејством на IL-17 сигнални пут.

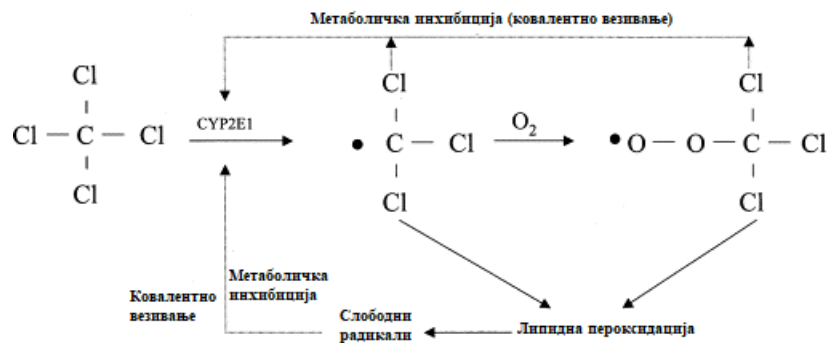
1.4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ АКУТНОГ ХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ

1.4.1. Акутни хепатитис индукован CCl₄

Експериментални модели акутног хепатитиса се могу, у зависности од механизма којим се изазива оштећење јетре, могу поделити на: хируршке моделе (где се убраја парцијална и тотална хепатектомија, ресекција/лигација, парцијална и тотална деваскуларизација (285-287) и фармаколошки модели у којима се користи већи број хепатотоксина (*d-Galactosamine*, *acetaminophen* (АРАР), *thioacetamide* (ТАА), *Concavalin A* (Con A), *carbon tetra chloride* (CCl₄), *lypopolysaccharde* (LPS), *α-galactosylceramide* (α-GalCer) (288-292).

Најчешће коришћени експериментални модели акутног хепатитиса су они у којима се инфламација изазива хемијски, јер се болест лако индукује, сам модел кратко траје, што погодује једноставној контроли процеса (293).

Хепатотоксични ефекат угљен тетра хлорида (CCl₄) је дуго познат и често је коришћени експериментални модел акутног хепатитиса (*Hubner et al.* 1965.).



Слика 1: Механизам настанка слободних радикала у метаболисању CCl₄.

CCl₄ се метаболише (редуктивном дехалогенацијом) преко P450 цитохрома, ензима 2E1, продукујући активне метаболите (294): CCl₃, CHCl₂ и CCl₃-OO (295) (Слика 1).

** CCl₄ оштећује хепатоците ковалентним везивањем прелазних реактивних једињења за ћелијске компоненте или појачаном липидном пероксидацијом, коју изазива везивање ових радикала са кисеоником и разградњом незасићених масних киселина (292).

Описање промене прати развој претходно описаног инфламацијског инфилтрата, у коме доминирају неутрофили, у одговору на оштећење ћелијских компоненти хепатоцита (294).

Акутни хепатитис изазван CCl₄ се индукује једнократном интраперитонеалном апликацијом угљен тетра хлорида који је растворен у кукурузном уљу у односу 1:1 и дози 2 μL/g телесне масе (296).

1.4.2. Фиброза јетре изазвана CCl₄

CCl₄ се користи и у експерименталном моделу фиброзе јетре (297). Понављане дозе CCl₄ оштећују претходно некротично, односно делимично регенерисано ткиво јетре, активирајући HSCs, узрокујући дисбаланс између продукције и деградације ЕЦМ и развоја прогресивне фиброзе јетре (297). Активација стелатних ћелија јетре и последични развој фиброзе је претходно описан.

Фиброза јетре је изазвана интраперитонеалном апликацијом раствора CCl₄/corn oil у односу 1:3 и дози 1μL/g, телесне масе, два пута недељно у трајању од месец дана (222).

1.4.3. Акутни хепатитис индукован α-GalCer-ом

У циљу идентификације новог антитуморског агенса, из морског сунђера *Agelas mauritianus* изолован је α-галактоцерамид (α-GalCer), гликолипидни аналог агеласфина (комерцијално KRN7000) (298). α-GalCer је изграђен од α-галактозе, фитосфингозина и ацилног ланца (Слика 2). α-GalCer представља антиген за CD1d -реактивне NKT ћелије миша и човека (298). Применом α-Галактозилцерамида (енг α-galactosylceramide, α-GalCer) може се индуковати специфична активација НКТ ћелија, јер га приказује CD1d, и последично

акутно оштећење хепатоцита (298, 299), тако да етиопатогенетски механизам оштећења јетре индуковано α -GalCer-ом представља адекватан експериментални модел за проучавање интеракције MSCs и NKT ћелија *in vivo*.

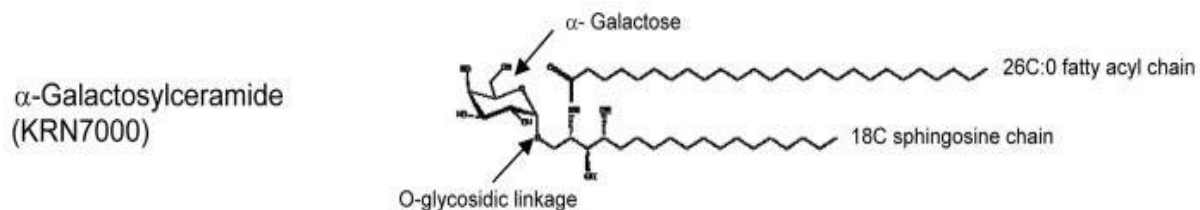
Једнократна апликација α -GalCer-а доводи до накупљања NKT ћелија у јетри, повећањем експресије хемокинског рецептора CXCR6 на NKT ћелијама и његовог лиганда, хемокина CXCL16, на синусоидалним ендотелним ћелијама. LFA-1 и ICAM-1 (на ендотелу) поспешују миграцију NKT ћелија у јетру (300).

DCs преузимају овај молекул из циркулације и презентују га у склопу CD1d молекула NKT ћелијама. α -GalCer стимулише продукцију IL-12 и експресију CD40 на DCs, односно CD40L на NKT ћелијама (299), што за последицу има активацију NKT ћелија и сазревање дендритских ћелија (299).

Активирани NKT ћелије синтетишу велики број цитокина: Th1 (IFN- γ и TNF- α), Th2 (IL-4, IL-5 и IL-13) и Th17 (IL-17) цитокине (301), који даље стимулишу развој урођеног и стеченог имунског одговора и развој оштећења јетре (302).

IFN- γ кога продукују NKT ћелије активира STAT1 (енг. *signal transducer and activator of transcription 1*) молекул у хепатоцитима, непаренхимским ћелијама јетре и ћелијама имунског система које се активирају што резултира развојем акутног хепатитиса (303).

TNF- α индукује оштећење хепатоцита директним цитотоксичким механизмом као и индукцијом експресије FasL на NKT ћелијама (23). IL-4/STAT6 сигнални пут стимулише експресију мијелопероксидазе и инхибира апоптозу неутрофила у јетри (303).



Слика 2. Хемијска структура α -галактоцерамида.

У експерименталном моделу, акутног хепатитиса, једнократно се апликује α -GalCer у дози 50 μ g/kg ТТ, растворен у 200 μ L 0.9% NaCl. α -GalCer је претходно растворен у 5.6% сукрози, 0.75% L-хистидину и 0.5% Tween-20, до финалне концентрације 500 μ M и загрејан на 60-80°C (263).

2. ЦИЉ РАДА

Основни циљ овог истраживања је да се испита, да ли примена MSCs утиче на модулацију сигналног пута IL-17, у патогенези акутног оштећења јетре, као и фиброзе јетре.

У складу са основним циљем, постављени су и следећи експериментални задаци:

1. Утврдити да ли примена MSCs утиче на сигнални пут IL-17 у акутном хепатитису и фибрози јетре.
2. Утврдити молекулске механизме којим MSCs утичу на сигнални пут IL-17 у акутном хепатитису и фибрози јетре.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Ћелијска линија мишијих мезенхималних матичних ћелија

У експериментима је коришћена комерцијална линија мишијих мезенхималних матичних ћелија, које су изоловане из костне срже C57Bl/6 мишева (*Gibco/Invitrogen*, кат. број S10502-01). MSCs су култивисане у DMEM медијуму (енг. *Dulbecco`s Modified Eagles Medium*) у који је додато: 10% феталног телећег серума (енг. *Fetal Bovine Serum*, FBS), 1 mmol/l пеницилин/стрептомицина, 1 mmol/l неесенцијалних аминокиселина (*Sigma-Aldrich*, Munich, Germany) и 2 mmol/l L-глутаминa. Ћелије су узгајане у асептичним условима на температури од 37°C, у инкубатору и у присуству 5% CO₂, а у складу са препорукама произвођача (*Gibco/Invitrogen*). У експериментима су коришћене ћелије у шестој пасажи.

Пре извођења експеримената, наведене ћелије су одвајане са дна флашка (при ~80% конфлуентности) раствором 0,25% трипсина и 0,02% EDTA (енг. *ethylenediaminetetraacetic acid*) (PAA Laboratories GmbH) раствореног у PBS-у (енг. *Phosphate Buffered Salline*, PAA Laboratories GmbH) у трајању 2 минута. Ради неутрализације даљег дејства трипсина, ћелије су прво ресуспендоване у 6 ml DMEM-а који садржи 10% FBS-а и центрифугиране на 300 g у трајању од 5 минута. Након одливања супернатанта, ћелије су испиране два пута у чистом DMEM-у. Применом *Trypan-blue*-а, одређивана је вијабилност ћелија, односно, ћелијска суспензија која садржи преко 95% вијабилних ћелија је потом коришћена у експериментима.

3.2. Ћелијска линија хуманог карцинома јетре (HepG2)

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

3.3. Кондиционирани медијум мезенхималних матичних ћелија (MSC-CM)

Мезенхималне матичне ћелије су засејане у густини од 10 000 ћелија/cm² у посудама за културу ћелија - T₇₅ фласковима (BD Falcon). У циљу добијања кондиционираниог медијума мезенхималних матичних ћелија (енг. *MSC-conditioned medium*, MSC-CM), MSCs су првобитно култивисане у комплетном DMEM медијуму који садржи серум, у асептичним условима, и инкубиране на 37°C у атмосфери са 5% CO₂. При конфлуентности од 80%, ћелије су два пута испране PBS (енг. *Phosphate Buffered Saline*, Invitrogen), након чега су култивисане у медијуму без серума. Након 48 сати, узет је медијум - "MCS-кондиционирани медијум" (MCS-CM), центрифугиран на 13,000×g, на температури од 4°C, 10 минута и залеђен на -80°C до употребе (304).

3.4. Фармаколошка инхибиција индоламин 2,3 деоксигеназе (IDO)

Да би испитали да ли је IDO (енг. *indoleamine 2,3-dioxygenase*) један од медијатора којим MSCs супримирају акутни хепатитис и фиброзу јетре, употребљен је фармаколошки инхибитор IDO-а, 1-метил DL триптофан (1-MT, 860646, *Sigma-Aldrich, St-Louis, MO*). 1-MT садржи два стереоизомера, *levo*-1-метил триптофана, који компетитивно инхибира IDO1 и *dextro*-1-метил триптофана који компетитивно инхибира IDO2. Пре употребе, 1-MT је растворен у 0.1 N NaOH а рН је коригована применом хлороводоничне киселине (HCl) до 7.5.

Мезенхималне матичне ћелије су култивисане 48 сати у медијуму који садржи 1 mM 1-метилтриптофана (305, 306). Експерименталне животиње које су примиле CCl₄/corn oil и CCl₄/corn oil + MSCs су континуирано третиране 1-MT (2 mg/mL у води за пиће), у циљу *in vivo* инхибиције активности IDO (307).

3.5. Експерименталне животиње

In vivo експерименти су спроведени у складу са одредбама Етичког комитета Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за употребу животиња у експериментима. Коришћени су мишеви чистог соја C57Bl/6 (енг. *wild type*, WT), мушког пола, старости од 8 до 10 недеља, водећи рачуна да старост и телесна маса мишева буду слични између експерименталних група, Одељења за узгој лабораторијских и експерименталних животиња, Војномедицинске академије (ВМА). Мишеви су одгајани у виваријуму Центра за молекулску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета медицинских наука у Крагујевцу. Током трајања експеримената, све животиње су имале слободан приступ храни и води.

Етичка комисија за експерименталне животиње Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу је одобрила спроведене експерименте је (одлука број 01-6142 од 16.05.2017. године).

У експерименту је искоришћено укупно 360 животиња, које су распоређене у следеће експерименталне (Е) и контролне (К) групе:

- Е1: 25 мишева који су интраперитонеално примили раствор $\text{CCl}_4/\text{corn oil}$ у односу 1:1 (2 $\mu\text{L}/\text{g}$ телесне масе).
- Е2: 25 мишева који су интраперитонеално примили раствор $\text{CCl}_4/\text{corn oil}$ у односу 1:1 (2 $\mu\text{L}/\text{g}$ телесне масе) и интравенски 500 000 MSCs ресуспендованих у 200 μL NaCl-а.
- Е3: 25 мишева који су интраперитонеално примили $\alpha\text{-GalCer}$ (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ телесне масе) раствореног у 200 μL NaCl-а.
- Е4: 25 мишева који су, непосредно након примене $\alpha\text{-GalCer}$ (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ телесне масе) раствореног у 200 μL NaCl-а, интравенски примили 500 000 MSCs ресуспендованих у 200 μL NaCl-а.
- Е5: 25 мишева који су интраперитонеално примили раствор $\text{CCl}_4/\text{corn oil}$ у односу 1:3 (1 $\mu\text{L}/\text{g}$ телесне масе).

- E6: 25 мишева који су интраперитонеално примили раствор $CCl_4/corn\ oil$, однос 1:3 (1 $\mu L/g$ телесне масе) и интравенски 1×10^6 MSCs ресуспендованих у 200 μL NaCl-а.
- E7: 25 мишева који су интраперитонеално примили раствор $CCl_4/corn\ oil$, однос 1:3 (1 $\mu L/g$ телесне масе) и интравенски 1×10^6 STO ћелија ресуспендованих у 200 μL NaCl-а.
- E8: 25 мишева који су интраперитонеално примили раствор $CCl_4/corn\ oil$, однос 1:3 (1 $\mu L/g$ телесне масе) и перорално уносили 1-МТ и интравенски примили 1×10^6 MSCs ресуспендованих у 200 μL NaCl-а.
- E9: 25 мишева који су интраперитонеално примили раствор $CCl_4/corn\ oil$, однос 1:3 (1 $\mu L/g$ телесне масе) и перорално уносили 1-МТ.
- E10: 25 мишева који су интраперитонеално примили раствор $CCl_4/corn\ oil$, однос 1:3 (1 $\mu L/g$ телесне масе) и интравенски 1×10^6 флуоресцентно обележених MSCs ресуспендованих у 200 μL NaCl-а
- K1: 20 мишева који су интраперитонеално примили кукурузно уље (енг. *corn oil*) (1 mg/kg телесне масе).
- K2: 18 мишева који су интраперитонеално примили *corn oil* (1 mg/kg телесне масе) и интравенски 500 000 MSCs ресуспендованих у 200 μL NaCl-а.
- K3: 18 мишева који су интраперитонеално примили 200 μL NaCl-а.
- K4: 18 мишева који су интраперитонеално примили 500 000 MSCs ресуспендованих у 200 μL NaCl-а.
- K5: 18 мишева који су интраперитонеално примили *corn oil* (1 mg/kg телесне масе) и интравенски примили 1×10^6 MSCs ресуспендованих у 200 μL NaCl-а.
- K6: 18 мишева који чине контролну групу здравих мишева.

3.6. Индукција акутног хепатитиса и апликација MSCs

Мишевима, који су претходно насумично сврстани у експерименталне групе, акутни хепатитис је изазван једнократном, интраперитонеалном, апликацијом угљен тетра хлорида који је растворен у кукурузном уљу ($\text{CCl}_4/\text{corn oil}$) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*).

CCl_4 узрокује акутно оштећење јетре, путем метаболичке активације краткоживећих реактивних метаболита (291), који се ковалентно везују за ћелијске компоненте или појачавају липидну пероксидацију посебно несатурисаних фосфолипида, што оштећује интра- и екстрацелуларне мембране, узрокујући тако тешку некрозу хепатоцита, која по својим карактеристикама одговара акутном хепатитису код људи (308).

Раствор $\text{CCl}_4/\text{corn oil}$ је, у овим експерименталним групама, апликован у односу 1:1 и дози 2 $\mu\text{L/g}$ телесне масе (6).

За разлику од раствора $\text{CCl}_4/\text{corn oil}$, који на описан начин узрокује акутни хепатитис, $\alpha\text{-GalCer}$ индукује изражену и специфичну активацију NKT ћелија (309), због чега оштећење јетре индуковано $\alpha\text{-GalCer}$ -ом представља адекватан експериментални модел за проучавање интеракције MSCs и NKT ћелија у акутном хепатитису *in vivo*. $\alpha\text{-GalCer}$ (кат. број 67576, *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) је растворен у 0.75% L-хистидину, 0.5% Tween-20 и 5.6% сукрози, до концентрације 500 μM , угрејан на температури од 60-80°C у трајању од неколико минута. У овој експерименталној групи, мишеви су интравенски примили $\alpha\text{-GalCer}$ у дози 50 $\mu\text{g/kg}$ ТТ, растворен у 200 μL 0.9% NaCl (204).

Непосредно након апликације раствора $\text{CCl}_4/\text{corn oil}$ односно $\alpha\text{-GalCer}$ -а, експерименталним групама мишева је интравенски апликовано 500 000 (5×10^5) MSCs ресуспендованих у 200 ml 0.9% NaCl, у једној дози, путем латералне репне вене.

Контролна група животиња је примила 200 μl NaCl-а, након индукције акутног хепатитиса.

3.7. Индукција фибозе јетре и апликација MSCs

Хепатоцити метаболишу CCl_4 до токсичних метаболита који поседују цитотоксичке ефекте и утичу на развој центрилобуларне некрозе јетре. У акутној фази индукције болести, развија

се инфламаторни одговор, праћен секрецијом цитокина, хемокина и других проинфламаторних медијатора и регрутацијом ћелија имунског система (моноцита, неутрофила, лимфоцита) који даље оштећују хепатоците. Акутну фазу прати изражена регенерација, пролиферацијом хепатоцита и других непаренхимских ћелија јетре (310). Понављана апликација CCl_4 узрокује активацију HSCs, а самим тим и развој фиброзе јетре (311, 312).

Фиброза јетре је изазвана интраперитоналним раствором $\text{CCl}_4/\text{corn oil}$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) у односу 1:3 и дози $1 \mu\text{L/g}$, телесне масе, два пута недељно у трајању од месец дана (313). Интравенски, у репну вену, је апликовано 1×10^6 MSCs ресуспендованих у $200 \mu\text{L}$ 0.9% NaCl или, 24 сата након прве примене $\text{CCl}_4/\text{corn oil}$, а затим 7., 14., и 21. дана експеримента (314).

Под истим условима, контролним групама мишева је апликовано $200 \mu\text{L}$ 0.9% NaCl или 1×10^6 мишијих фибробласта (енг. *STO cells*), (American Type Culture Collection, Catalog N^o. CRL-1503), да би се испитало да ли ће интравенска примена ћелија довести до одређених промена или су очекивани ефекти специфични само за MSCs.

3.8. Трансплантација MSCs у развијеној фибрози изазваној CCl_4

Недељу дана након задње апликације $\text{CCl}_4/\text{corn oil}$, односно након већ развијене фиброзе јетре, мишевима је, интравенски, путем репне вене, апликовано 1×10^6 MSCs ресуспендованих у $200 \mu\text{L}$ 0.9% NaCl, једном недељно, наредне три недеље, да би се испитало да ли примена MSCs може имати терапијски ефекат на већ развијену фиброзу јетре. Контролна група мишева је, након индукције фиброзе јетре примала $200 \mu\text{L}$ 0.9% NaCl, под истим условима као и експерименталне животиње (једном недељно, три недеље, путем репне вене).

3.9. Биохемијска анализа оштећења јетре

Након жртвовања експерименталних животиња у атмосфери засићеној диетилетром (BETA НЕМ, Београд), крв је прикупљена пункцијом абдоминалне аорте.

Након коагулације 30 минута на собној температури, серум је изолован центрифугирањем (3000 rpm, 20 минута) ради одређивања вредности аспартат и аланин трансминазе (енг. *aspartate transaminase*, AST и *alanine transaminase*, ALT). Вредности трансминаза су мерене на Olympus AU 400 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Germany) апарату, 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 (315).

3.10. Патохистолошка анализа ткива јетре

Након жртвовања експерименталних животиња, тј 24 часа након апликације CCl_4 и 16 часова након апликације α -GalCer-a, мишевима је изолована јетра за патохистолошку анализу.

Ткиво јетре је, непосредно по изолацији, фиксирано у 10% раствору формалдехида на собној температури. Ткиво је укалупљено у парафинске блокове и помоћу микротоме су исечени пресеци дебљине 5 μm , који су нанешени на предметна стакла, а затим бојени одговарајућом техником.

3.10.1. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)

Добијени парафински исечци су загрејани у термостату на $+56^\circ\text{C}$ и након 45 минута депарафинисани у ксилолу. Потом је урађен је процес рехидратације ткива испирањем у опадајућим концентрацијама етил алкохола: 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и 5 минута у дестилованој води. Препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10 минута, након чега су испрани дестилованом и, након тога, текућом водом 5 минута. Након тога, препарати су 2 минута бојени алкохолним еозином (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Затим је ткиво дехидратисано и просветљено у ксилолу. За процес дехидратације употребљене су растуће концентрације алкохола: 5 минута у 70%

алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након бојења и дехидратације, препарати су просветљени потапањем у мешавини ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1 у трајању од 1 минута, а потом 2 пута по 1 минут у ксилолу. Обрађени исечци су прекривени Канада балзамом (Canada balsam, Centrohem, Србија) и покровним стаклима. Препарати су сушени 24 часа и након тога анализирани под светлосним микроскопом (Olympus, Japan).

Н&Е је примењено у експерименталним и контролним групама мишева са акутним хепатитисом и са фиброзом јетре.

3.10.2. *PicroSirius-Red* бојење

Да би се квантификовао/одредио степен фиброзе јетре између различитих експерименталних група мишева код којих је индукована фиброза јетре, примењено је *PicroSirius-Red* бојење, специфично бојење за компоненте екстрацелуларног матрикса, као што је колаген (316).

Парафински исечци су претходно загрејани у термостату на +56°C у трајању од 45 минута. Затим су депарафинисани у ксилолу и урађен је поступак рехидратације ткива испирањем у опадајућим концентрацијама етил алкохола: 5 минута у апсолутном алкохолу, потом 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 80% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и на крају 5 минута у дејонизованој води.

Добијени препарати су потопљени у *Sirius-Red* раствору (0,1 g, Direct red 80, Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA, Catalog N° 36-554-8), у трајању од 60 минута на собној температури (20-22 °C). а потом испрани у дејонизованој води. Препарати су поново испрани, два пута по 5 минута, у ацидификованој води, која садржи 5 ml глацијалне сирћетне киселине растворене у 1L дестиловане воде. Вишак раствора је уклоњен механичким покретима.

У просецу дехидратације, препарати су потом два пута испрани у 100% алкохолу и три пута у ксилолу.

Ткивни исечци су прекривени Канада балзамом (Canada balsam, Centrohem, Србија) и покровним стаклима. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани под светлосним микроскопом (Olympus, Japan).

3.11. Мерење концентрације цитокина и имуносупресивних фактора које продукују MSCs у серуму

Након жртвовања мишева, узета им је крв из абдоминалне аорте и центрифугирана 10 минута на 300 g. Серум је издвојен и замрзнут на температури од -20°C до извођења анализе.

У серуму мишева је мерена концентрација цитокина (TNF- α , IFN- γ , IL-17 и IL-10) и имуносупресивних фактора које продукују MSCs (IDO, PGE2, HGF, IL-10 и TGF- β) комерцијалним ELISA (енг. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) китовима специфичним за мишје цитокине и то: *Mouse TNF- α DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse IFN- γ DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse IL-10 DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse IL-17 DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse HGF DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse TGF- β DuoSet ELISA Development kit*, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; *Mouse PGE2 DuoSet ELISA Development kit* R&D Systems, Minneapolis, MN, USA и *Mouse IDO ELISA kit*, NeoBioLab.

Стандарди су растворени у PBS-у (pH 7.2), где су почетне концентрације цитокине биле 2000 pg/ml за TNF- α , IFN- γ и IL-10 и 1000 pg/ml за TGF- β и IL-17, 10000 pg/ml за HGF и 2500 pg/ml за PGE2 и 30 ng/ml за IDO. Од припремљених стандарда су направљена двоструко растућа, серијска разблажења у осам тачака у комерцијалном растварачу (енг. *Reagent Diluent* (PBS са 1%-тним BSA)), према упутству произвођача, што омогућава конструисање стандардн криве и одређивања једначине праве према којој ће бити израчунате концентрације мерених цитокина.

У бунарчиће равног дна, микротитар плоча (једна микротитар плоча поседује 96 бунарчића, SARSTED) сипано је по 100 μl радне концентрације везујућег антитела. Плоче су затворене

атхезивном фолијом и, током ноћи, остављене на собној температури. Након тога, бунарчићи су прво испрани пуфером за испирање. Затим, блокирајући пуфер је додат у све бунарчиће, у финалном волумену од 300 μ l. Након једног часа, плоче су испране пуфером за испирање. Припремљени стандарди и разблажени узорци су сипани у плоче, покривени адхезивном фолијом. Након двосатне инкубације, на собној температури и испирања бунарчића, додато је 100 μ l радне концентрације антитета за детекцију. Плоче су поново обложене адхезивном фолијом и остављене два сата на собној температури. Након испирања, у бунарчиће је сипано 100 μ l радне концентрације *Streptavidin*-HRP (енг. *Streptavidin horseradish peroxidase*). Након 20 минута инкубације на собној температури, на тамном месту, микротитар плоче су испране. У бунарчиће је сипано 100 μ l раствора супстрата (енг. *Substrate solution: Color reagent A + Color reagent B*, у односу 1:1). Након 20 минута, на собној температури и без извора светлости, у бунарчиће је сипано 50 μ l раствора за прекидање реакције. Након мешања, измерена је оптичка густина узорака на *MicroplateReader*-у (*Zenyth, Anthos*, UK) на таласној дужини од 450 nm.

Добијене вредности су умањене за вредности апсорбанце слепе пробе (дејонизована вода). На основу измерених вредности стандарда, начињена је стандардна крива, а помоћу ње су израчунате вредности за узорке појединачно. Сви узорци су мерени у дупликату.

3.12. Одређивање кинуренина у серуму

Обзиром да IDO учествује у метаболизму триптофана, чији је крајњи продукт кинуренин, активност IDO је индиректно одређена спектрофотометријским мерењем концентрације кинуренина у серуму контролне групе мишева, мишева код којих је фиброза изазвана CCl_4 и мишева који су поред CCl_4 примили и MSCs (259). Прво је 200 μ l серума помешано са 100 μ l 30% трихлорацетатне киселине и инкубирано на температури од 50° C, 30 минута. Након центрифугирања (15400 g, 1 минут), 125 μ l добијеног супернатанта је помешано са истом запремином Ерлиховог реагенса (100 mg *p*-диметилбензалдехида раствореног у 5 ml глацијалне киселине). Узорци су, потом, очитани у односу на слепу пробу (дејонизована вода) на таласној дужини од 490 nm на спектрофотометру (*Specord S-600 Analytik Jena*) (259).

3.13. Одређивање профиброгенних протеина полимеризованом ланчаном реакцијом

Real-time RT-PCR техником је испитано да ли примена MSCs утиче на експресију профиброгенних фактора колагена тип I, глаткомишићног α -актина (енг. *α -smooth muscle actin*, α -SMA) и фактора трансформације раста β 1 (енг. *transforming growth factor (TGF)- β 1*), у фибрози јетре изазиваном CCl₄/corn oil, у јетри мишева и у претходно изолованим HSCs.

3.13.1. Изолација РНК

Ткиво јетре, које је претходно уситњено, и ћелијска култура HSCs су, у одвојени експериментима, третирали тризол реагенсом (енг. *TRIzol reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA*), у хомогенатору. Добијени лизат је пребачен у пластичне епрувете (1,5ml), а након 5 минута инкубације на собној температури додато им је по 1 mL TRIzol реагенса. Након инкубације, 10 минута на +4°C, узорци су центрифугирани у трајању од 15 минута на 12000 g на температури од +4°C. Центрифугирање је омогућило формирање три одвојене фракције: доња фракција са протеинима и липидима, интерфаза (која садржи ДНК) и горња, безбојна (водена) фракција у којој се налази РНК.

Горња (водена) фракција је потом пребачена у епрувете, у које је је додат изопропанол (0,5 mL у односу на 1 mL TRIzol реагенса) и инкубирана, на собној температури, наредних 30 минута. Након центрифугирања, 15 минута на 12000 g на +4°C, супернатант је одливен а добијени талог (у којем се налази РНК) је опран два пута по 5 минута на 7500 g у 1 mL 70% етанола, а потом осушен, до потпуног испаравања етанола. Узорци су потом растворени у 20 μ l дестиловане воде.

3.13.2. Реверзна транскрипција

Концентрација је измерена на *Gene Quant* колориметру, а волумену у ком се налази 1 μ g РНК додато је 0,2 μ g насумичних прајмера (*Fermentas, Vilnius*, Литванија) и 15 μ l воде а потом и dNTP (3'-деокси нуклеотид трифосфат) (*Fermentas, Vilnius*, Литванија). Финална концентрација раствора је била 1mM. Као контролни узорак, узета је вода, због могуће контаминације. Након инкубације (10 минута на 70°C), у току које су се прајмери (хексамери) насумично везивали за РНК, раствори су стављени на суви лед, а након 5

минута је у њих додато 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). Поновљена је инкубација, и то 10 минута на 25°C и потом 60 минута на 42°C, када се одиграла реакција реверзне транскрипције. Инкубацијом узорака на 70°C (10 минута), реакција је преинута а добијена комплементарна ДНК (сDNA) је чувана на +4°C до употребе.

3.13.3. Реакција ланчаног умножавања у реалном времену

На апарату *ABI Prism 7500 Thermocycler* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) је спроведена реакција ланчаног умножавања. Реакције су припремљене према протоколу за *QuantiTectSYBR Green RT-PCR* у једном кораку (*Applied Biosystems, Cheshire*, Велика Британија), уз употребу комерцијалних прајмера за TGF-β, Collagen-1 и α-SMA (*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). Први корак RT-PCR је трајао 2 минута на 50°C, са задржавањем трајања 10 минута на 95°C. Реакцију је чинило 40 циклуса, који су подразумевали 15 подциклуса топљења (95°C), и након тога везивање прајмера за ДНК и синтезу ДНК ланца на 60°C у трајању од 1 минута. Реакције су учињене у трипликату.

Праг анализе циклуса (*Ct, cycle of threshold*) је подешен на 0,1 релативних флуоресцентних јединица. Просечне *Ct* вредности триплката актина као контроле су одузете од просечних *Ct* вредности триплката гена који су испитивани, добијајући тако Δ*Ct*, а релативна експресија гена је изражена као $2^{-\Delta Ct}$. Контролна вредност је произвољно подешена на 1, док су резултати приказани као релативна вредност у односу на контролу.

3.14. Изолација мононуклеарних ћелија из јетре

За изолацију мононуклеарних ћелија из јетре, коришћен је метод механичке разградње јетре (317). Након издвајања јетре, уклоњена је жучна кеса и спроведена перфузија јетре употребом 7 mL PBS-а кроз *v.porta*-е. Јетра је уситњена маказицама на делове и потом нежно здробљена кроз 200 μ m челичну мрежу, коришћењем „клипа” шприца а потом и кроз ћелијско сито. Добијени садржај је ресуспендован у 50 ml RPMI-1640 медијума, који садржи *GlutaMax* 1,25 mM, HEPES и 10% FBS, и центрифугиран на 507 rpm (60 g) у трајању од 1 минут на собној температури, без наглог заустављања центрифуге (енг. *off break setting*). У следећем кораку, добијени супернатант (45 ml), у коме се налазе интрахепатичне ћелије је пребачену нове епрувете и центрифугиран (1433 rpm (480 g), на собној температури, 8 минута, са активираним опцијом наглог кочења (енг. *high break setting*)).

Тако добијени талог је ресуспендован у 10 ml 37.5% *Percoll* у HBSS медијуму који садржи 100 U/ml хепарина и центрифугиран на 1907 rpm (850 g) 30 минута на собној температури, без наглог заустављања центрифуге.

Добијени талог је потом ресуспендован у 5 ml пуфера за лизирање еритроцита (енг. *Eryth lysis buffer*) и инкубиран 5 минута, на леду (+4°C). Након тога, додато је 5 ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом, прекидајући даље лизирање. Затим су ћелије центрифугиране на 1433 rpm (480 g) 8 минута на 8°C, са активираним опцијом наглог кочења. Добијени талог је ресуспендован или у 1ml PBS који садржи 1% FBS односно 0,1% NaN₃ (тзв. пуфер за анализу проточном цитометријом, енг. *FACS buffer*) или у 1 ml комплетног RPMI-1640 медијума (који садржи 10% FBS, *GlutaMax* 1,25 mM и HEPES).

3.15. Фенотипизација мононуклеарних ћелија јетре проточном цитометријом

Након описаних поступака изолације мононуклеарних ћелија, спроведена је анализа изолованих мононуклеарних ћелија јетре проточном цитометријом, одређиван је релативни и апсолутни број инфламацијских ћелија.

Најпре је одређивана је вијабилност ћелија применом *Trypan-blue*-а под светлосним микроскопом. У експериментима је вијабилност ћелија бола у опсегу 90% - 95%.

Специфичност антитела	Обележивач	Клон	Изотип	Произвођач	CAT
CD4	Alexa 488	Fluor [®] 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
F4/80	FITC	BM8	Rat IgG2a	Invitrogen	MF48020
CD11b	PerCp	M1/70	Rat IgG2b	Molecular probes	A14787
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
CD19	PE	1D3	IgG2a, κ	BD Pharmingen	553786
T-bet	PE	4B10	IgG1, κ	eBioscience	12-5825-80
Gata-3	PE	TWAJ	Rat IgG2b, κ	eBioscience	12-9966-41
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

Специфичност антитела	Обележивач	Клон	Изотип	Произвођач	CAT
CD1d	FITC	1B1	Lewis IgG2b, κ	BD Pharmingen	561756
CD49b	PerCp	HMα2	Armenian Hamster IgG	Biolegend	103519
CD49b	FITC	DX5	Rat IgMκ	MACS Miltenyl Biotec	130-102-801
CXCR5	FITC	L138D7	Rat IgG2a, κ	Biolegend	145519
CD3	FITC	500A2	Syrian hamster / IgG	Invitrogen	HM3401
CD45	APC	30-F11	Rat IgG2a, κ	Invitrogen	MCD4505
IL-17	PE	TC11-18H10	Rat IgG1, κ	MACS Miltenyl Biotec	130-102-344
FoxP3	PE	MF23	Rat IgG2b, κ	BD Pharmingen	560408
FoxP3	APC	3G3	Rat IgG1, κ	MACS Miltenyl Biotec	130-093-013
IL-23	PE	320244	Rat IgG2A	R&D Systems	IC18871P
Ly6 G	PE	RB6-8C5	Rat IgG2a, κ	Invitrogen	12-5931-81
Ly-6G	PerCp	RB6-8C5	Rat (LEW) IgG2a, κ	eBioscience	45-5931-80
RORγt	PE	600380	IgG2b	R&D Systems	IC6006P
IL-6	PE	MP5-20F3	Rat IgG1	BD Pharmingen	554401
IL-1β	PE	166931	Rat IgG2b	R&D Systems	IC4013P
CD206	FITC	C068C2	Rat IgG2a, κ	Biolegend	141703
CD220	PerCp	B6.220	Rat IgG2b, κ	Biolegend	352602
STAT 3	FITC	LUVNKLA	IgG2b	eBioscience	11-9033-42

Табела 3. Моноклонска антитела коришћена у проточној цитометрији.

За бојење мембранских маркера коришћена су анти-мишија моноклонска антитела различите специфичности (Табела 3).

У 50 μ l пуфера за бојење (енг. *Staining Buffer*; BD) је ресуспендовано 1×10^6 изолованих ћелија јетре и додата су примарно коњугована моноклонска антитела, која су специфична за површинске антигене моноклеарних ћелија јетре (Табела 3). Изоловане ћелије су инкубиране и са адекватним изотипским контролама (Табела 4). Финална разблажења антитела и изотипских контрола у суспензији ћелија су била 1:100. У одсуству извора светлости, ћелије су инкубиране на $+4^{\circ}\text{C}$, 30 минута, након чега је додато 2ml хладног пуфера за бојење и суспензија је центрифугирана на 250 g, 5 минута. Добијени супернатант је одбачен а талог ресуспендован у 250 μ l пуфера за бојење, након чега је анализирана експресија површинских маркера ћелија, на проточном цитометру FACSCalibur (BD) помоћу CELLQUEST софтвера (BD). Граничник (енг. *gate*), је формиран у FSC/SSC плоту, представљајући регион вијабилних моноклеарних ћелија. У свакој анализи је регистровано најмање 10000 догађаја. Добијени подаци су анализирани помоћу CELLQUEST (BD) и *FlowingSoftware 2.5.1*.

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	FITC	G15-178	Mouse IgG2a, κ	BD Pharmingen	53456
Control					

Табела 4. Изотипске контроле моноклонских антитела коришћених у проточној цитометрији.

Интрацелуларно бојење цитокина је започето стимулацијом ћелија форбол 12-миристат 13-ацетатом (енг. *Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA*; Sigma Aldrich) и јономицином (енг. *Ionomycin*; Sigma Aldrich), који активирају протеин киназу C (енг. *Protein kinase C, PKC*) и интраћелијско накупљање јона калцијума, што индукује експресију цитокина у активираној ћелији (318) у временском интервалу од 4 до 6 часова. У *in vitro*, ћелијској стимулацији су употребљени BD *GolgyStop*™ (који садржи моненсин) и BD *GolgyPlug*™ (који садржи брефелдин А) - инхибитори интрацелуларног транспорта протеина, узрокујући накупљање цитокина у ендоплазматском ретикулуму или Голџи комплексу, што повећава могућност детекције ових ћелија.

Изолувани мононуклеари (број ћелија у милилитру медијума износи 1 милион) ресуспендовани у медијуму (са 10% FBS-ом) уз 50ng/ml PMA и 500ng/ml јономицина, су инкубирани на 37°C у присуству 5% CO₂. Након двочасовне инкубације (на +4°C, у мраку) суспензији је додато 0,7μl/ml BD *GolgyStop*™, који блокира секрецију и повећава унутарћелијско накупљање цитокина. Након 4 часа инкубације (на +4°C, у мраку), мононуклеарне ћелије су испране и ресуспедоване у медијуму а потом су пребачене у одговарајуће епрувете (енг. *Falcon round-bottom test tubes, BD*).

Првобитно је учињено бојење површинских макера, јер фиксација и пермеабилizација ћелија могу оштетити епитопе мембранских маркера.

Након инкубације са антителима за мембранске антигене, ћелије су опране са 2 ml пуфера за бојење, након чега су 5 минута центрифугиране на 250 g. Добијени талог је ресуспендован у 250μl *Cytofix/CytoPerm*™ раствора (BD *Pharmingen*), инкубиран на температури +4°C у трајању од 20 минута, након чега су ћелије опране са 1 ml *Perm/Wash*™ пуфера (BD *Pharmingen*) и центрифугиране на 250 g, 5 минута. Након

одливања супернатанта додата су антитела за интрацелуларно бојење цитокина и инкубирана у трајању од 30 минута, на температури од +4° C. Талог је, потом, ресуспендован у 50 µl *Perm/Wash*™ пуфера. Додата су примарно коњугована моноклонска антитела специфична за цитокине наведене у Табели 2. Након инкубације, ћелије су опране коришћењем 2 ml пуфера за бојење и центрифугиране 5 минута на 250 g.

Добијени ћелијски талог је ресуспендован у 250 µl пуфера за бојење и анализиран на проточном цитометру. Граничник у FSC/SSC дијаграму представља регион вијабилних ћелија, а у свакој цитометријској анализи је регистровано најмање 10 000 догађај. Подаци су анализирани помоћу FACSCalibur (BD Biosciences) и *Flowing Software 2.5.1*. програма

3.16. Детекција MSCs у јетрама мишева третираних CCl₄

MSCs су флуоресцентно обележене флуоресцентном бојом карбоксифлуоресцин диацетат сукцинил естром, (CFSE; Molecular Probes), према упутствима произвођача (319) MSCs обележене са CFSE, у дози од 1×10^6 , су апликоване интравенски мишевима, путем репне вене, 24 часа након прве администрације CCl₄/*corn oil*, затим 7., 14. и 21. дана експеримента. Добијена једноћелијска суспензија од изолованог ткива јетре, 2., 11., 18. и 27. дана експеримента је анализирана на проточној цитометрији. Апсолутан број регистрованих MSCs по органу је израчунат на основу формуле $n = m_g / m_a \times v_1 / v_2 \times 100\,000 / \underline{x}$, где је m_g укупна маса анализираниог органа; m_a маса анализирание пропорције органа; v_1 укупна запремина суспензије у којој се анализирание ћелије налазе; v_2 запремина анализираниог узорка; \underline{x} број позитивних догађаја на 100 000 свих догађаја (319).

3.17. Изолација NKT ћелија из јетре

Из добијене суспензија мононуклеарни ћелија јетре су изоловане NKT ћелије, магнетном сепарацијом, помоћу кита *NK1.1⁺ iNKT Cell Isolation Kit, mouse*, према утврђеном протоколу произвођача (*Miltenyi Biotec*).

Најпре су изоловане мононуклеарне ћелије јетре, избројане и узето је 10^7 ћелија. Ове ћелије су центрифугиране (300 g, 10 минута) а добијени талог је ресуспендован у 80 µl пуфера (PBS (без Ca²⁺ и Mg²⁺) w/0.1% BSA и 2mM EDTA (pH 7.4)) и додата је 20 µl NK1.1+ iNKT Cell

Biotin-Antibody Cocktail-a, који садржи различита антитела (анти-NKp46, CD115, CD8a, TCR $\gamma\delta$ и CD45R антитело) уклањајући дефинисане популације ћелија. Након инкубације на температури од 2-8°C (10 минута), ћелије су опране применом 2 ml пуфера. Суспензија је центрифугирана (10 минута, 300 g) на температури од 2-8°C. Након одливања супернатанта, добијени талог је ресуспендован у 90 μ l Buffer-a и додато је 10 μ l Anti-Biotin MicroBeads. Након инкубације у трајању од 15 минута, на температури од 2-8°C, талог је ресуспендован у 2 ml пуфера и центрифугиран 10 минута на 300 g. Након уклањања комплетног супернатанта, преостали талог је ресуспендован у 500 μ l пуфера. У магнетно поље MidiMACS сепаратора (Miltenyi Biotec) је постављена LD колона, испрана применом 2 ml Buffer-a. Пропуштањем ћелијске суспензије кроз ову колону су сакупљене необележене NK1.1⁺ NKT ћелије, које су центрифугиране (10 минута, 300 g). Добијени талог је ресуспендован у 90 μ l пуфера (PBS (pH=7.2), 2mM EDTA и 0.5% BSA) и потом је додато 10 μ l Anti-NK1.1-APC. Након инкубације ћелија са антителом, специфичним за NKT ћелије (10 минута, на температури од 2-8°C), ћелије су опране у 2 ml Buffer-a и центрифугиране (10 минута, 300 g). Пипетом је уклоњен целокупан супернатант а талог ресуспендован у 80 μ l пуфера, додато 20 μ l Anti-APC MicroBeads и инкубиран на температури од 2-8°C, у трајању од 15 минута, након чега су ћелије ресуспендоване у 2 ml пуфера и центрифугиране (10 минута, 300 g) а добијени талог је ресуспендован у 500 μ l пуфера.

У магнетно поље MidiMACS сепаратора (Miltenyi Biotec) је затим постављена LS колона (припремљена испирањем са 500 μ l пуфера), кроз коју је пропуштена ћелијска суспензија, тако да су позитивно селектоване NKT ћелије, тј оне су се везале за зидове колона помоћу анти-NK1.1 антитела. LS магнетна колона са обележеним ћелијама је уклоњена са MACS сепаратора и постављена у епрувету, када је додато 1 ml пуфера и садржај је потиснут пластичним клипом, уклањајући тако ове ћелије из колоне.

Добијене NKT ћелије су употребљене као ефекторске ћелије у тесту цитотоксичности (РЕФ), након одређивања њиховог броја и вијабилности.

3.18. Изолација спленоцита и сепарација CD4⁺ Т лимфоцита помоћу магнетних куглица

Приликом жртвовања мишева у експерименталном моделу фиброзе јетре, изолована је и слезина у циљу добијања појединачних спленоцита, који су потом коришћени за магнетну сепарацију CD4⁺ Т лимфоцита.

Слезине су, клипом шприца, хомогенизоване и пропуштене кроз ћелијско сито (енг. *cell strainer*, BD Pharmingen, USA) и у епрувету је додато додавање 5 ml медијума (RPMI-1640 (PAA Laboratories GmbH) са додатком 10% FBS-а). Суспензија је центрифугирана (5 минута, 1500 rpm) а супернатант је одливен. У талог је додат раствор за лизирање еритроцита и након инкубације (5 минута, на леду), лиза еритроцита је обустављена применом 5 ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом. Суспензија је центрифугирана, а у преостали талог, добијен одливањем супернатанта, је додато 8 ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом.

Овако добијена суспензија појединачних ћелија слезије је употребљена за даље експерименте, након одређивања броја и вијабилности ћелија.

За издвајање CD4⁺ Т лимфоцита из слезине је употребљен *CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit mouse*, према протоколу произвођача (*Miltenyi Biotec*). Из претходно добијене суспензије је узето 10⁷ ћелија, које су центрифугиране (10 минута, 300 g) након чега је одливен супернатант а талог ресуспендован у 40 µl пуфера (PBS (без Ca²⁺ и Mg²⁺) w/0.1% BSA и 2mM EDTA (pH 7.4)). У ћелијску суспензију је додато 10µl CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Biotin-Antibody Cocktail-а који садржи различита антитела (анти-CD8a, Ter-119, CD45R, CD11b и CD49b антитело) којима се отклањају дефинисане ћелијске субпопулације. Добро измешан талог ћелија је инкубиран 10 минута на температури од 2-8°C, након чега је додато 30 µL пуфера, 20 µL Anti-Biotin MicroBeads и 10 µL CD25-PE антитела. У припремљену LD колона, постављену у магнетно поље MidiMACS сепаратора (*Miltenyi Biotec*) је, након инкубације у трајању од 15 минута на температури од 2-8°C, пропуштена ћелијска суспензија и на тај начин су прикупљени необележени CD4⁺ Т лимфоцити. LD магнетна колона са обележеним ћелијама је уклоњена са MACS сепаратора и постављена у епрувету, додато је 1 ml пуфера и садржај је потиснут пластичним клипом, уклањајући тако ове ћелије из колоне. Чистоћа популације је проверена помоћу проточне цитометрије, након чега су CD4⁺ Т лимфоцити употребљени за *in vitro* експерименте.

3.19. Мерење цитотоксичности NKT ћелија употребом xCELLigence система

За одређивање цитотоксичке активности NKT ћелија јетре експерименталних животиња употребљена је DP верзија xCELLigence система, која поседује 3 микротитар плоче са по 16 бунарчића (E16) са златним дном. 100 µl комплетног медијума је наливено у сваки бунарчић и спроведена је калибрација, постављањем xCELLigence система у инкубатор на 37° у присуству 5% CO₂. HepG2 ћелије су коришћене као циљне, односно таргет ћелије. Припремљена је суспензија ових ћелија: туморске ћелије су, најпре, подигнуте са дна флашка краткотрајном апликацијом раствора 0.25% *Trypsin*-а и 0.02% EDTA раствореног у PBS-у. Ћелијама је додато 6 ml DMEM медијума са 10% FBS-ом, због неутрализације *Trypsin*-а. Након центрифугирања (5 минута, 125 g), супернатант је одливен а талог ресуспендовану комплетном медијуму. Вијабилност туморских ћелија је одређивана применом *Trypan-blue*-а а у експериментима је коришћена ћелијска суспензија која је садржала више од 95% вијабилних ћелија. Припремљена је суспензија HepG2 ћелија (4×10⁵ ћелија/ml комплетног медијума) тако да у свакој комори E16 плоче буде по 4×10⁴ туморских ћелија у волумену од 100 µl. E16 плоче су постављене у xCELLigence систем и инкубација таргет ћелија на температури од 37°C и у присуству 5% CO₂ је трајала 24h.

Иzolоване NKT ћелије су кокултивисане са таргет ћелијама у односу 10:1 (320), тако што су ресуспендоване у комплетном медијуму 4×10⁶ ћелија/ml комплетног медијума) а потом су сипане у бунарчиће, у волумену од 100µl, након инкубације таргет ћелија.

E16 плоче су постављене у xCELLigence систем, којим је мерен ћелијски индекс током 6 часова (на температури од 37°C, у присуству 5% CO₂). Подаци су анализирани применом програма RTCA Software 1.2 (Acea Biosciences).

3.20. Испитивање паракриних ефеката MSCs на хепатотоксичност NKT ћелија *in vitro*

За испитивање паракриног ефекта MSCs на NKT ћелије у акутном хепатитису, NKT ћелије које су изоловане из јетре мишева и култивисане у комплетном медијуму (уз додатак 10% FBS-а, 2 mM L-глутамин, 100 IU/ml пеницилина G и 100 µg/ml стрептомицина), су стимулисане α-GalCer-ом (100 ng/ml) и кокултивисане са MSCs у *transwell* систему са 24

отвора (0,4 μm , Corning Incorporated, Life Sciences, France). NKT ћелије (1×10^6) су засејане у доњој комори, а MSCs у инсерте *transwell* система, у односу 10:1 (321). Након 48 сати инкубације, ELISA есејом је анализирано присуство цитокина у супернатантима из свих комора, помоћу ELISA китова у складу са препоруком произвођача. NKT ћелије су сакупљене и, потом, анализирани проточном цитометријом и коришћене у тесту цитотоксичности.

3.21. Испитивање паракриних ефеката MSCs на функцију CD4⁺ Т лимфоцита *in vitro*

За испитивање паракриног ефекта MSCs на CD4⁺ Т лимфоците у фибрози јетре, CD4⁺ Т лимфоцити, који су претходно изоловани из слезине мишева, су стимулирани Конканавалином А (енг. *Concanavalin A*) (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (322) и IL-2 (енг. *Interleukin-2*, 50 ng/mL) (323) и кокултивисани са MSCs у директном контакту или физички одвојени помоћу *transwell* система са 24 отвора (0,4 μm , Corning Incorporated, Life Sciences, France). CD4⁺ Т лимфоцити су засејани у доњој комори, а MSCs у инсерте *transwell* система, или у директном контакту у односу 10:1 (324). Након инкубације, у трајању од 48 часова, ELISA есејом (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) је одређена концентрација цитокина у супернатантима, према упутству произвођача.

3.22. Изолација стелатних ћелија јетре

Мишевима је учињена перфузија јетре, путем *Vena portae*, коришћењем 26 G игле (BD, Franklin Lakes, USA). Перфузиони раствори 1 и 2 су претходно припремљени и загрејани на температуру 37°C, а потом убризгани у јетру мишева преко *Vena-e portae*, а дренирани путем *Vena-e cava inferior*, уз помоћ перисталтичке пумпе, уз брзину протока од 6.5 mL/min .

Перфузиони раствор 1 чине: 8 g/L NaCl, 400 mg/L KCl, 78 mg/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 151 mg/L $\text{NaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 2380 mg/L HEPES, 350 mg/L NaHCO_3 , 190 mg/L EGTA, 900 mg/L глукозе, и 6 mg/L *phenol red* индикатора. рН раствора је усклађен на 7,3–7,4 помоћу 10 N NaOH. Раствор је филтриран у стерилним условима и тако припремљен је сачуван на 4°C до

употребе. Повај перфузиони раствор је убризгаван у јетру мишева 4,5 минута., као први корак перфузије.

У другом кораку, припремљен је перфузиони раствор 2, који чине: 8 g/L NaCl, 400 mg/L KCl, 78 mg/L NaH₂PO₄ × H₂O, 151 mg/L NaHPO₄ × 2 H₂O, 2380 mg/L HEPES, 350 mg/L NaHCO₃, 560 mg/L CaCl₂ × 2 H₂O и 6 mg/L *phenol red* индикатора. рН раствора је усклађен на 7,3–7,4 помоћу 10 N NaOH. Раствор је филтриран у стерилним условима и тако припремљен је сачуван на 4°C до употребе. Оовај перфузиони раствор је такође убризгаван у јетру мишева 4,5 минута и допуњен са 0.5 mg/mL Проназе Е (Merck, Darmstadt, Germany).

У трећем кораку, перфузиони раствор 2 је допуњен са 0.75 U/mL Колагеназе Р (Roche, Basel, Switzerland) и убризгаван у јетру мишева 4,5 минута.

Перфундоване јетре су уклоњене и јетра је уситњена маказицама на делове и потом нежно здробљена кроз 200µm челичну мрежу, коришћењем „клипа” шприца а потом и кроз ћелијско сито. Добијени садржај је ресуспендован перфузионом раствору 2 уз додатак 0.4 mg/mL Проназе Е, 1.5 U/mL Колагеназе Р, and 0.02 mg/mL Dna-зе I (Roche, Basel, Switzerland). Раствор је уз помоћ NaOH, доведен на рН 7.2–7.4. Таква суспензија је, након ћелијске дигестије у трајању од 20 минута у воденом купатилу, филтрирана кроз 70 µm сито (енг. *cell strainer*, BD Pharmingen, USA), испрана помоћу перфузионог раствора 2 (темпераатуре 4°C) и центрифугирана на 600 g десет минута. (325)

Добијена ћелијска суспензија је два пута центрифугирана на 50 g, 90 секунди. Након одвајања хепатоцита, коришћењем градијента помоћу *Percoll*-а (Sigma, UK), добијена суспензија је центрифугирана 5 минута на 50 g. Након одбацивања пелета, претходни корак је понављан до тренутка када се више није формирао видљиви пелет. Центрифугирањем на 200 g, 10 минута је добијен пелет који је садржао стелатне ћелије јетре и он је ресуспендован у 10 ml DMEM-а (Gibco, UK) који садржи 10% FCS.. Након последњег центрифугирања на 200 g, 10 минута, добијени ћелијски супстрат је ресуспендован у у 20 ml DMEM-а (Gibco, UK) који садржи 10% FCS и засејан у ћелијски флак, који је потом чуван у асептичним условима у инкубатору на температури од 37°C и у присуству 5% CO₂. Након 20 часова медијум је замењен. (326). Након 72 часа, добијене хепатичне стелатне ћелије (HSCs) су потом коришћене за кокултивацију са CD4+ Т лимфоцитима.

3.23. Кокултивација CD4+ Т лимфоцита обележених MSCs са HSCs

Мезенималне матичне ћелије су узгајане у комплетном медијуму, у већ описаном поступку, у присуству или одсуству инхибитора IDO, 1 mM 1-МТ, а потом засејане у *transwell* систему са CD4+ Т лимфоцитима који су *in vitro* стимулирани (однос 10:1), као што је описано (247). Након 48 часова, CD4+ Т лимфоцити су прикупљени и култивисани са HSCs (однос 20:1) (327), након чега је, применом *real-time* PCR (поступком који је претходно описан) мерена експресија колагена тип 1 (енг. *collagen-1*).

3.24. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

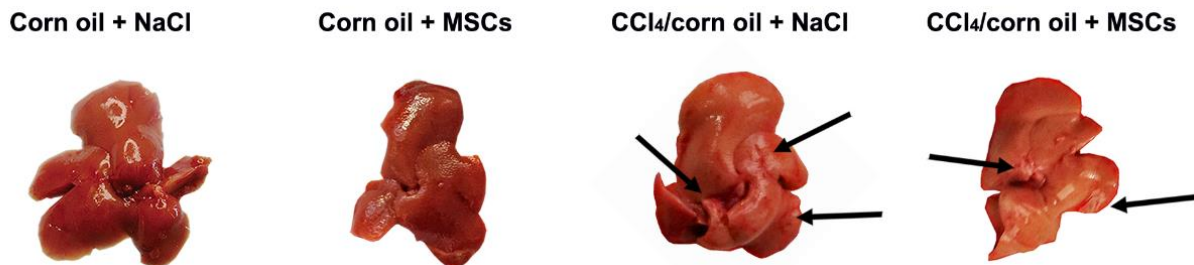
Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS, верзија 20. Нормалност расподеле је одређена тестом *Kolmogorov-Smirnov*. За вредности са нормалном расподелом, коришћен је параметарски *Student's*-ов t тест а у случају неправилне расподеле употребљен је непараметарски *Mann-Whitney*-ев U тест. Добијени резултати експеримента су изражени као вредност ± стандардна грешка (енг. *Standard error/Mean*, SEM). Статистички значајном разликом су сматране добијене вредности $p < 0.05$, а статистички веома значајним су оне вредности за које је $p < 0.01$. *Microsoft Excel* је коришћен за креирање графикона и табела.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. УТИЦАЈ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА НА СИГНАЛНИ ПУТ ИЛ-17 У МОДЕЛУ АКУТНОГ ХЕПАТИТИСА

4.1.1. Једнократна апликација MSCs значајно смањује акутно оштећење јетре које је изазвано CCl₄, смањује инфилтрацију инфламацијским ћелијама и смањује серумски ниво ИЛ-17.

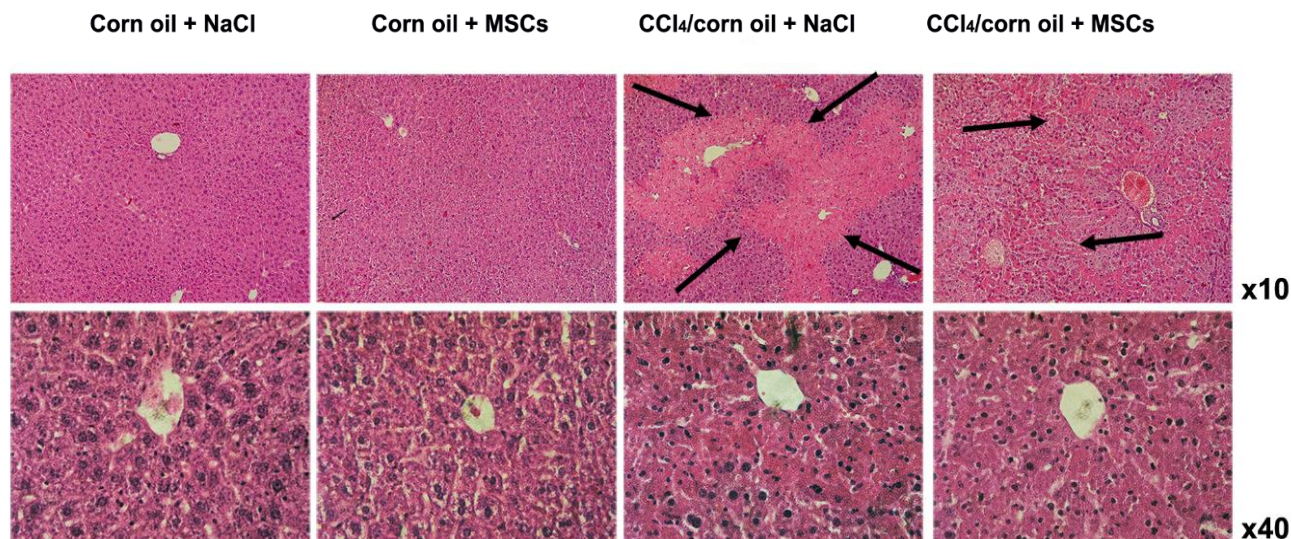
Макроскопски, јетре мишева који су примили само CCl₄, су увећане, са блеђом и неправилнијом структуром (црне стрелице). Ове карактеристике указују на изражено оштећење јетре, за разлику од јетри мишева којима су поред CCl₄ апликоване и MSC – ове јетре имају глатку, униформисану површину, слично јетрама контролних животиња (Слика 3).



Слика 3: Макроскопски изглед јетри мишева.

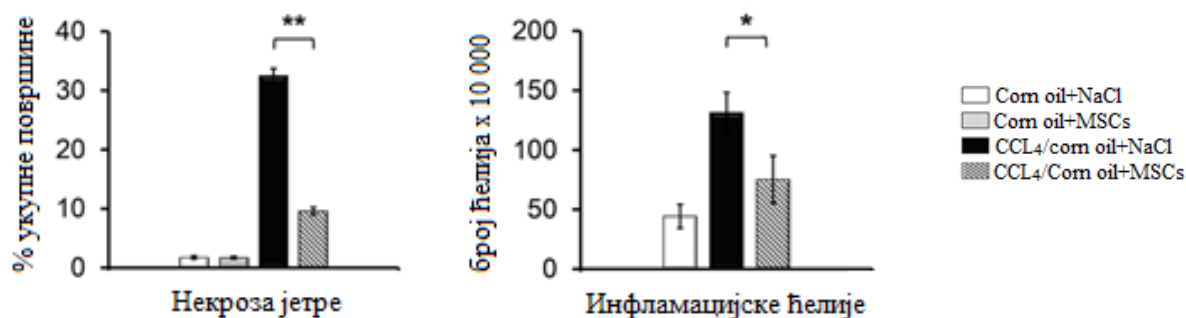
Хистолошка анализа потврђује претходно наведене резултате. На препаратима јетри (бојених хематоксилин-еозином) мишева који су примили CCl₄ се уочавају екстензивне зоне некрозе са губитком нормалне архитектуре ткива јетре, вакуолизацијом, кариолизом и

израженом инфилтрацијом еозинофилима (црне стрелице). Уочава се повећање цитоплазме већине хепатоцита. Насупрот овом налазу, на јетрама мишева који су, поред CCl_4 примили и MSCs, видљиве су солитарне зоне некротичног ткива показујући тиме да примена мезенхимални матичних ћелија значајно смањује укупну површину некрозе ткива јетре (Слика 2, увећање $\times 10$, $p < 0.01$).



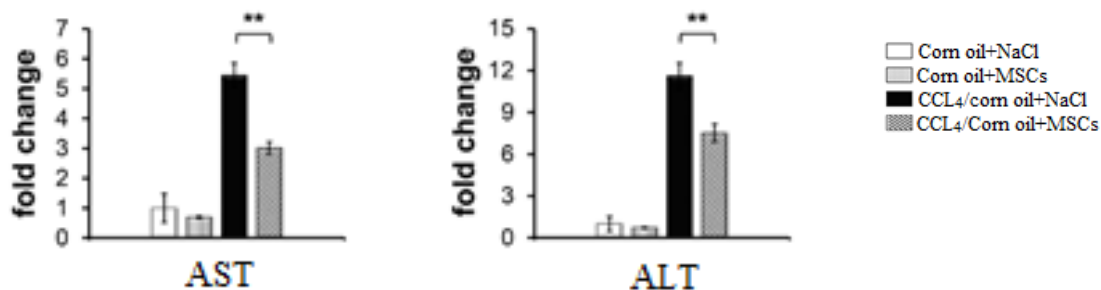
Слика 4. Репрезентативни исечци јетре мишева. Стандарно патохистолошко бојење (H&E), увећање $\times 10$; $\times 40$.

Оштећење хепатоцита у овом експерименталном моделу прати екстензивна инфилтрација инфламацијским ћелијама, унутар лобулуса јетре и у непосредној близини централних вена и портних простора, показујући да се у приказаном ткиву одиграва инфламација. Међутим приказана инфилтрација је значајно редукована код мишева који су третирани и са MSCs, (Графикон 1, $p < 0.05$).



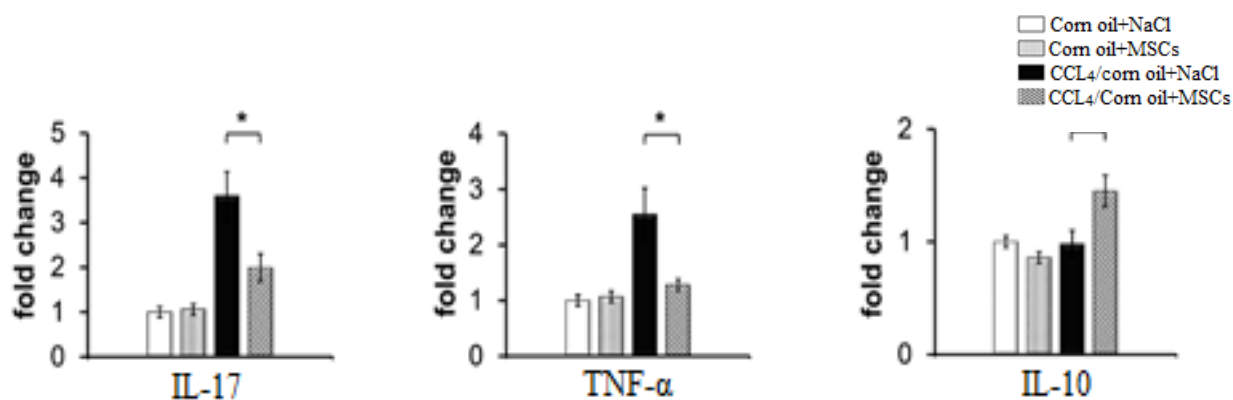
Графикон 1: А: Процент некрозе јетре (3А, ** $p < 0.01$) и инфилтрација инфламацијским ћелијама (3Б * $p < 0.05$) је статистички значајно нижи код групе мишева која је након CCl_4 примила и MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само CCl_4 . (средња вредност +/-SE, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

Примена MSCs значајно смањује оштећење јетре, што је потврђено вредностима трансминаза. (Графикон 2). Серумски ниво АСТ и АЛТ је значајно нижи код мишева који су примили CCl_4 +MSCs, у поређењу са мишевима који су третирани са само CCl_4 .



Графикон 2. Концентрација трансминаза у серуму мишева након примене CCl_4 и MSCs. Концентрација трансминаза (АСТ и АЛТ) је статистички значајно мања у серуму мишева који су након CCl_4 примили и MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само CCl_4 (средња вредност +/-SE, ** $p < 0.01$).

Смањено инфламацијско оштећење код мишева који су примили CCl₄+MSCs прати и смањена продукција IL-17. Серумски ниво IL-17 је значајно нижи, у односу на мишеве који су примили само CCl₄ (p<0.05). Поред IL-17, значајно је снижен хепатотоксични TNF-α (p<0.05) и значајно повишен IL-10 који поседује имуносупресивно и хепатопротективно дејство (p<0.05) у серуму мишева који су примали CCl₄+MSCs (Графикон 3).

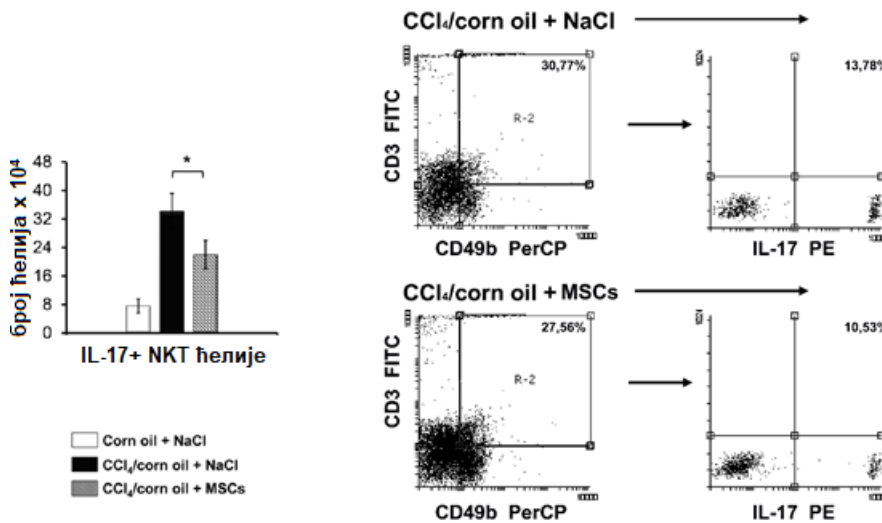


Графикон 3. Вредности цитокина у серуму. Вредности IL-17 и TNF-α су значајно ниже, а вредност IL-10 је значајно виша у серуму мишева који су након CCl₄ примили и MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само CCl₄ (средња вредност +/-SE, *p<0.05).

4.1.2. Примена MSCs значајно смањује број NKT ћелија које продукују IL-17, али не утиче на број неутрофила, CD4+ и CD8+ Т лимфоцита који продукују IL-17 у акутном оштећењу јетре изазваном CCl₄.

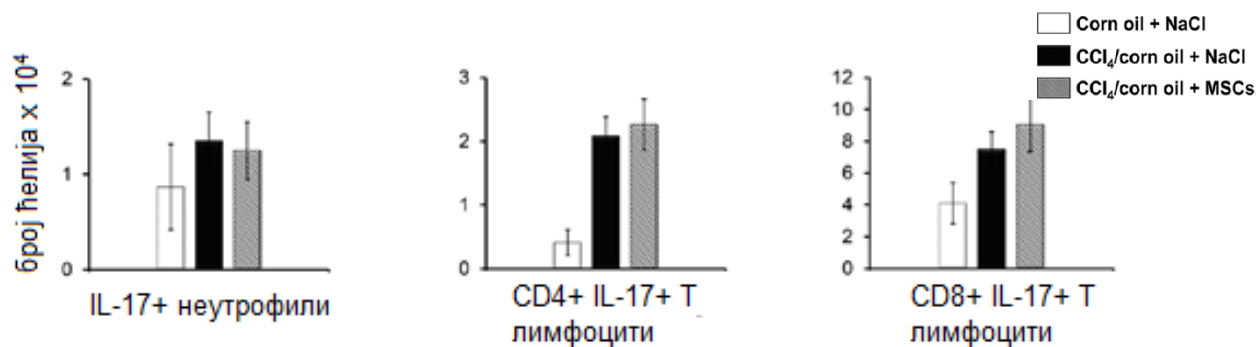
Да би се утврдило од које ћелијске популације доминантно зависи инфламација јетре посредством IL-17, односно на коју ћелијску популацију утиче примена MSCs, учињена је проточна цитометрија изолованих леукоцита у инфилтрату јетре. Итрацелуларно бојење је показало да, у јетрама мишева који су примали CCl₄, већина инфламацијских ћелија које продукују IL-17 су NKT ћелије. Сходно томе, редукција оштећења јетре у овом експерименталном моделу болести, је последица смањене продукције IL-17 у NKT ћелијама, под утицајем примењених мезенхималних матичних ћелија.

Постоји значајно мањи број CD3+ CD49b+ NKT ћелија које продукују IL-17, код мишева који су поред CCl₄ примили и MSCs, односу на мишеве који су примили само CCl₄ (p<0.05) (Фигура 1).



Фигура 1. Примена MSCs повећава број IL-17+ NKT ћелија у јетри мишева којима је изазван хепатитис. Број IL-17+ NKT ћелија је значајно виши у јетри мишева који су примили само CCl₄, у поређењу са мишевима који су након CCl₄ примили и MSCs (средња вредност +/- SE, *p<0.05). Приказани су репрезентативни плотови.

Насупрот томе, није уочена разлика у апсолутном броју CD45+Ly6G+ неутрофила, као ни CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцитима у јетри који продукују IL-17, између експерименталних група (Графикон 4).



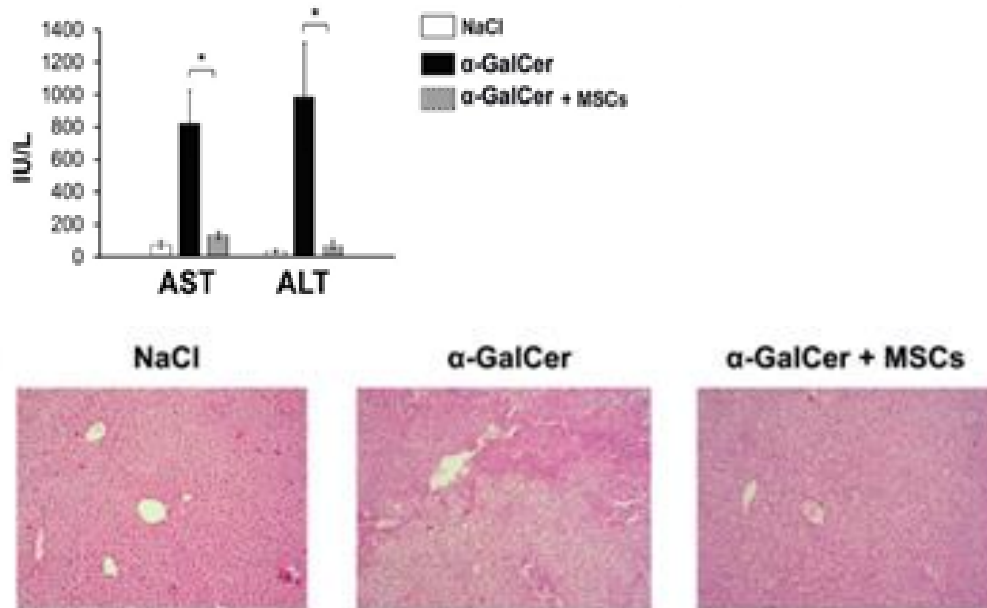
Графикон 4. Примена MSCs не утиче на број неутрофила, IL-17+ CD4+ и CD8+ Т лимфоцита у јетри мишева којима је изазван хепатитис. (средња вредност +/-SE).

4.1.3. У експерименталном моделу акутног хепатитиса изазваног NKT ћелијама, мезенхималне матичне ћелије смањују укупан број NKT ћелија које продукују IL-17+ а повећавају број FoxP3+ IL-10+ NKT ћелија.

У експерименталном моделу акутног хепатитиса, где је акутно настало оштећење јетре изазвано CCl₄, показано је да примена мезенхималних матичних ћелија значајно смањује акутну инфламацију јетре, тако што смањује број NKT ћелија које продукују IL-17.

Да би смо даље истражили утицај NKT ћелија у акутном хепатитису, примењен је већ установљени модел акутног хепатитиса применом α-GalCer, који је снажни активатор NKT ћелија.

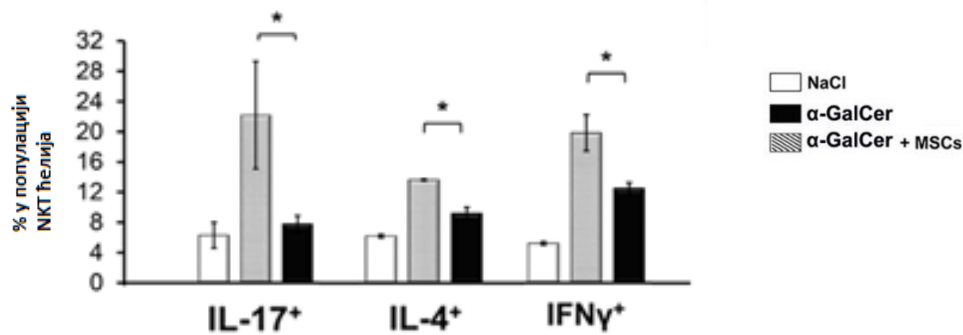
Показано је да једнократна примена MSCs значајно редукује оштећење јетре изазвано NKT ћелијама. Ово је потврђено разликама у мереним трасаминазама јетре, као и хистолошким разликама између експерименталних група. На Фигури 2 је показано да примена MSCs значајно смањује ниво AST и ALT у серуму мишева који су примили α -GalCer и значајно смањује некрозу хепатоцита која осликава степен акутог оштећења јетре.



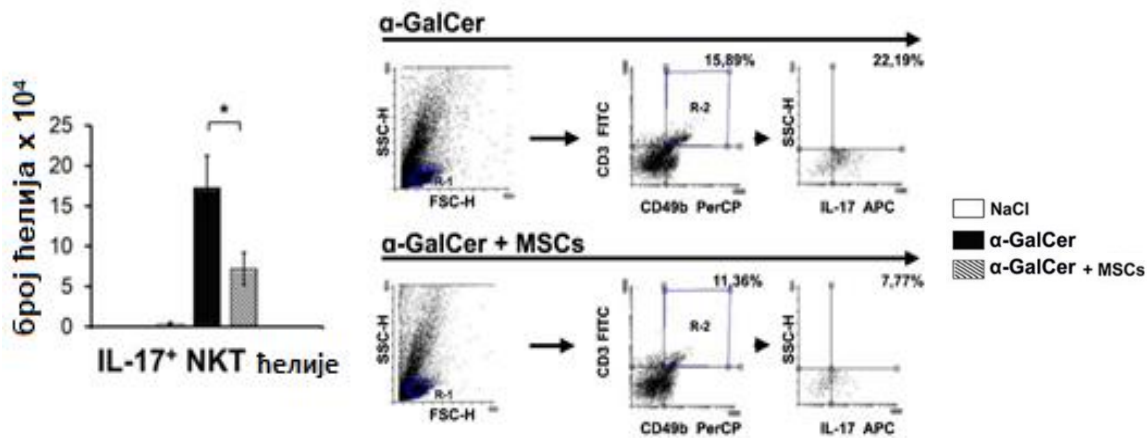
Фигура 2. Концентрација трансминаза у серуму мишева након примене α -GalCer и MSCs. Концентрација трансминаза (ACT и АЛТ) је статистички значајно мања у серуму мишева који су након α -GalCer примили и MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само α -GalCer (средња вредност +/-SE, * $p < 0.05$).

Приказани су репрезентативни исечци јетре мишева. Стандарно патохистолошко бојење (H&E), увећање x 40.

Применом проточне цитометрије у овом експерименталном моделу, показано је да MSCs значајно смањују продукцију свих инфламаторних цитокина IL-17, IFN- γ и IL-4 у NKT ћелијама јетре (Графикон 5) али и да већина NKT ћелија продукује IL-17 (Фигура 3).



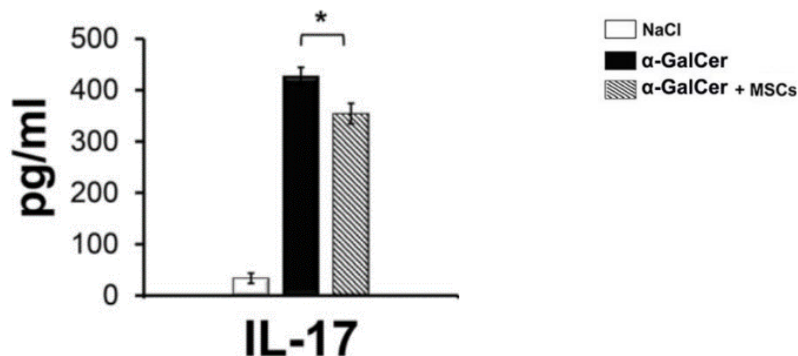
Графикон 5. MSCs смањују продукцију инфламаторних цитокина у NKT ћелијама јетре. Процент IL-17+, IFN- γ + и IL-4+ NKT ћелија је значајно мањи у јетрама мишева који су након α -GalCer примили и MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само α -GalCer (средња вредност +/-SE, * $p < 0.05$).



Фигура 3. Примена MSCs смањује број IL-17+ NKT ћелија у јетри мишева којима је изазван хепатитис. Број IL-17+ NKT ћелија је значајно виши у јетри мишева који су примили само α -GalCer, у поређењу са мишевима који су након α -GalCer примили и MSCs (средња вредност +/-SE, * $p < 0.05$).

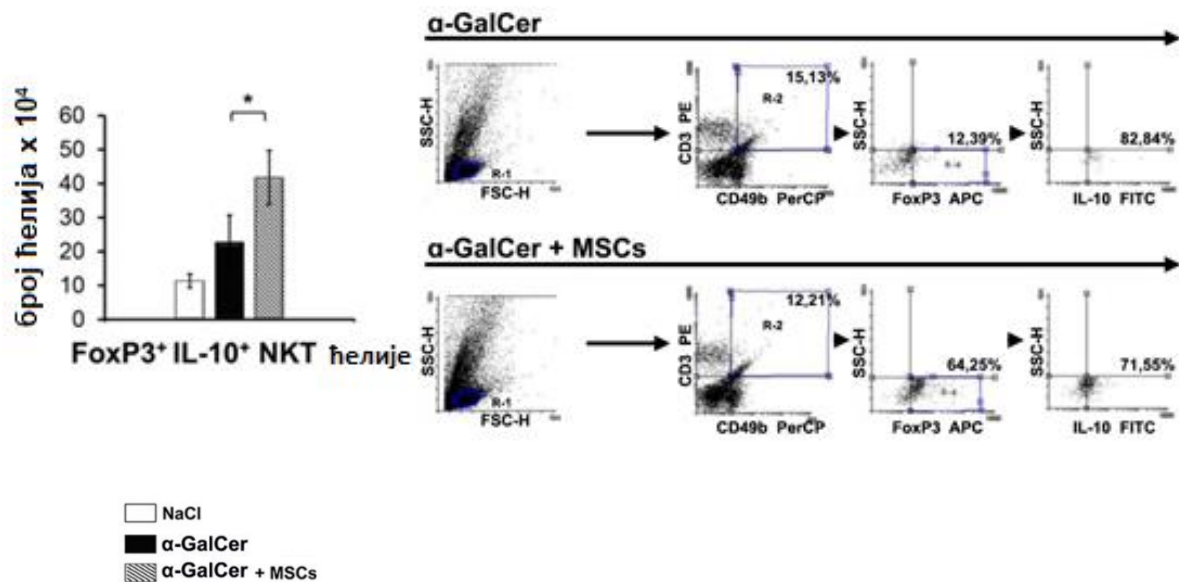
Приказани су репрезентативни плотови.

Према наведеном, MSCs смањују апсолутни број NKT ћелија које инфилтришу јетру и продукују IL-17 ($p < 0.05$) (Фигура 3) и исто тако смањују серумски ниво IL-17 ($p < 0.05$) (Графикон 6).



Графикон 6: MSCs смањују концентрацију IL-17 код мишева којима је изазван акутни хепатитис. Применом стандардног ELISA теста, показано је да је серумски ниво IL-17 значајно виши у серуму мишева који су примили само α -GalCer, у поређењу са мишевима који су након α -GalCer примили и MSCs (средња вредност \pm SE, $*p < 0.05$).

Осим што смањују број NKT ћелија које продукују IL-17, MSCs значајно повећавају број FoxP3⁺ IL10⁺ NKT ћелија, које имају регулаторну и хепатопротективну улогу (Фигура 4). Показано својство MSCs указује на њихове корисне ефекте у акутнох хепатитису, које остварују нарушавајући баланс између NKT ћелија које продукују IL-17 и регулаторних NKT ћелија (FoxP3⁺ IL10⁺).

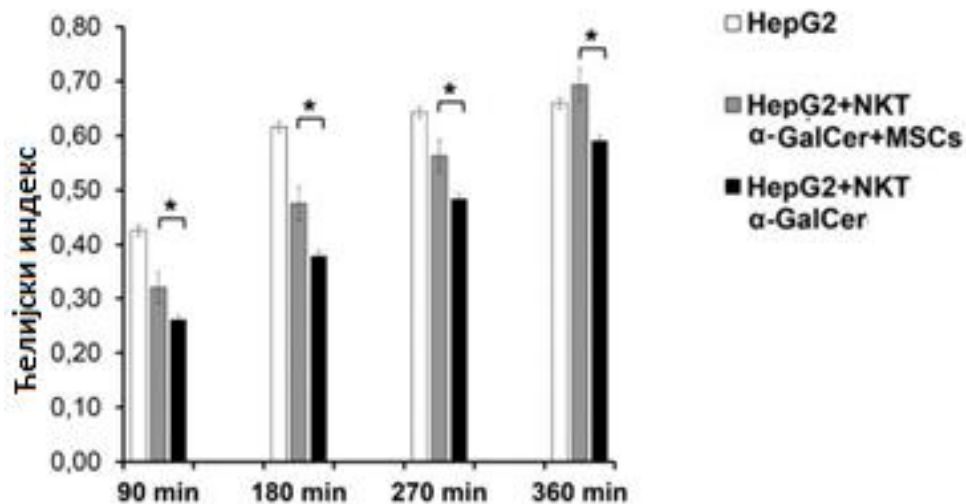


Фигура 4. MSCs повећавају број FoxP3⁺ IL10⁺ NKT ћелија у јетри. Применом проточне цитометрије, показан је значајно повећан апсолутни број FoxP3⁺ IL10⁺ NKT ћелија у у јетри мишева који су након α -GalCer примили и MSCs, у односу на мишеве који су примили само α -GalCer. (средња вредност +/-SE, *p<0.05). Приказани су репрезентативни плотови.

4.1.4. MSCs смањују хепатотоксичност NKT ћелија јетре.

Да би показали да је супресија NKT ћелија посредством MSCs, у вези са њиховом способношћу да изазову оштећење хепатоцита, анализирали смо цитотоксичност NKT ћелија (*in vitro*), применом xCELLigence система.

NKT ћелије, изоловане из јетре мишева који су примили и MSCs, поред α -GalCer, су значајно мање цитотоксичне за HepG2 ћелије, него NKT ћелије које су изоловане из јетре мишева који су примили само α -GalCer, показујући да примена мезенхималних матичних ћелија значајно смањује хепатотоксични потенцијал NKT ћелија јетре (Графикон 7).

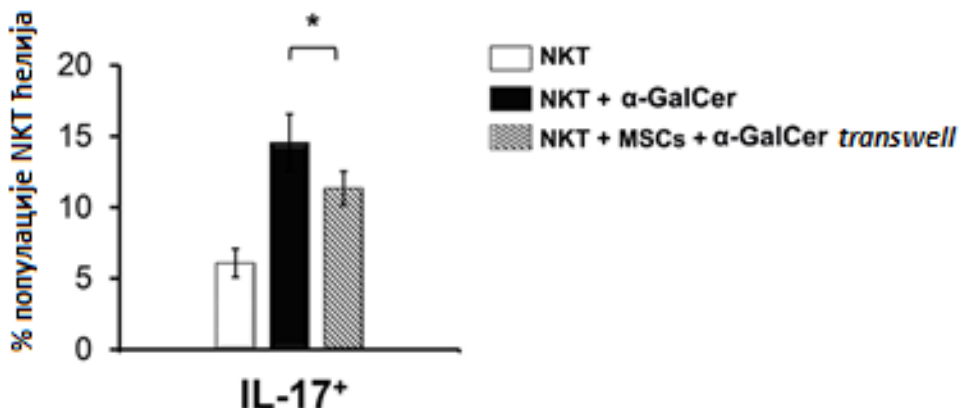


Графикон 7. Системска апликација MSCs смањује цитотоксичку активност NKT ћелија јетре према HepG2 туморским ћелијама. Резултати су представљени кроз ћелијски индекс таргет ћелија. Хепатотоксичност NKT ћелија изолованих из јетри мишева који су примили, α -GalCer и MSCs је значајно мања у поређењу са хепатотоксичношћу NKT ћелија изолованих из јетри мишева који су примали само α -GalCer. Приказане вредности су средње вредности +/- SE; * $p < 0.05$,

4.1.5. MSCs, паракриним механизмом, утичу на продукцију IL-17 у NKT ћелијама

У описаним резултатима је показано да MSCs супримирају продукцију IL-17 у NKT ћелијама. Познато је да мезенхималне матичне ћелије своје ефекте остварују директним контактом или путем својих продуката. Зато смо истражили да ли је директан међућелијски контакт неопходан, да би MSCs редуковале хепатотоксичност NKT ћелија јетре. Из тог ралога, MSCs и NKT ћелије (претходно активирани α -GalCer) су засејане у *transwell* систему, где ове ћелије нису у међусобном контакту, већ су одвојене мембраном која пропушта солубилне молекуле.

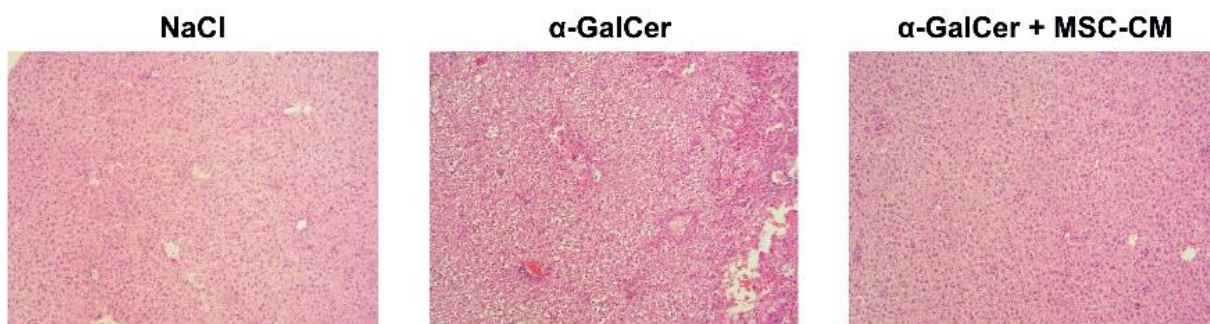
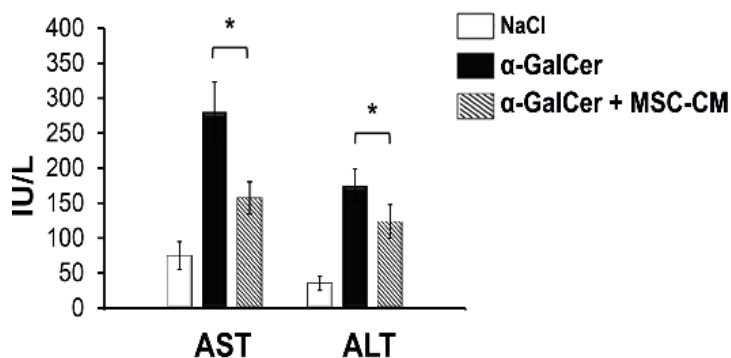
Интрацелуларно бојење је показало да NKT ћелије које су кокултивисане са MSCs, експримирају значајно нижи ниво IL-17 (Графикон 8), показујући да MSCs својим солубилном млекулима, односно паракрино, смањују продукцију IL-17 у NKT ћелијама.



Графикон 8. MSCs смањују број IL-17+ NKT ћелија продукцијом солубилних молекула. Процент NKT ћелија јетре које продукују IL-17 у акутном хепатитису, је значајно нижи код NKT ћелија које су кокултивисане са MSCs у *transwell* систему. Приказане вредности су средње вредности +/- SE; * $p < 0.05$.

Да би се потврдили резултати добијени у *in vitro* експерименту, мишеви су интравенски добили MSCs уз кондиционирани медијум (MSC-CM), чији је поступак добијања претходно описан. Добијени резултати су поткрепили претпоставке из претходног експеримента.

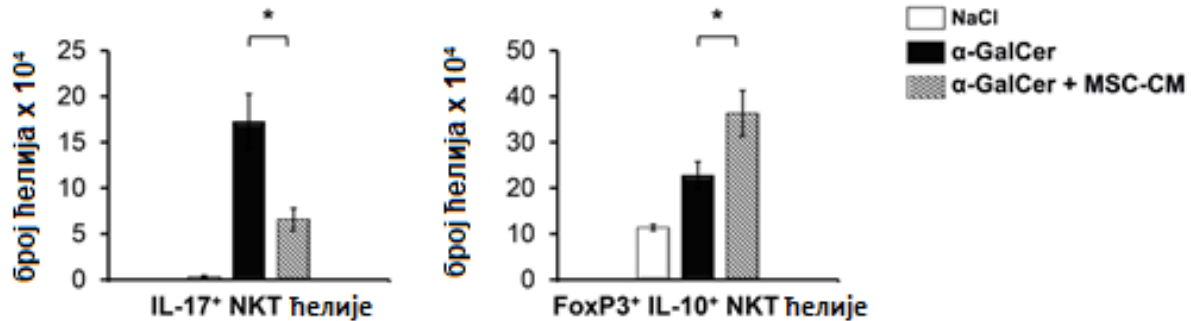
Интравенска ињекција MSC-CM значајно смањује ниво трансаминаза у серуму (AST и ALT) ($p < 0.05$) и смањује оштећење, односно некрозу хепатоцита која се уочава на хистолошким пресецима (Фигура 5).



Фигура 5. Концентрација трансминаза у серуму мишева након примене α -GalCer и MSC-CM. Концентрација АСТ и АЛТ у серуму оболелих мишева је била значајно нижа после примене MSC-CM (200 μ l). Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* p <0.05).

Приказани су репрезентативни исечци јетре мишева. Стандарно патохистолошко бојење (H&E), увећање \times 40. Добијену статистички значајну разлику потврђују и разлике у патохистолошким карактеристикама акутног хепатитиса.

Такође, примена MSC-СМ значајно смањује укупан број NKT ћелија јетре које продукују IL-17 и повећава број регулаторних FoxP3+IL-10+ NKT ћелија јетре, потврђујући да MSCs, паракриним механизмима, утичу на продукцију IL-17 и IL-10, као и на експресију FoxP3 у NKT ћелијама (Графикон 9).



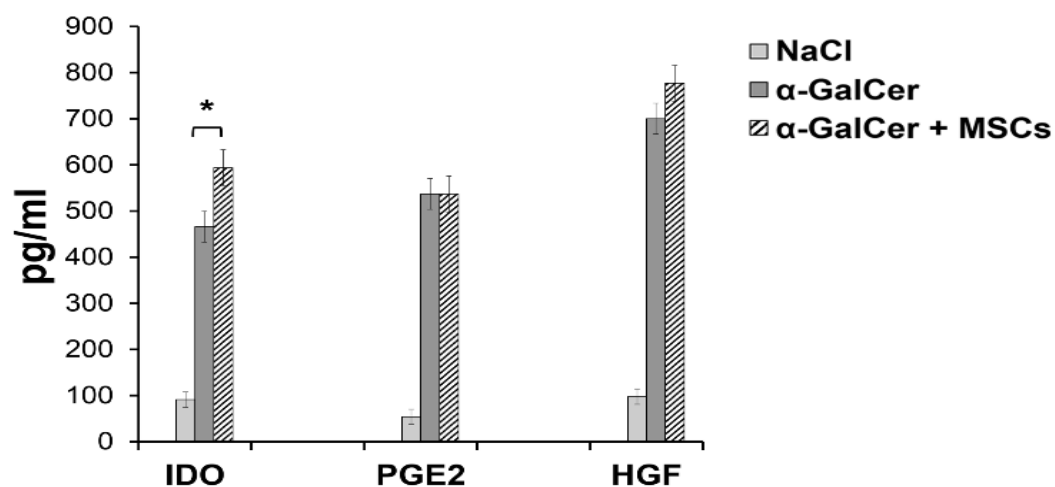
Графикон 9. Број NKT ћелија у јетри мишева након примене α -GalCer и MSC-СМ. Број IL-17+ NKT ћелија је био значајно нижи у оболелих мишева који су примили MSC-СМ, док је број FoxP3+ IL-10+ NKT ћелија био значајно виши у истој експерименталној групи. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност \pm SE (* p <0.05).

4.1.6. Смањење хепатотоксичности NKT ћелија, посредством MSCs, зависи од индоламин 2, 3 деоксигеназе

Описано је да су, међу бројним солубилним продукцима које луче MSCs, индоламин 2, 3 деоксигеназа (енг. *indoleamine 2, 3 deoxygenase*, IDO), простагландин E2 (енг. *prostaglandyne* E2, PGE2) и фактор раста хепатоцита (HGF) најзначајнији медијатори који супримирају продукцију цитокина у ћелијама имунског система.

Ови имуносупресивни фактори су мерени у серуму експерименталним животиња са акутним хепатитисом, који су једнократно примили MSCs.

Ниво IDO у серуму је значајно виши код мишева који су примили MSCs, док не постоји разлика у серумским нивоима PGE2 и HGF између експерименталних група мишева са акутним хепатитисом, тј оних који су примали MSCs и оних који нису (Графикон 10).

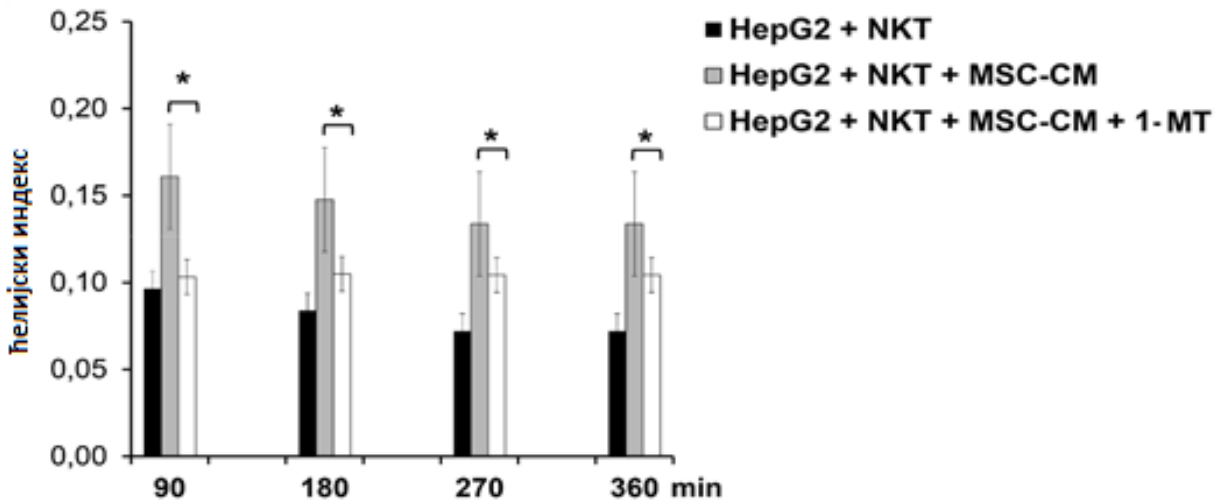


Графикон 10. MSCs повећава концентрацију солубилних продуката у серуму оболелих мишева. Концентрација IDO је значајно виша у групи мишева који су примили α -GalCer и MSCs у односу на серум мишева који су примали само α -GalCer. Није уочена статистички значајна разлика у концентрацији PGE2 и HGF. Приказане вредности су средње вредности \pm SE; * $p < 0.05$.

У складу са *in vivo* добијеним резултатима, MSC-СМ значајно снижава хепатотоксичност NKT ћелија *in vitro* (Графикон 11), потврђујући да MSCs паракриним путем смањују хепатотоксичност NKT ћелија јетре. Хепатопротективни ефекат MSC-СМ се у потпуности укида блокажем активности IDO.

MSC-СМ који садржи 1-метил триптофан (1-MT) који је инхибитор активности IDO, не смањује хепатотоксичност NKT ћелија јетре на HerpG2, указујући на то да ефекат који

мезенхималне матичне ћелије имају на NKT ћелије јетре, зависи од продукције индоламин 2,3 деоксигеназе.



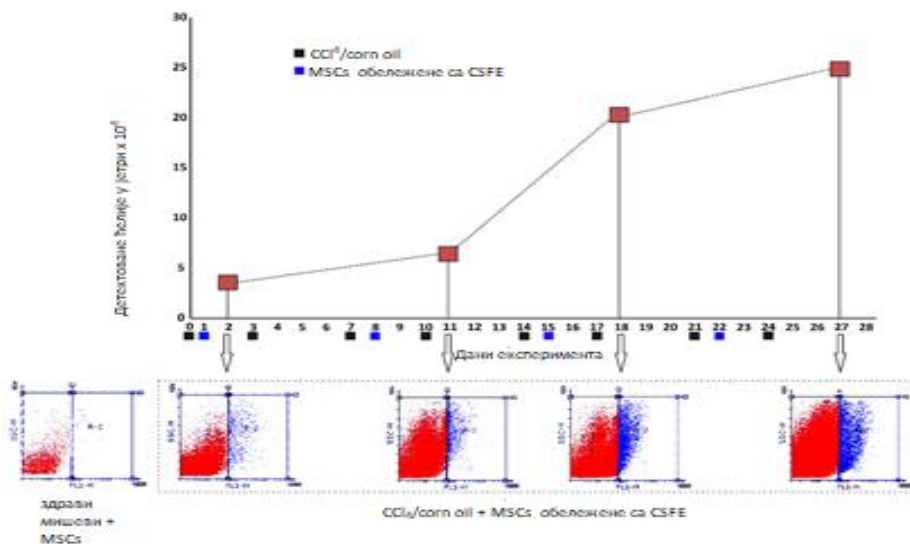
Графикон 11. Имуносупресивни утицај mSCs на ефекторске функције NKT ћелија зависи од IDO. *In vitro* стимулисане NKT ћелије (α -GalCer; 100ng/ml) су култивисане у трајању у MSC-CM, односно MSC-CM + 1-MT. Присуство 1-MT (1 mM) у MSC-CM је прекинуло супресивни утицај кондиционираног медијума на цитотоксички потенцијал NKT ћелија према циљним HepG2 ћелијама. Приказане вредности су средње вредности \pm SE; * $p < 0.05$.

4.2. УТИЦАЈ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА НА СИГНАЛНИ ПУТ IL-17 У МОДЕЛУ ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ

4.2.1. Интравенски ордиране MSCs мигрирају у јетру експерименталних животиња који су примали CCl₄ и смањују изазвану фибозу.

MSCs које су апликоване интравенски, мигрирају у јетру, и да оштећење ткива и инфламација поспешују ефикасност миграције. У нашем експерименту, флуоресцентно обележене MSCs, изоловане из јетре експерименталних животиња, су детектоване 2., 11., 18. и 27. дана експеримента. Апсолутан број регистрованих MSCs по органу је израчунат на основу претходно описане формуле ($n = m_g / m_a \times v_1 / v_2 \times 100\,000 / \underline{x}$).

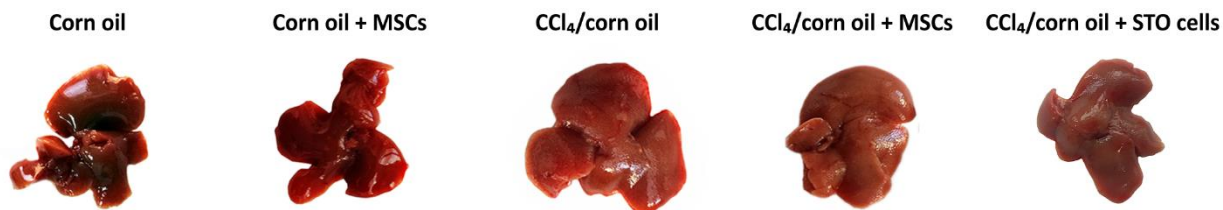
Флуоресцентно обележене MSCs су, прво, детектоване након након 24 часа од интравенске апликације, и њихов апсолутни број (израчунат према формули) је експоненцијално растао након сваке апликације, што је приказано на Фигури 6.



Фигура 6. Детекција системски апликованих MSCs у јетру мишева након 2., 11., 18. И 27. дана експеримента сата у току индукције фиброзе јетре применом CCl₄. Флуоресцентно (CFSE) обележене MSCs мигрирају у јетру мишева којима је индукована јетре и њихов број експоненцијално расте током трајања експеримента.

4.2.2. Примена MSCs, као и у акутном хепатитису, значајно слаби фиброзу јетре, изазвану CCl₄, што је потврђено макроскопским и микроскопским карактеристикама, вредностима трансаминаза у серуму и квантитативном RT-PCR анализом.

На Слици 5 приказан је макроскопски изглед изолованих јетри контролних и експерименталних група. На јетрама мишева који су примили CCl₄ се уочава већи број нодуса који прате патолошку површину. За разлику од њих, јетре мишева који су примали и MSCs, показују униформу текстуру, глатке површине, слично јетрама мишева из контролних група (мишеви који су третирани са кукурузним уљем или са кукурузним уљем и MSCs), указујући да су и макроскопске промене које карактеришу фиброзу јетре значајно смањене код групе мишева који су примали MSCs.



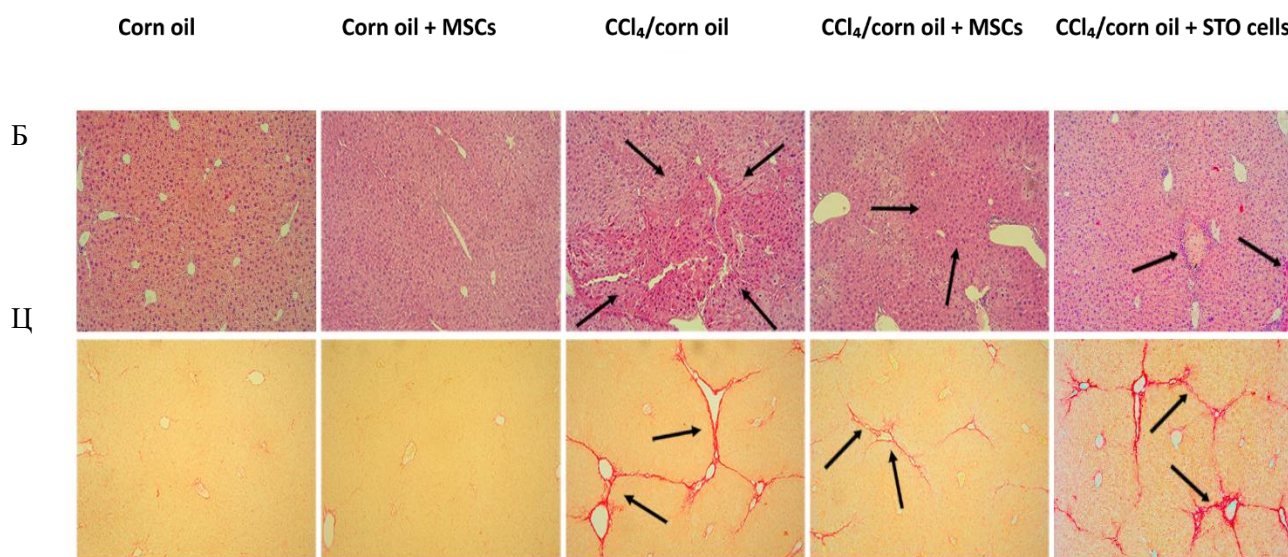
Слика 5: Макроскопски изглед јетри мишева.

Бојење хистолошких исечака хематоксилином и еозином јетри мишева који су примили CCl₄ показује оштећење хепатоцита, централну конгестију у лобусима уз присутну инфилтрацију инфламацијским ћелијама. У централним и интерлобуларним просторима, уочава се некроза појединачних хепатоцита и балон дегенерација ћелија (промене које показују црне стрелице). Описане промене су удружене са фиброзом и инфилтрацијом инфламацијским ћелијама. Карактеристично, физиолошку структуру лобулуса јетре

заменеју регенеративни чворићи, који су међсобно повезани фиброзним ткивом у виду септи.

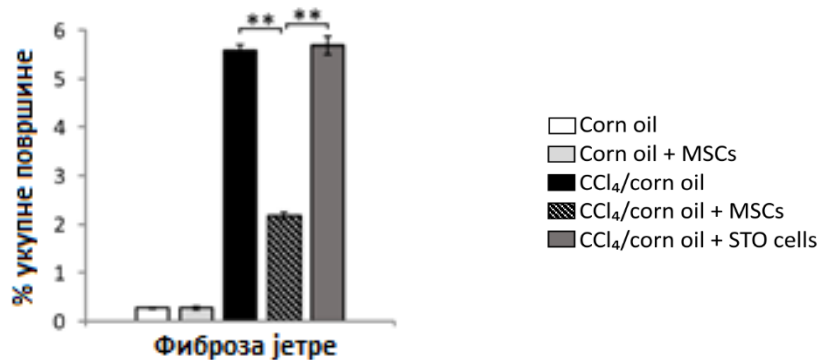
Насупрот променама описаним на хистолошким препаратима јетри мишева који су примили CCl_4 , на хистолошким препаратима јетри мишева који су примали и MSCs уочава се неколико мањих зона некротичног ткива.

Употребом *Sirius red* технике, хистолошки препарати јетри мишева третираних CCl_4 , показују екстензивно депоновање колагена који доводи до формирања псеудолобулуса (описане промене су показане црним стрелицама) што указује на развој фиброзе јетре.



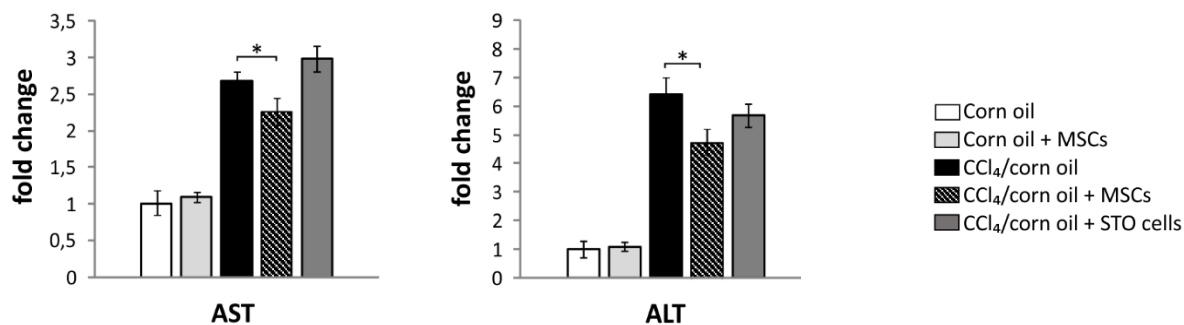
Слика 6. Репрезентативни исечци јетре мишева. А: Стандарно патохистолошко бојење (H&E); Б: Примена *Sirius red* технике, визуелизација депоновања колагена. Увећање x40.

У складу са претходно описаним микроскопским разликама између експерименталних група, израчунат је проценат заступености фиброзног ткива јетре, који је значајно мањи код мишева који су третирани MSCs ($p < 0.01$) (Графикон 12).



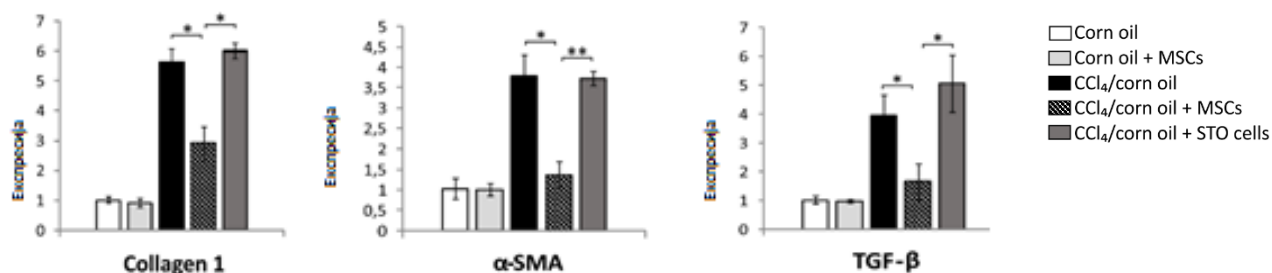
Графикон 12. MSCs смањују проценат фиброзе јетре. Процент фиброзе јетре је значајно нижи у групи оболелих мишева који су примали MSCs, у односу на групе мишева које су примале само CCl₄, односно CCl₄+ STO ћелије. Приказане вредности су средње вредности ± SE; ** p<0.01.

Измерене вредности AST и ALT у серуму су значајно ниже код мишева који су примили MSCs ($p < 0.05$), у односу на мишеве који су третирани само CCl₄ (Графикон 13).



Графикон 13. Концентрација трансаминаза у серуму мишева након примене CCl₄ и MSCs у фибрози јетре. Концентрација трансаминаза (AST и ALT) је статистички значајно мања у серуму мишева који су током примене CCl₄ примали и MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само CCl₄ (средња вредност ± SE, *p<0.05).

Мерењем експресије гена профиброгених маркера: колагена тип 1 (енг. *collagen-1*), α актина глатких мишића (енг. *α -smooth muscle actin*, α -SMA) и трансформишућег фактора раста β (енг. *transforming growth factor- β* , TGF- β) који је познат као најзначајнији профибриногени цитокин у развоју фиброзе органа, показано је да су ови маркери значајно снижени у јетри мишева који су третирани мезенхималним матичним ћелијама ($p < 0.05$). Ови резултати, добијени квантитативном RT-PCR су у корелацији са претходно описаним макроскопским и микроскопским разликама и разликама у нивоу трансминаза у серуму између експерименталних група, што показује да су фиброзне промене јетре, изазване понављаним апликацијама CCl₄, значајно ублажене применом MSCs (Графикон 14).

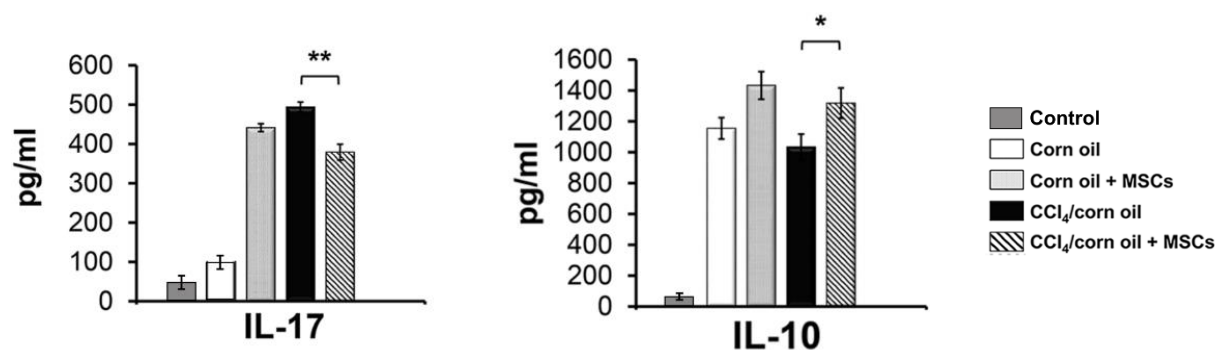


Графикон 14. RT-PCR анализа експресије гена у хомогенатима јетре након примене CCl₄ и MSCs. Експресија гена за Collagen-1, α -SMA и TGF- β је значајно снижена у хомогенатима оболелих мишева код којих је фиброза јетре изазвана CCl₄, у односу на групе мишева који су примили само CCl₄, односно CCl₄+ STO ћелије. Приказане вредности су средње вредности \pm SE; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Обзиром да STO ћелије немају утицај на развој фиброзе, примена STO ћелија, под истим условима као и MSCs је показала да су описани ефекти у супресији фиброзе специфична карактеристика MSCs.

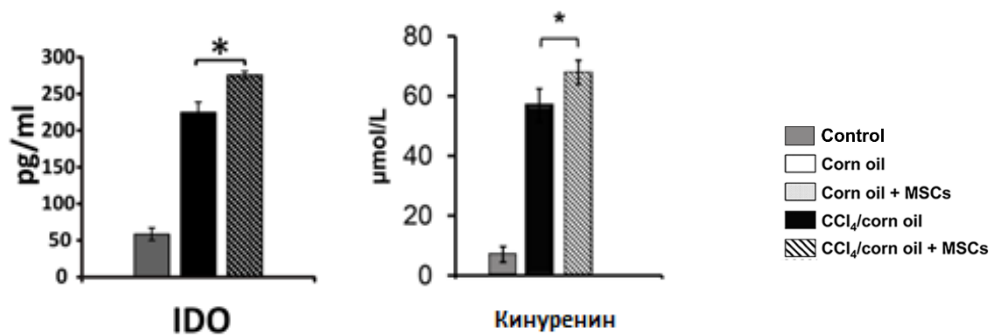
4.2.3. MSCs смањују ниво IL-17 у серуму и инфилтрацију CD4+ Т лимфоцита који продукују IL-17 у јетрама мишева третираних CCl₄.

Смањење фиброзе јетре, применом MSCs, је у корелацији са сниженом концентрацијом инфламаторног и профиброгеног IL-17 ($p < 0.01$) и повишеном концентрацијом имunosупресивног и хепатопротективног IL-10 ($p < 0.05$) у серуму мишева који су примали MSCs, што је приказано на Графикону 15.



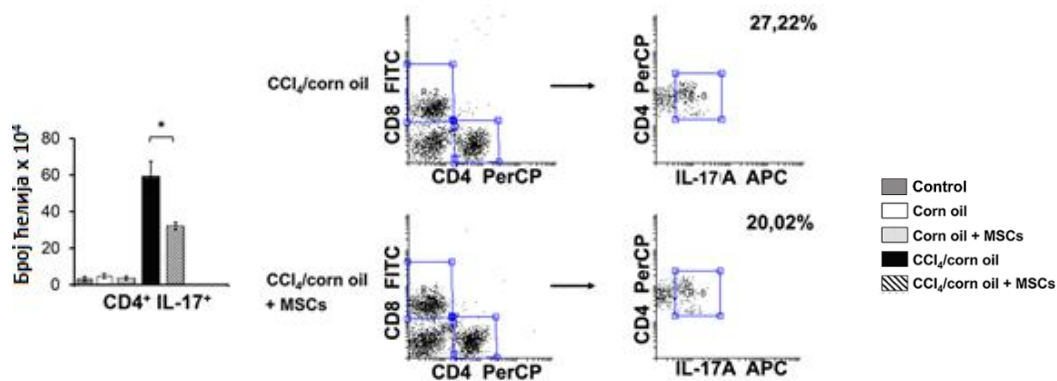
Графикон 15. MSCs смањују концентрацију IL-17 код мишева којима је изазвана фиброза јетре. Применом стандардног ELISA теста, показано је да је серумска концентрација IL-17 значајно виша и концентрација IL-10 значајно нижа у серуму мишева који су примали само CCl₄, у поређењу са мишевима који су уз CCl₄ примали и MSCs. (средња вредност +/-SE, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

Поред утицаја на серумску концентрацију IL-17 и IL-10, примена MSCs у овом моделу фиброзе јетре је значајно повећала серумску концентрацију IDO, солубилног продукта ($p < 0.05$) и завршног продукта ензимске активности IDO – кинуренина ($p < 0.05$). Разлика је статистички значајна у односу на серумске концентрације код мишева који су примали само CCl₄, указујући на значај овог ензима у дејству MSCs на фиброзу јетре која настаје као последица активности IL-17. (Графикон 16).

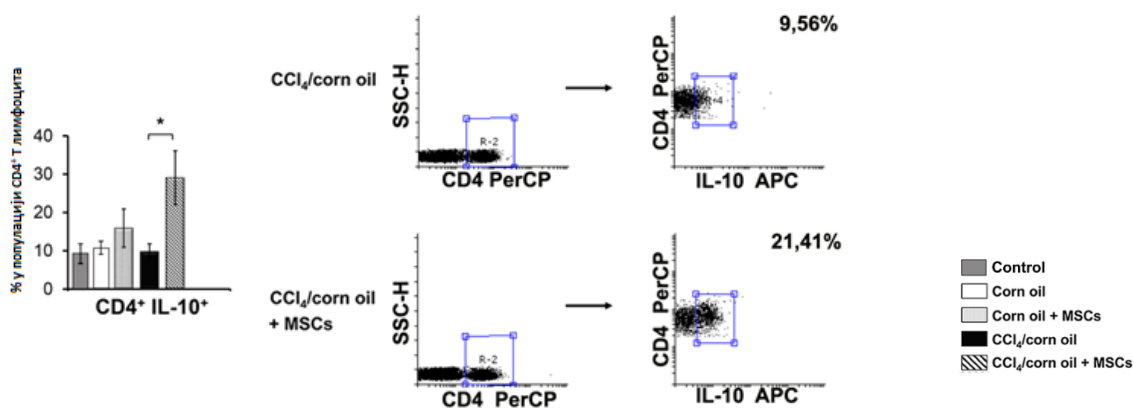


Графикон 16: MSCs смањују концентрацију IDO и конуренина код мишева којима је изазвана фиброза јетре. Применом стандардног ELISA теста, показано је да је серумска концентрација IDO и кинуренина значајно нижа у серуму мишева који су примали само CCl₄, у поређењу са мишевима који су уз CCl₄ примали и MSCs. (средња вредност +/-SE, * $p < 0.05$).

Када је утврђено да примена MSCs утичне на развој фиброзе, поставило се питање и механизма ове модулације. Да би се утврдио ћелијски супстрат на који делују MSCs, учињена је проточна цитометрија мононуклеара који се налазе у инфилтратима јетре. Интрацелуларно бојење је показало значајно нижи број IL-17+ CD4+ Т лимфоцита ($p < 0.01$), односно Th17 субсет CD4+ Т лимфоцита, као и значајно повишен проценат IL-10 CD4+ Т лимфоцита ($p < 0,05$) (Фигура 7) у оболелих мишева који су примали MSCs, у односу на оне који су примали само CCl₄.

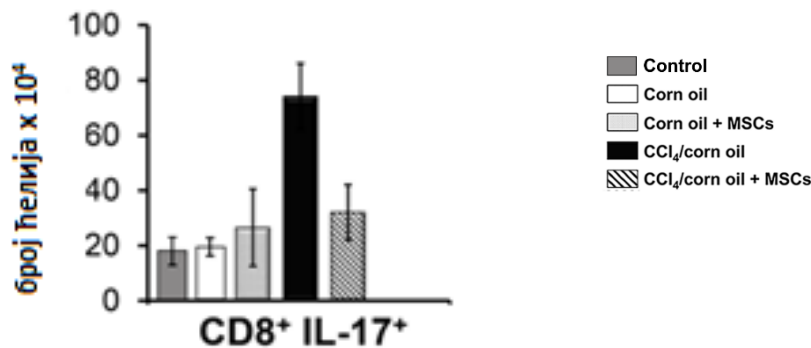


Фигура 7. Примена MSCs смањује број CD4⁺ IL-17⁺ Т лимфоцита у јетри мишева којима је изазвана фиброза. Број IL-17⁺ CD4⁺ Т лимфоцита је значајно виши у јетри мишева који су примали само CCl₄, у поређењу са мишевима који су поред CCl₄ примали и MSCs (средња вредност +/-SE, *p<0.05). Приказани су репрезентативни плотови.



Фигура 8. Примена MSCs повећава проценат CD4⁺ IL-10⁺ Т лимфоцита у јетри мишева којима је изазвана фиброза. Процент CD4⁺ IL-10⁺ Т лимфоцита је значајно виши у јетри мишева који су поред CCl₄ примали и MSCs у поређењу са мишевима који су примали само CCl₄, који су (средња вредност +/-SE, *p<0.05). Приказани су репрезентативни плотови.

Насупрот добијеним разликама у вредностима CD4+ Т лимфоцита између експерименталних група, не постоји статистички значајна разлика у апсолутном броју IL-17+ CD8+ Т лимфоцита између ових група (Графикон 17), што указује да су CD4+ Т лимфоцити циљне ћелије преко којих MSCs остварују модулацију производње IL-17 у јетри.



Графикон 17. Примена MSCs не мења број CD8+ IL-17+ Т лимфоцита. Не постоји статистички значајна разлика у апсолутном броју CD8+ IL-17+ Т лимфоцита, између експерименталне групе оболели мишева и групе оболелих мишева који су примили MSCs. Приказане вредности су средње вредности ± SE.

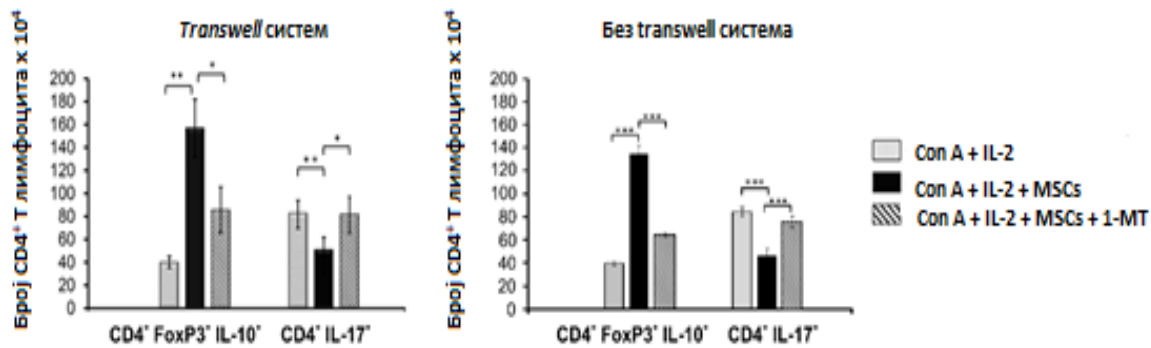
4.2.4. MSCs паракриним механизмом супримирају Th17 лимфоците

Претходним резултатима је показано да MSCs супримирају Th17 субсет CD4+ Т лимфоцита. Међутим, није познато да ли је директан међућелијски контакт између ове две популације неопходан за описану супресију ли MSCs преко својих слоубилних молекула супримирају Th17 јетре. Зато су MSCs и CD4+ Т лимфоцити јетре (претходно изоловани) *in vitro* култивисани у директној кокултури или у *transwell* систему, који пермеабилном

мембраном физички раздваја ове две ћелијске популације, а омогућава пролаз солубилних молекула.

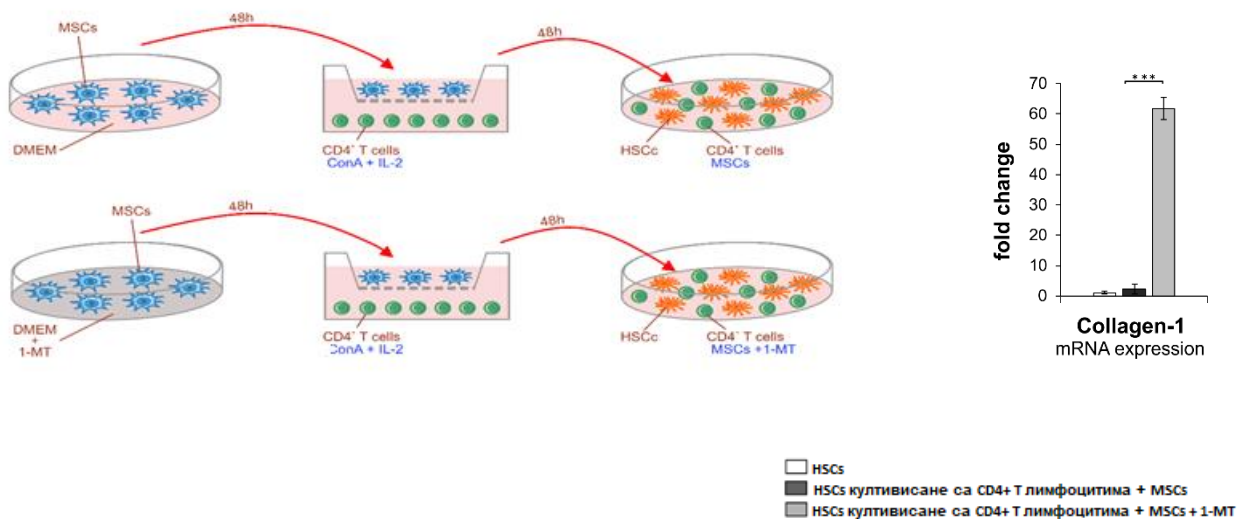
Резултати добијени проточном цитометријом показују статистички значајно нижи апсолутни број активираних CD4+ Т лимфоцита који продукују IL-17 а који су кокултивисани са MSCs у *transwell* систему, у поређењу са стимулираним CD4+ Т лимфоцитима, култивисаним без MSCs ($p < 0.01$) (Графикон 18). Слично претходно добијеним резултатима, солубилни продукти мезенхималних матичних ћелија значајно повећавају апсолутан број Foxp3+ CD4+ Т лимфоцита који продукују IL-10 ($p < 0.01$) (Графикон 18). Слични резултати су добијени у експерименту где су MSCs и CD4+ Т лимфоцити јетре култивисани у директном контакту, односно без *transwell* система, ($p < 0.01$) (Графикон 18). Добијени резултати показују да MSCs, паракриним механизмом, утичу на повећање броја регулаторних CD4+FoxP3+ Т лимфоцита (*Tregs*) и супримирају Th17 лимфоците.

Међутим, описани феномен у потпуности нестаје у присуству 1-метил триптофана (енг. *1-methyl tryptophan*, 1-MT), инхибитора ензимске активности IDO, односно постоји значајно повећање броја Th17 лимфоцита, и насупротив томе статистички значајно смањење регулаторних Т лимфоцита који продукују IL-10, што доводи до закључка да MSCs, преко ензима IDO, утичу на однос Th17/*Tregs* у експерименталном моделу фиброзе јетре.



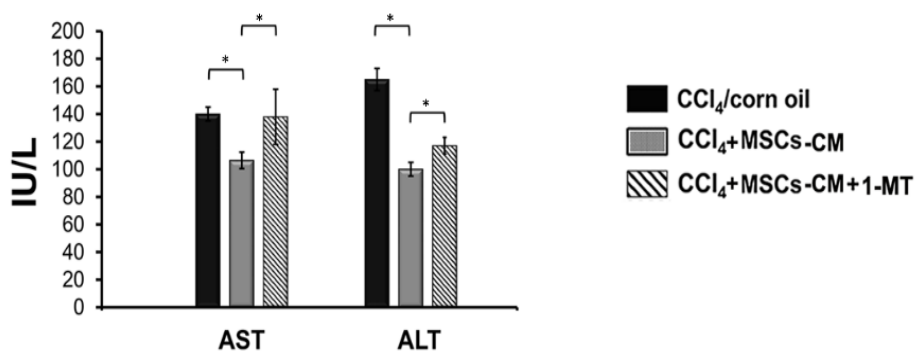
Графикон 18. Примена IDO инхибитора, 1-MT блокира имуносупресивна својства MSCs на CD4+ Т лимфоците кокултивисане у *transwell* систему и без њега. Примена 1-MT значајно повећава број CD4+ IL-17+ Т лимфоцита, а смањује број CD4+ FoxP3+ IL10+ Т лимфоцита и у *transwell* систему и без њега. Приказане вредности су средње вредности ± SE. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

Да би потврдили добијене резултате, да MSCs преко IDO, супримирају развој фиброзе, изоловали смо HSCs јетре, према описаном протоколу и кокултивисали са MSCs и активираним CD4⁺ Т лимфоцитима у једној групи и са MSCs и активираним CD4⁺ Т лимфоцитима уз инхибитор активности IDO - 1-МТ. Након 48 часова, спроведена је квантитативна RT-PCR анализа експресије гена за *Collagen-1* (Фигура 9). Постоји значајно нижа експресија гена за *Collagen-1* ($p < 0.01$) у HSCs у групи без 1-МТ, показујући тако значај IDO за функцију MSCs у циљу супресије CD4⁺ Т лимфоцита у активацији HSCs (Фигура 9).



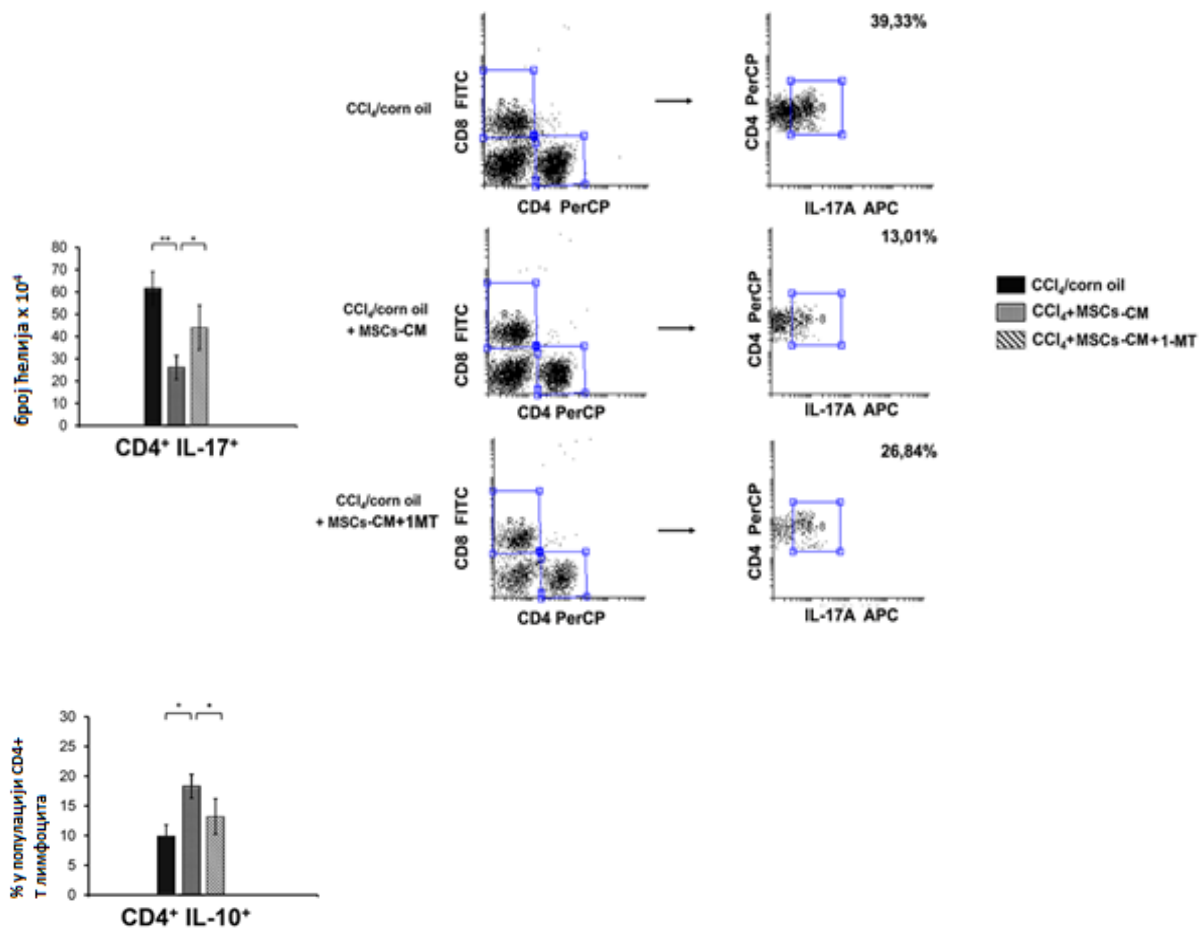
Фигура 9. Шематски приказ кокултивације CD4⁺ Т лимфоцита са MSCs, односно MSCs + 1-МТ у току 48 часова након чега су исте групе култивисане са HSCs. Из добијеног ћелијског узорка, квантитативном RT-PCR анализом је показано да је вредност колагена 1 у групи HSCs + MSCs + 1-МТ значајно виша у односу на групу без 1-МТ. Приказане вредности су средње вредности ± SE. ** $p < 0.01$.

У складу са резултатима добијеним у *in vitro* експериментима, примена MSC-СМ на анималном моделу значајно смањује серумске вредности АСТ ($p < 0.05$) и АЛТ ($p < 0.05$), што је показано на Графикону 19.

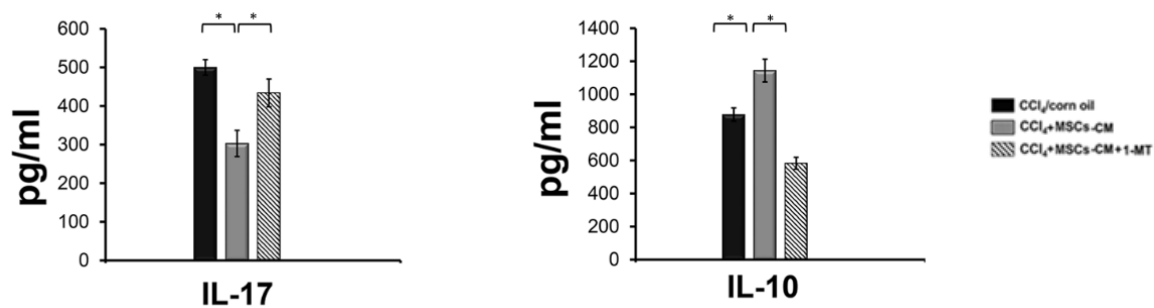


Графикон 19. Концентрација трансаминаза у серуму мишева након примене CCl₄ и MSCs у фибрози јетре. Концентрација трансаминаза (АСТ и АЛТ) је статистички значајно мања у серуму мишева који су током примене CCl₄ примали и MSC-СМ, у поређењу са мишевима који су примили CCl₄ + MSCs + 1-МТ (IDO инхибитор) (средња вредност ± SE, * $p < 0.05$).

Интрацелуларно бојење, применом проточне цитометрије је анализиран апсолутан број и проценат CD4⁺ Т лимфоцита, и показује да примена MSC-СМ значајно смањује инфилтрацију јетре бројем CD4⁺ Т лимфоцитима који продукују IL17 ($p < 0.01$) (Фигура 10) и значајно повећава проценат CD4⁺ Т лимфоцита који продукују IL-10 ($p < 0.05$) код оболелих мишева (Фигура 10), што је у корелацији са сниженом концентрацијом профиброгеног IL-17 ($p < 0.05$) и повишеном концентрацијом хепатопротективног IL-10 ($p < 0.05$) (Графикон 20).



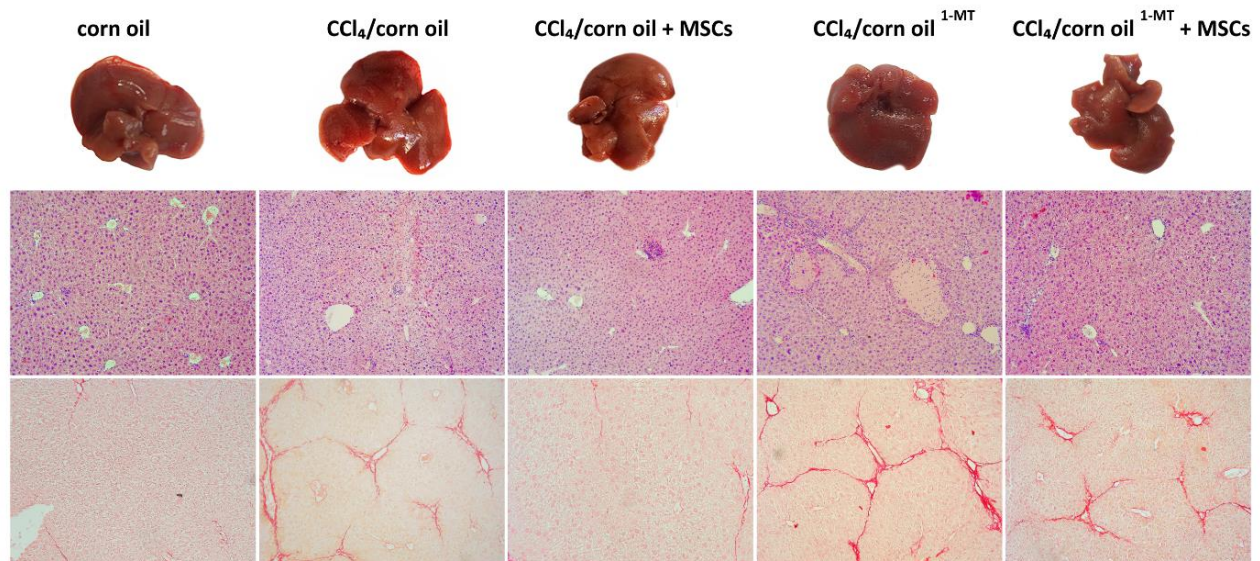
Фигура 10. Примена MSCs-CM смањује број CD4⁺ IL-17⁺ Т лимфоцита у јетри мишева којима је изазвана фиброза. Број IL-17⁺ CD4⁺ Т лимфоцита је значајно виши, док је проценат CD4⁺ IL-10⁺ Т лимфоцита значајно нижи у јетри мишева који су примали CCl₄ +MSCs+1-MT, у поређењу са мишевима који су поред CCl₄ примали и MSCs, односно само CCl₄, указујући да IDO инхибиција у потпуности блокира имunosупресивни ефекат MSCs (средња вредност +/-SE, **p<0.01, *p<0.05).



Графикон 20: MSCs смањују концентрацију IL-17 код мишева којима је изазвана фиброза јетре. Применом стандардног ELISA теста, показано је да је серумска концентрација IL-17 значајно виша и концентрација IL-10 значајно нижа у серуму мишева који су примали CCl₄+MSCs+1-MT, у поређењу са мишевима који су поред CCl₄ примали и MSCs, оодносно само CCl₄, указујући да IDO инхибиција у потпуности блокира имunosупресивни ефекат MSCs (средња вредност +/-SE, * $p < 0.05$).

Такође, инхибиција IDO смањује способност MSC-CM да повећа проценат IL-10+ CD4+ T лимфоцита ($p < 0.05$, Фигура 10), већ је апсолутни број IL-17+ CD4+ T лимфоцита значајно повећан у групи оболелих мишева који су примили MSC-CM и 1-MT ($p < 0.05$), што потврђује претходне резултате, да способност MSCs да супримирају инфилтрацију јетре Th17 лимфоцитима зависи од IDO.

4.2.5. Примена 1-MT *in vivo* погоршава фиброзу јетре



Слика 7: Макроскопски изглед јетри мишева.

Репрезентативни исечци јетре мишева. А: Стандарно патохистолошко бојење (H&E); Б: Примена *Sirius red* технике, визуелизација депоновања колагена. Увећање x40.

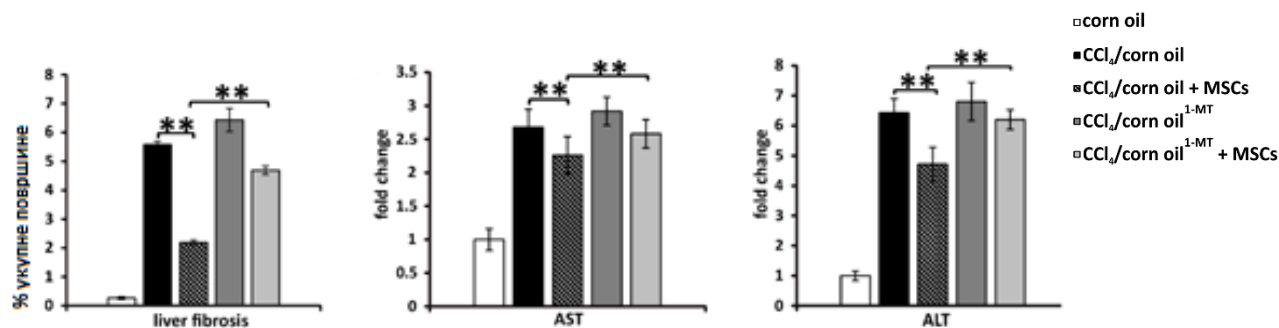
Да би потврдили претходно добијене резултате, једној групи мишева је, у води за пиће, растворен 1-MT. Након жртвовања, добијени су следећи резултати:

Макорскопским прегледом се уочава да јетра мишева који су пили 1-MT, а примили су MSCs изгледа слично јетри мишева који нису примили MSCs, тј показује ирегуларне контуре са једним или више нодуса на површини (Слика 7).

Бојење хистолошких исечака хематоксилином и еозином јетри мишева који су пили 1-MT као и код мишева који су примили MSCs и прили 1-MT показује израженије оштећење хепатоцита, са пратећим инфламацијским инфилтратом, некрозом појединачних

хепатоцита и формирањем регенеративних фиброзних септи. Ове промене се не запажају на јетрама мишева који су примили само MSCs (Слика 7).

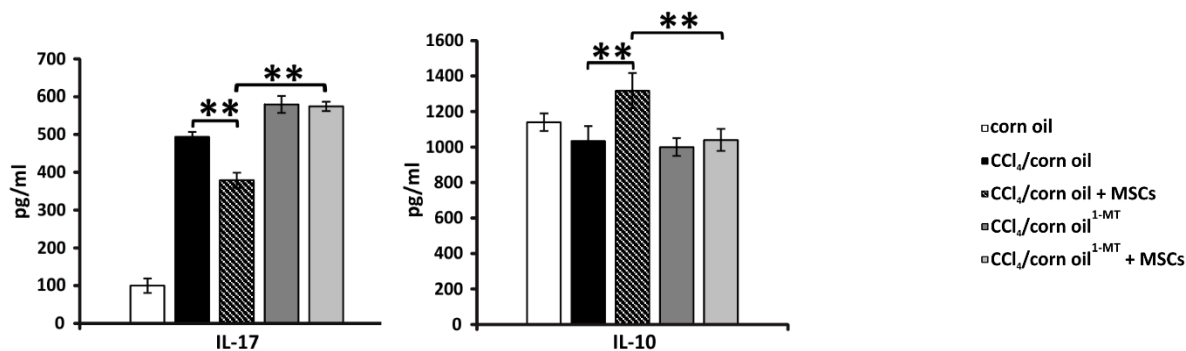
На слици 5 су приказани хистолошки препарати са применом *Sirius red* технике, јетре мишева третираних CCl₄+MSCs+1-MT показују екстензивно депоновање колагена који доводи до формирања псеудолобулуса што указује на развој фиброзе јетре, за разлику од мишева који нису пили 1-MT.



Графикон 21. Примена 1-MT, IDO инхибитора блокира имunosупресивни ефекат MSCs *in vivo*. Процент фиброзе, као и серумске вредности трансаминаза јетре су значајно нижи у групи оболелих мишева који су пили 1-MT. Приказане вредности су средње вредности ± SE; ** p<0.01.

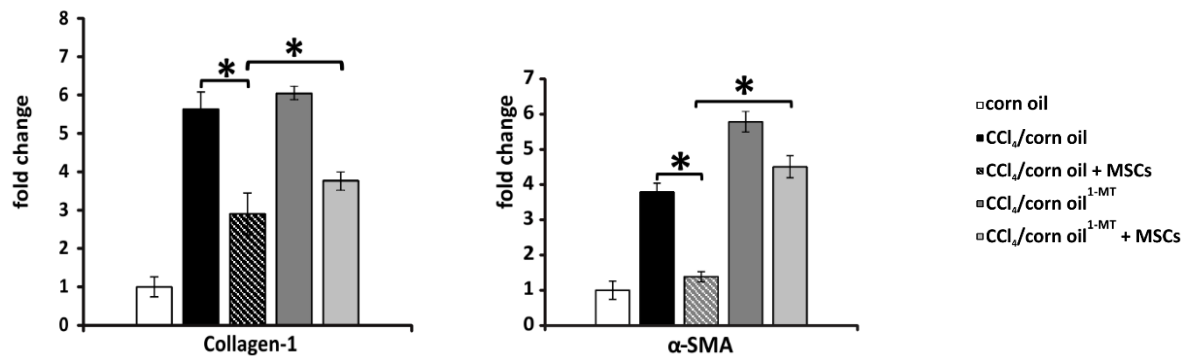
Постоји статистички значајна разлика у проценту фиброзе између експерименталних група мишева, односно, проценат фиброзе је значајно мањи у групи која је третирана са CCl₄ и MSCs у односу на групу која је примала само CCl₄. (Графикон 21, p<0.01). Такође, постоји статистички значајно мањи проценат фиброзе у експерименталној групи која је поред CCl₄ и MSCs пила 1-MT, у односу на групу која је примила само CCl₄ и MSCs (Графикон 21, p<0.01).

Описане макроскопске и микроскопске разлике између експерименталних група мишева на Слици 5, су поткрепљене добијеним вредностима трансaminaза. Наиме, значајна је разлика у вредностима АСТ и АЛТ између групе мишева код којих је фиброза јетре изазвана CCL₄ у односу на групу мишева који су примали CCL₄ и MSCs (Графикон 21, p<0.01), као и између група мишева који су примили CCL₄ и MSCs и CCL₄ и MSCs + 1-МТ (Графикон 21, p<0.01), односно вредности трансaminaза су значајно мање у групи мишева који су третрани MSCs. Наведени резултати показују да примена IDO инхибитора *in vivo*, поништава имуномодулацијско дејство мезенхималних матичних ћелија и омогућава развој фиброзе у овим експерименталним групама.



Графикон 22: Примена 1-МТ, IDO инхибитора блокира имуносупресивни ефекат MSCs *in vivo*. Применом стандардног ELISA теста, показано је да је серумска концентрација IL-17 значајно виша и концентрација IL-10 значајно нижа у серуму мишева који су пили 1-МТ. Приказане вредности су средње вредности ± SE; ** p<0.01.

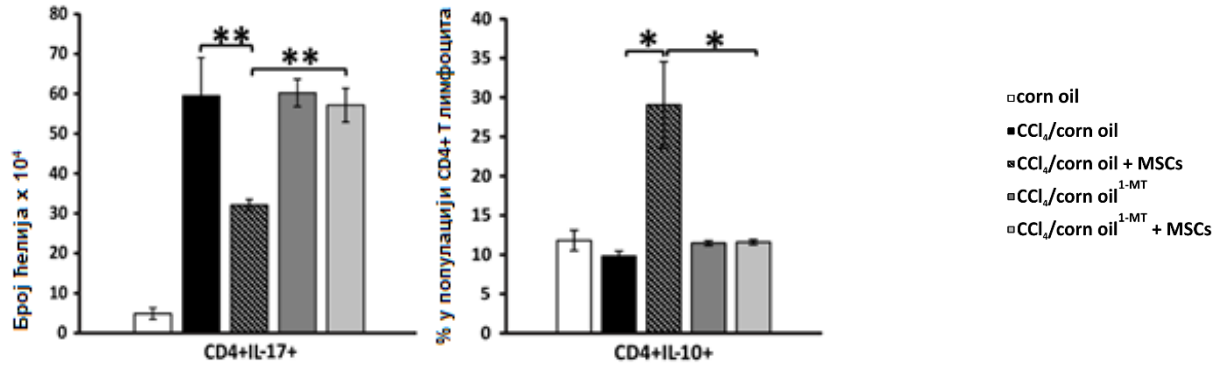
Серумске вредности мерених цитокина (IL-17 и IL-10) иду у прилог претходним резултатима. Концентрација IL-17 и IL-10 су значајно мање у експерименталној групи која је примала и MSCs, у односу на групу која је примала само CCL₄ (Графикон 22, p<0.01). Такође концентрација IL-17 и IL-10 је значајно виша у експерименталној групи мишева код које је применом 1-МТ блокирана активност IDO, у односу на групу мишева код које је изазвана фиброза јетре и који су примали MSCs (Графикон 22, p<0.01).



Графикон 23.: Примена 1-МТ, IDO инхибитора блокира имunosупресивни ефекат MSCs *in vivo*. Кванитативна експресија гена за Collagen-1 и α-SMA у серуму мишева који су пили 1-МТ. Приказане вредности су средње вредности ± SE; * p<0.05.

Квалитативна RT-PCR је показала статистички значајну разлику између експресије гена за Collagen-1 и α-SMA. Вредности Collagen-1 су значајно мање у групи која је примала CCl₄ и MSCs, у односу на групу која није третирана са MSCs. (Графикон 23, p<0.05) и у односу на групу у којој је IDO блокиран применом 1-МТ (Графикон 23, p<0.05).

Такође, вредности α-SMA су значајно мање у групи која је примала CCl₄ и MSCs, у односу на групу која није третирана са MSCs. (Графикон 23, p<0.05) и у односу на групу у којој је IDO блокиран применом 1-МТ (Графикон 23, p<0.05).



Графикон 24.: Примена 1-МТ, IDO инхибитора блокира имunosупресивни ефекат MSCs *in vivo*. Апсолутни број CD4+ IL-17+ Т лимфоцита је значајно виши, док је проценат CD4+ IL-10+ Т лимфоцита значајно нижи у јетри мијева који су пили 1-МТ. Приказане вредности су средње вредности ± SE; **p<0.01, * p<0.05.

На фигури 26 је приказана заступљеност CD4+ Т лимфоцита који инфилтришу јетру.

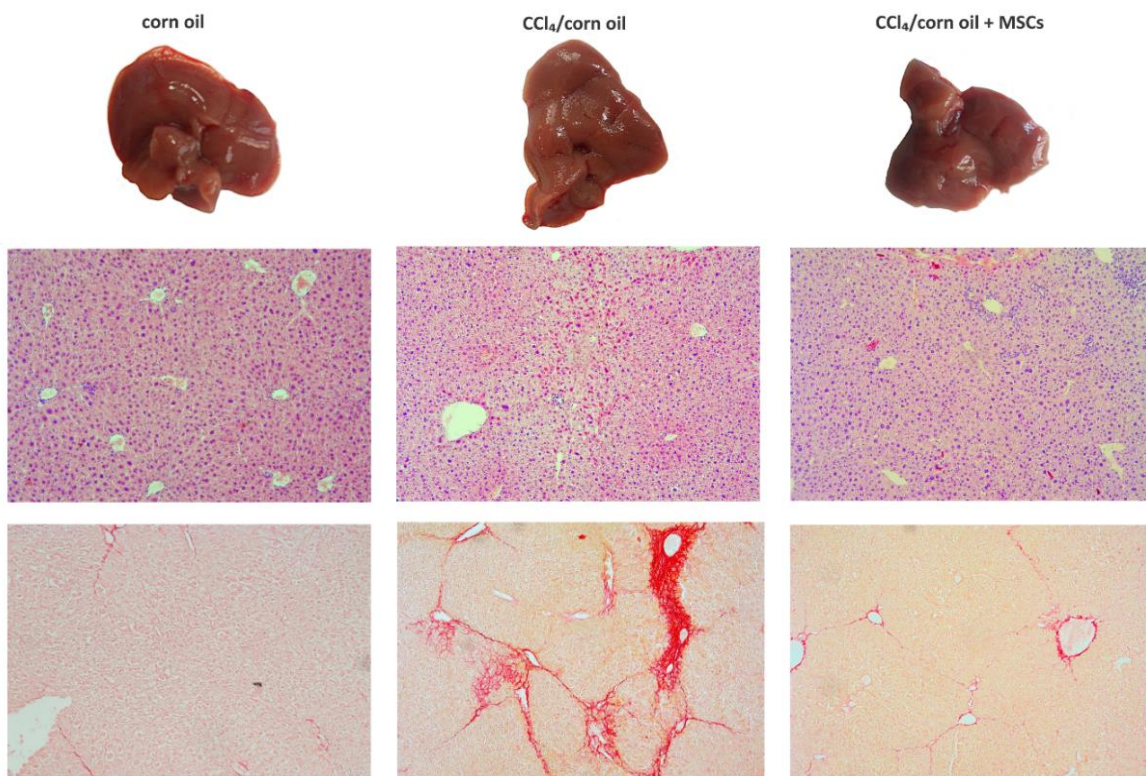
Број CD4+IL-17+ Т лимфоцита је значајно нижи у CCl₄ +MSCs групи мишева, у односу на CCL₄ и CCL₄ +MSCs+1-МТ групу (Графикон 24, p<0.01).

Процент CD4+IL-10+ Т лимфоцита је значајно нижи у CCl₄ +MSCs групи мишева, у односу на CCL₄ и CCL₄ +MSCs+1-МТ групу (Графикон 24, p<0.05).

Наведени резултати показују да *in vivo* инхибиција IDO, применом 1-МТ, поништава корисне ефекте примене мезенхималних матичних ћелија, односно показује да MSCs остварују своје специфично дејство путем активности IDO.

4.2.6. Терапијска примена MSCs смањује фиброзу јетре у развијеној болести

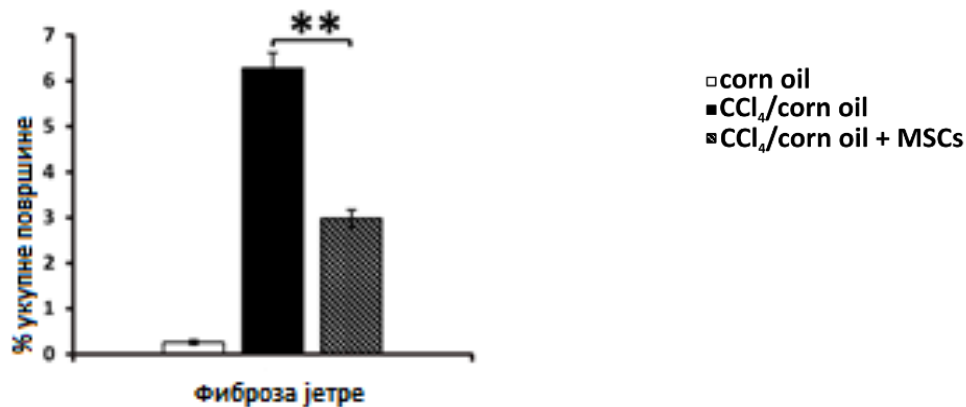
Након што смо показали да примена MSCs смањује развој фиброзе јетре, када се MSCs примењују истовремено са индуковањем фиброзе јетре, применом CCL₄, имплицирајући да правовремена или превентивна примена MSCs доноси корист у смислу смањења фиброзе јетре. Зато се поставило питање да ли примена MSCs може утицати на већ развијену фиброзу јетре. Након четири недеље апликације CCL₄ по већ описаном протоколу, тј индукције фиброзе јетре, групи мишева је наредне 3 недеље апликоване су мезенхималне матичне ћелије, једном недељно. Након седам недеља мишеви су жртвовани. На следећим фигурама су приказани добијени резултати.



Слика 8: Макроскопски изглед јетри мишева.

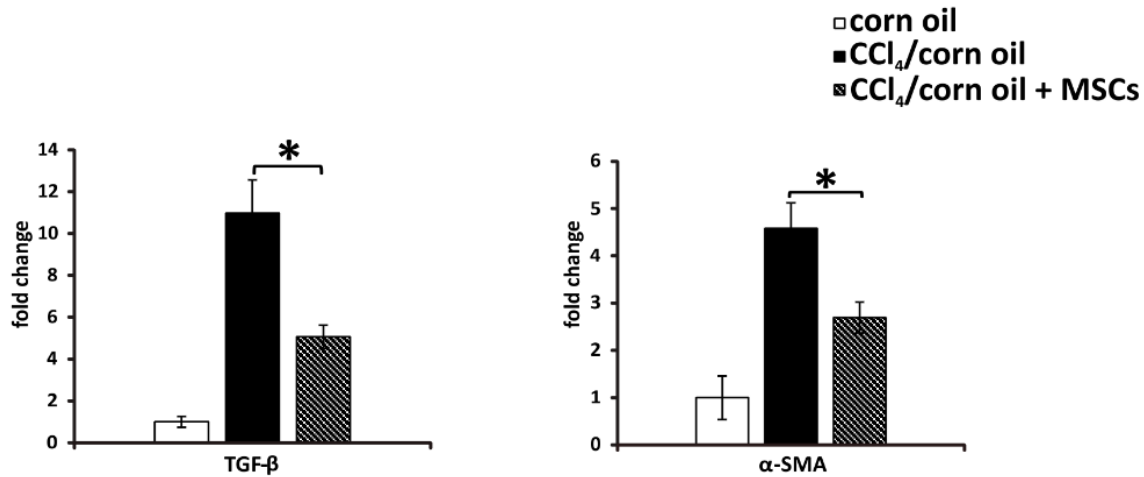
Репрезентативни исечци јетре мишева. А: Стандарно патохистолошко бојење (H&E); Б: Примена *Sirius red* технике, визуелизација депоновања колагена. Увећање $\times 40$.

Макроскопски преглед јетри групе мишева који су, у терапијском режиму, примили мезенхималне матичне ћелије показује да је структура њихових јетри униформнија, без изражених регенеративних нодуса на површини (Слика 8). Микроскопски преглед, тј Н&Е бојење, такође показује да у експерименталној групи мишева који су терапијски примили MSCs показује мање оштећење хепатоцита, са смањеним инфламацијским инфилтратом (Слика 8) као и смањено депоновање колагена, уочено применом *Sirius red* технике. Процент фиброзе је значајно мањи у експерименталној групи мишева који су, у терапијском режиму, примали MSCs (Графикон 25).



Графикон 25. Терапијска примена MSCs смањује проценат фиброзе. Процент фиброзе је значајно нижи у групи оболелих мишева који су поред CCl₄ примали MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само CCl₄. Приказане вредности су средње вредности ± SE; ** p<0.01.

На графикону 26, показани су резултати квалитативне RT-PCR анализе, који показују да је експресија гена за TGF- β и α -SMA значајно нижа у експерименталној групи мишева који су примали MSCs ($p < 0.05$).



Графикон 26. Терапијска примена MSCs смањује вредност експресије гена за TGF- β и α -SMA. Експресија ових гена је значајно нижа у групи оболелих мишева који су поред CCl₄ примали MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само CCl₄. Приказане вредности су средње вредности \pm SE; * $p < 0.05$.

5. ДИСКУСИЈА

5.1. МЕЗЕНХИМАЛНЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ РЕДУКУЈУ АКУТНО ОШТЕЋЕЊЕ ЈЕТРЕ СМАЊЕЊЕМ БРОЈА NKT17 ЋЕЛИЈА И ПОВЕЋАЊЕМ ПРИСУСТВА РЕГУЛАТОРНИХ NKT ЋЕЛИЈА У ЈЕТРИ

У акутном оштећењу јетре, NKT ћелије као главне ефекторске ћелије су, у великом броју, присутне у јетри мишева (328-330). Субпопулација, која производи IL-17, и означава као NKT17 ћелије се сматра најзначајнијом ћелијском популацијом која производи IL-17 у патогенези акутног хепатитиса. NKT-17 ћелије карактерише експресија транскрипционог фактора ROR γ T. Поред наведеног, IL-17 је значајан у оштећењу јетре посредованом нетрофилима, CD4+ и CD8+ Т лимфоцитима.

Сходно описаном, показали смо да примена мезенхималних матичних ћелија утиче на развој акутног хепатитиса, смањује серумски ниво IL-17, што настаје као последица супресије NKT ћелија да продукују IL-17. Примена MSCs не утиче на продукцију IL-17 у Т лимфоцитима и неутрофилима.

Када α -GalCer специфично активира NKT ћелије, покренувши снажан имунски одговор јетре, односно развој акутног хепатитиса код мишева (331), оне брзо продукују IL-17, који потом утиче на појачану инфилтрацију другим инфламацијским ћелијама у јетри (151).

Интравенска трансплантација MSCs, као и апликација MSC-СМ смањује капацитет NKT ћелија јетре да продукују IL-17, што редукује инфламацијски инфилтрат у акутном хепатитису изазваном CCl₄ и α -GalCer (Слика 3 и 4, Графикон 4 и 9), што показује да мезенхималне матичне ћелије могу супримирати NKT17 ћелије продукцијом солубилних молекула, односно паракриним механизмом, и да директан контакт између ове две ћелијске популације није неопходан за модулацију IL-17 сигнаног пута у акутном хепатитису.

У акутном хепатитису, изазваном α -GalCer-ом, у јетри се могу наћи FoxP3+ регулаторни Т лимфоцити који продукују IL-10 и супримирају инфламацију у јетри (332) .

Из доступне литературе је познато да, на развој акутног хепатитиса, утичу измене у процентуалној заступљености, односно односу Th17 и регулаторних Т лимфоцита (333) и да поремећај баланса ове две ћелијске популације промовише даљу прогресију акутног хепатитиса (334).

У складу са тим, показали смо да је супресија NKT17 ћелија, посредством примене MSCs, праћена повећаним присуством FoxP3+ NKT регулаторних ћелија које продукују IL-10, али и повећаном концентрацијом IL-10 у серуму експерименталних животиња, који поседује имуносупресивни и хепатопротективни ефекат. (Фигура 3, Графикон 3).

Наведени резултати указују да корист терапијске примене MSCs у акутном хепатитису у највећој мери зависи од промене односа између NKT17 ћелија и регулаторних NKT ћелија у јетри.

Прогресиивне инфламаторне болести су удружене са губитком Th17 лимфоцита и истовременим повећањем популације имуносупресивних регулаторних Т лимфоцита и у периферној крви и инфламираном ткиву (335).

IDO, снажан каталитички ензим, стимулише имуносупресивна својства регулаторних Т лимфоцита и истовремено онемогућава конверзију регулаторних лимфоцита у ефекторске Т лимфоците који продукују IL-17 (336). Генетском делецијом или инхибицијом овог ензима, повећава се број Th17 лимфоцита и смањује стварање регулаторног субтипа (336).

У хуманој популацији, IDO је кључни медијатор модулације у дејству MSCs, у инфламацијском одговору, који фаворизује развој Th1 или Th2 субсета, док код мишева, MSCs се карактеришу нижом активношћу IDO а у имуномодулацији је најзаступљенији ензим индуцибилна синтаза азот монооксида (iNOS) (255, 258, 337). Међутим, у инфламацијском одговору који стимулише поларизацију Т лимфоцита ка Th17 субсету, мишије MSCs не продукују iNOS, већ своје имуносупресивне ефекте остварују путем IDO и других медијатора, тако да се може закључити да је супресија развоја Th17 субсета зависна од функције ензима IDO (338).

У складу са досадашњим сазнањима, резултати ове студије показују да измена односа регулаторних NKT и NKT-17 ћелија, у корист регулаторних ћелија је у вези са повишеним

серумским концентрацијама IDO и да смањење хепатотоксичности NKT ћелија настаје као последица примене MSCs.

Капацитет MSCs да регулишу баланс ове две популације и да супримирају хепатотоксичност NKT ћелија, посредством IDO, може представљати нову терапијску меру у инфламацији јетре настале активношћу IL-17.

5.2. МЕЗЕНХИМАЛНЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ РЕДУКУЈУ ФИБРОЗУ ЈЕТРЕ СМАЊЕЊЕМ БРОЈА IL-17-ПРОДУКУЈУЋИХ Th17 ЛИМФОЦИТА У ЈЕТРИ

У развоју фиброзе јетре, Th17 субсет игра значајну улогу (220, 222) продукујући IL-17 који директно стимулише HSCs да продукују *Collagen-1* и промовишу њихову активацију у миофибробласте јетре, што директно доприноси развоју фиброзе јетре (220). У јетрама пацијената са фиброзом јетре детектује се повећана експресија IL-17, која је у корелацији са бројем циркулишућих Th17 лимфоцита, али и са тежином болести (220).

Добијени резултати ове студије показују да примена MSCs али и ињекција MSC-СМ смањује број Th17 лимфоцита у јетри експерименталних животиња, односно редукује фиброзу (Слике 5 и 6, Графикони 12-14).

Смањена концентрација серумског IL-17 (Графикони 15 и 16) и број Th17 субсета у јетри (Фигура 7) је показана у експерименталној групи мишева код којих је фиброза јетре изазвана CCl₄ а код којих је спроведена трансплантација MSC, као и смањена експресија фактора које продукују HSC: *Collagen-1*, α -SMA и TGF- β (Графикон 14) и када се дају у терапијском режиму, већ развијеној фибрози јетре изазваној CCl₄ (Слика 8, Графики 25 и 26), указујући на ефикасност примене MSC у лечењу развијене фиброзе јетре.

CD4⁺ Т који продукују IL-10, мигрирају у јетру, где супримирају хроничну инфламацију (338).

Промене у заступљености CD4⁺ Т који продукују IL-17 и CD4⁺ Т лимфоцита који продукују IL-10 могу одредити исход фиброзе јетре (221) а њихов дисбаланс је обично удружен са развојем инфламације и прогресијом хроничног оштећења јетре (225, 339).

Резултати ове студије показују да супресија Th17 субсета, посредством мезенхималних матичних ћелија повећава концентрацију имуносупресивног IL-10 (Графикони 15 и 16), са повећањем процента CD4+ Т лимфоцита који продукују IL-10 (Фигура 8), доказујући корист MSCs у фибрози јетре изазваној CCl₄, у смислу утицаја на однос између CD4+ Т који продукују IL-17 и CD4+ Т лимфоцита који продукују IL-10.

Концентрације IL-10 у контролној, здравој популацији мишева је нижа у односу на контролну групу мишева која је примала *corn oil* или *corn oil* + MSCs, док је проценат CD4+ Т лимфоцита који продукују IL-10 слична између две групе. IL-10 могу продуковати CD4+ Т лимфоцити, алтернативно активирани макрофаги (M2 субпопулација) и MSCs, које и у одсуству фиброзе стварају овај цитокин, након стимулације факторима који повећавају стварање IL-10 у ћелијама, какво је кукурузно уље, због чега се сматра да је последица повећане концентрације IL-10 у експерименталној групи мишева који су третирани са кукурузним уљем, последица стимулације макрофага да продукују наведени цитокин (340), и да на добијену разлику не утиче IL-10 ког стварају CD4+ Т лимфоцити.

Слично дејству MSCs, апликација MSC-СМ слаби фиброзу јетре (Графикони 19 и 20). Значај овог открића је битан, обзиром да је познато да примењене MSCs могу бити извор функционалних миофибробласта, који пак имају описане негативне ефекте на развој фиброзе (341). По апликацији, MSCs се трајно задржавају у оштећеној јетри и могу диферентовати у миофибробласте, пре него у хепатоците (342, 343).

У експериментално изазваној фибрози јетре, MSC-СМ, редукују и број Th17 лимфоцита у јетре и повећавају проценат CD4+ Т лимфоцита који продукују IL-10 (Фигура 10), снижавају ниво IL-17 а повећавају концентрацију IL-10 у серуму експерименталних животиња (Фигура 10), доказујући да MSC, продукцијом солубилних фактора, модулишу продукцију цитокина у CD4+ Т лимфоцитима.

MSC продукују већи број солубилних фактора: IL-6, *insulin-like growth factor binding protein-2* (IGFBP-2), IL-1 *receptor antagonist* (IL-1Ra), *hepatocyte growth factor* (HGF), *neural growth factor* (NGF), IL-10 и TGF-β3 и они могу допринети ефектима MSCs у слабљењу фиброзе јетре (40-43). IL-6, пореклом из MSCs поседује антиапоптотске ефекте, IGFBP-2 регулише *insulin-like growth factor-I* који поседује фибринолитичку активност, док IL-1 Ra, инхибитор проинфламацијског IL-1, је укључен у супресију инфламације (344). HGF и NGF, које продукују MSCs, промовише апоптозу HSCs, а IL-10 и TGF-β3 су одговорни за

супресију синтезе колагена у HSCs (280, 381, 345). MSCs регулишу експресију матрикс металопротеиназе (MMP)-9, за коју је познато да учествује у опоравку фиброзе (346).

Међутим, од свих солубилних молекула, које продукују MSCs, IDO поседује најзначајнију улогу у супресији сигналног пута IL-17 (347). Као што је већ наведено у оштећењу јетре које фаворизује поларизацију ка Th1 или Th2 субесту, хумане MSCs, путем IDO и његових метаболита (кинуренин, хинолна киселина и 3-хидрокси-антранилна киселина смањују пролиферацију или индукују апоптозу активираних Т лимфоцита (304), а за разлику од њих MSCs показују нижу активност IDO те користе iNOS као солубилни молекул у имуномодулацији (304, 305, 258). У развоју фиброзе јетре, чији инфламацијски одговор усмерава поларизацију Т лимфоцита ка Th17 субпопулацији, мишије MSC не продукују iNOS, већ иуносупресивни ефекат остварују дејством IDO и других солубилних молекула (361). MSCs супримирају генерисање ефекторских Th17 лимфоцита, посредством IDO, тако да инхибиција IDO се може користити у сврху блокаде супресије Th17 диференцијације посредством MSC (336).

У експерименталном моделу фиброзе јетре (применом CCl₄), заштитна, имуномодулацијска улога IDO је тек недавно описана (347). Код мишева који су дефицијентни за IDO, показана је повећана инфилтрација ћелијама имунског система, као и повећана експресија проинфламацијских цитокина (348).

Сходно описаном, резултати спроведеног истраживања показују да примена MSC слаби експериментално изазвану фиброзу јетре (Слика 6, Графикон 12), повећава серумски ниво IDO и његовог терминалног метаболита кинуренина (Графикон 16) и смањује инфилтрацију јетре Th17 лимфоцитима (Фигура 7). Инхибиција ензима IDO комплетно блокира ефекат MSC на Th17 лимфоците (Графикон 18) односно повећава инфилтрацију јетре Th17 лимфоцитима (Фигура 10).

У *in vitro* експериментима, примена инхибитора IDO блокира способност MSCs у супресији Th17 лимфоцита да стимулишу синтезу колагена тип 1 у HSCs (Фигура 9). Такође, *in vivo* инхибиција IDO у потпуности блокира ефекте MSC на Th17 лимфоците и инхибира антифиброгене ефекте MSCs (Слика 5, Графикони 21-23), потврђујући улогу IDO у супресији Th17 субсета применом MSC, у фибрози јетре.

Ензим IDO блокира конверзију регулаторних Т лимфоцита у Th17 субпопулацију и стимулише регулаторне Т лимфоците који продукују IL-10 (348) а његова инхибиција или

генетска делеција редукује стварање регулаторних Т лимфоцита и стимулише диференцијацију Th17 *in vitro* и *in vivo* (348).

У овој студији је показано да апликација MSC-СМ стимулише пролиферацију регулаторних CD4+ Т лимфоцита, који се карактеришу експресијом FoxP3 и продукцијом IL-10 (Графикон 20), док се ово својство комплетно блокира применом IDO инхибитора (Графикон 20).

Резултати ове студије показују да MSCs, посредством ензима IDO, супримирају Th17 субсет и њихову инфилтацију фиброзно измењене јетре, редукују IL-17 у серуму, затим промовишу пролиферацију CD4+ Т лимфоцита који синтетишу хепатопротективни и имуномодулацијски IL-10, креирајући имуносупресивну средину у којој HSCs, у одсуству стимулације IL-17, смањују продукцију колагена тип 1, α -SMA и других молекула који промовишу фиброзу јетре, што све заједно резултује слабљењем фиброзе јетре.

Показано својство MSCs у супресији Th17 лимфоцита, дејством ензима IDO може представљати нов терапијски приступ у лечењу фиброзе јетре коју изазива активација IL-17.

6. ЗАКЉУЧЦИ

Из свега претходно описаног, могу се извести следећи закључци:

1. Мезенхималне матичне ћелије редукују акутно оштећење јетре.

- 1.1. Примена MSCs значајно смањује акутно оштећење јетре које је изазвано CCl₄, смањује инфилтрацију инфламаторним ћелијама и серумски ниво IL-17.
- 1.2. Примена MSCs значајно смањује број NKT ћелија које продукују IL-17, али не утиче на број неутрофила, CD4⁺ и CD8⁺ Т лимфоцита који продукују IL-17 у акутном оштећењу јетре изазваном CCl₄.
- 1.3. У експерименталном моделу акутног хепатитиса изазваног NKT ћелијама, мезенхималне матичне ћелије смањују укупан број NKT ћелија које продукују IL-17⁺, смањују њихову хепатотоксичност, а повећавају број FoxP3⁺ IL-10⁺ NKT ћелија.
- 1.4. MSCs, паракриним механизмом, посредством индоламин 2, 3 деоксигеназе, утичу на продукцију IL-17 у NKT ћелијама.

2. Мезенхималне матичне ћелије редукују фиброзу јетре.

- 2.1. Интравенски ординирани MSCs мигрирају у јетру експерименталних животиња који су примали CCl₄ и смањују изазвану фиброзу.
- 2.2. Примена MSCs, као и у акутном хепатитису, значајно слаби фиброзу јетре, изазвану CCl₄, што је потврђено макроскопским и микроскопским карактеристикама, вредностима трансминаза у серуму и квантитативном RT-PCR анализом.
- 2.3. MSCs смањују ниво IL-17 у серуму и инфилтрацију CD4⁺ Т лимфоцита који продукују IL-17 у јетрама мишева третираних CCl₄.
- 2.4. MSCs паракриним механизмом супримирају Th17 лимфоците, док примена инхибитора индоламин 2, 3 деоксигеназе, 1-MT *in vivo* погоршава фиброзу јетре.
- 2.5. Терапијска примена MSCs смањује фиброзу јетре у развијеној болести.

СКРАЋЕНИЦЕ

IL	интерлеукин (<i>interleukin</i>)
ROS	реактивни медијатори кисеоника (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
CD	<i>cluster of differentiation</i>
IFN- γ	интерферон- γ (<i>interferon-γ</i>)
NKT	урођеноубилачки Т лимфоцити (<i>natural killer T cells</i>)
ћелије	
NK	урођеноубилачке ћелије (<i>natural killer cells</i>)
ћелије	
TLR	рецептор сличан Toll-у (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF- α	фактор некрозе тумора- α (<i>tumor necrosis factor-α</i>)
MHC	молекул II класе главни комплекс ткивне подударности (<i>major histocompatibility complex</i>)
α -GalCer	α -галактоцерамид
CCl ₄	угљен тетра хлорид
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. Dienstag JL, Isselbacher KJ, Toxic and drug-induced hepatitis, 15th edn. Chapter 296, In: Harrison's Principles of Internal Medicine. Braunwald E, et al, The McGraw-Hill Companies, In, 2001; 2:737-1742.
2. Oluseyi Adeboye Akinloye, Moshood Olajire Olaniyi, Hepato-protective effect of Cajanuscajanon tissue defense system in D-galactosamine-induced hepatitis in rats, Turk J Biochem 2011; 36(3): 237–241.
3. Tseng TC, Huang LR. Immunopathogenesis of Hepatitis B Virus. J Infect Dis 2017;216(suppl_8): S765-S770.
4. Yu M, Zhu Y, Cong Q, Wu C. Metabonomics Research Progress on Liver Diseases. Can J Gastroenterol Hepatol 2017; 2017: 8467192.
5. Lemmers A, Moreno C, Gustot T, Maréchal R, Degré D, Demetter P et al. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. Hepatology. 2009; 49(2): 646-657.
6. Raj DS, Vennila JJ, Aiyavu C, Panneerselvam K. The he-patoprotective effect of alcoholic extract of Annona squamosa leaves on experimentally induced liver in-jury in Swiss albino mice. Int J Int Bio 2009; 5(3): 162-166.
7. Rane J, Jadhao R, Bakal RL. Liver diseases and herbal drugs. JIPBS 2016; 3(2): 24-36.
8. Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. Gastroenterology 2008; 134(6): 1641-1654.
9. Boberg KM, Chapman RW, Hirschfield GM, Lohse AW, Manns MP, Schrumpf E; International Autoimmune Hepatitis Group. Overlap syndromes: the International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) position statement on a controversial issue. J Hepatol 2011; 54(2): 374-385.
10. Zhang H, Bernuzzi F, Lleo A, Ma X, Invernizzi P. Therapeutic Potential of IL-17-Mediated Signaling Pathway in Autoimmune Liver Diseases. Mediators Inflamm 2015; 436450.
11. Bernal W, Wendon J. Acute liver failure. N Engl J Med 2013; 369(26): 2525-2534.
12. O'Grady JG, Schalm SW, Williams R. Acute liver failure: redefining the syndromes. Lancet 1993; 342(8866): 273-275.

13. G Privitera, B Agarwal, R Jalan. Acute liver failure: pathophysiologic basis, and the current and emerging therapies *EMJ Hepatol* 2014;1:99-107.
14. Lee WM. Acute Liver Failure. *Semin Respir Crit Care Med*. 2012;33:36-45.
15. Zhou W-C, Zhang Q-B, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2014;20(23):7312-7324.
16. Sarin SK, Kumar A, Almeida JA, et al. Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the study of the liver (APASL). *Hepatology International*. 2009;3(1):269-282.
17. Schölmerich J, Holstege A. Aetiology and pathophysiology of chronic liver disorders. *Drugs*. 1990;40 Suppl 3:3-22.
18. Lee WM. Acute liver failure. *N Engl J Med* 1993;329:1862-1872.
19. Hoofnagle JH, Nelson KE, Purcell RH. Hepatitis E. *N Engl J Med* 2012;367:1237-1244.
20. Wasley A, Fiore A, Bell BP. Hepatitis A in the era of vaccination. *Epidemiol Rev* 2006;28:101-111.
21. 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.
22. Ichai P, Samuel D. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis in adults. *Liver Transpl* 2008;14:Suppl 2:S67-S79.
23. Reuben A, Koch DG, Lee WM. Drug-induced acute liver failure: results of a U.S. multicenter, prospective study. *Hepatology* 2010;52:2065-2076.
24. Biolato M, Araneo C, Marrone G, Liguori A, Miele L, Ponziani FR, Gasbarrini A, Grieco A. Liver transplantation for drug-induced acute liver failure. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017 Mar;21(1 Suppl):37-45.
25. Craig DGN, Bates CM, Davidson JS, Martin KG, Hayes PC, Simpson KJ. Staggered overdose pattern and delay to hospital presentation are associated with adverse outcomes following paracetamol-induced hepatotoxicity. *Br J Clin Pharmacol* 2012;73:285-294.

26. Björnsson ES. Drug-induced liver injury due to antibiotics. *Scand J Gastroenterol*. 2017 Jun - Jul;52(6-7):617-623.
27. Rane J., Jadhao R, Bakal R. L. Liver diseases and herbal drugs. *JIPBS*, 2016< Vol 3 (2), 24-36.
28. Alempijevic T, Zec S, Milosavljevic T. Drug-induced liver injury: Do we know everything? *World J Hepatol*. 2017 Apr 8;9(10):491-502.
29. Fisher K, Vuppalanchi R, Saxena R. Drug-Induced Liver Injury. *Arch Pathol Lab Med*. 2015 Jul; 139(7):876-887.
30. Henrion J. Hypoxic hepatitis. *Liver Int*. 2012;32:1039-1052.
31. Ichai P, Samuel D. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis in adults. *Liver Transpl*2008;14:Suppl 2:S67-S79.
32. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt FV, et al. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* 2002;137:947-954
33. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 2006; 354:54-66.
34. Shakil AO, Kramer D, Mazariegos GV, Fung JJ, Rakela J. Acute liver failure: clinical features, outcome analysis, and applicability of prognostic criteria. *Liver Transpl*. 2000 Mar;6(2):163-169.
35. Ichai P, Samuel D. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis in adults. *LivTransp* 2008;14: 67-79.
36. Eefsen M, Dethloff T, Frederiksen H-J, Hauerberg J, Hansen BA, Larsen FS. Comparison of terlipressin and noradrenalin on cerebral perfusion, intracranial pressure and cerebral extracellular concentrations of lactate and pyruvate in patients with acute liver failure in need of inotropic support. *J Hepatol* 2007;47:381-3864.
37. Desjardins P, Du T, Jiang W, Peng L, Butterworth R. Pathogenesis of hepatic encephalopathy and brain edema in acute liver failure: role of glutamine redefined. *Neurochem Int*2012;60:690-696.

38. Butterworth RF. Hepatic encephalopathy: a central neuroinflammatory disorder? *Hepatology* 2011;53:1372-1376.
39. Walsh TS, Wigmore SJ, Hopton P, Richardson R, Lee A. Energy expenditure in acetaminophen-induced fulminant hepatic failure. *Crit Care Med* 2000;28:649-654.
40. Muto Y. Present status of fulminant hepatitis in Japan (1989-1991). *Gastroenterol Jpn* 1993; 28 (Suppl 4):120-127.
41. Liaskou E, Wilson DV, Oo YH. Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:949157.
42. Robinson MW, Harmon C, O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol.* 2016 May;13(3):267-276.
43. Corazza N, Badmann A, Lauer C. Immune cell-mediated liver injury. *Semin Immunopathol.* 2009 Jul;31(2):267-277.
44. H. Jaeschke and C. W. Smith, "Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury," *Journal of Leukocyte Biology*, 1997. 61(6); 647–653.
45. M. L. Bajt, A. Farhood, and H. Jaeschke, "Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature," *American Journal of Physiology*, 2001.vol. 281(5), pp. G1188–G1195,.
46. N. Borregaard and J. B. Cowland, "Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte," *Blood*, 1997; 89 (10) 3503–3521,.
47. S. Yamashiro, H. Kamohara, J. M. Wang, D. Yang, W. H. Gong, and T. Yoshimura, "Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses," *Journal of Leukocyte Biology*, 2001; 69(5): 698–704.
48. M. Zanetti, "Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity," *Journal of Leukocyte Biology*, 2004; 75(1): 39–48.
49. O. Levy, "Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes," *Journal of Leukocyte Biology*, 2004; 76(5): 909–925.
50. M. E. Selsted and A. J. Ouellette, "Mammalian defensins in the antimicrobial immune response," *Nature Immunology*, 2005; 6 (6): 551–557, 2005.

51. A. D. Kennedy and F. R. Deleo, "Neutrophil apoptosis and the resolution of infection," *Immunologic Research*, 2009; 43 (1–3): 25–61.
52. C. S. Bonder, M. N. Ajuebor, L. D. Zbytniuk, P. Kubes, and M. G. Swain, "Essential role for neutrophil recruitment to the liver in concanavalin A-induced hepatitis," *Journal of Immunology*, 2004; 172 (1): 45–53.
53. H. Jaeschke, "Neutrophil-mediated tissue injury in alcoholic hepatitis," *Alcohol*, 2002; 27(1): 23–27.
54. Czepielewski RS, Jaeger N, Marques PE, Antunes MM, Rigo MM, Alvarenga DM, Pereira RV, da Silva RD, Lopes TG, da Silva VD, Porto BN, Menezes GB, Bonorino C. GRPR antagonist protects from drug-induced liver injury by impairing neutrophil chemotaxis and motility. *Eur J Immunol*. 2017 Apr;47(4): 646-657.
55. J. S. Gujral, A. Farhood, and H. Jaeschke, "Oncotic necrosis and caspase-dependent apoptosis during galactosamine-induced liver injury in rats," *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2003; 190 (1)37–46.
56. Puengel T, Krenkel O, Kohlhepp M, et al. Differential impact of the dual CCR2/CCR5 inhibitor cenicriviroc on migration of monocyte and lymphocyte subsets in acute liver injury. Boissonnas A, ed. *PLoS ONE*. 2017;12(9):e0184694.
57. Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM, Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol*. 2017 Jun; 17(6):349-362.
58. B. A. Imhof and M. Aurrand-Lions, "Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes," *Nature Reviews Immunology*, 2004; 4(6): 432–444.
59. Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 2017 May; 17(5):306-321.
60. M. Bilzer, F. Roggel, and A. L. Gerbes, "Role of Kupffer cells in host defense and liver disease," *Liver International*, 2006; 26 (10): 1175–1186.
61. A. Morita, Y. Itoh, T. Toyama et al., "Activated Kupffer cells play an important role in intra-hepatic Th1-associated necro-inflammation in Concanavalin A-induced hepatic injury in mice," *Hepatology Research*, 2003; 27 (2): 143–150.
62. M. T. Silva, "When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system," *Journal of Leukocyte Biology*, 2010; 87(1): 93–106.

63. B. Mosher, R. Dean, J. Harkema, D. Remick, J. Palma, and E. Crockett, "Inhibition of Kupffer cells reduced CXC chemokine production and liver injury," *Journal of Surgical Research*, 2001; 99 (2):201–210.
64. Alvarenga DM, Mattos MS, Araújo AM, Antunes MM, Menezes GB. Neutrophil biology within hepatic environment. *Cell Tissue Res*. 2017 Nov 10.
65. Ju C, Tacke F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Cell Mol Immunol*. 2016 May;13(3):316–27.
66. Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, Kohlhepp M, Ergen C, Niemietz P et al. Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatology* 2015; 62: 279–291.
67. Knolle P, Schlaak J, Uhrig A, Kempf P, Meyer zum Büschenfelde KH, Gerken G. Human Kupffer cells secrete IL-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) challenge. *J Hepatol* 1995; 22: 226–229.
68. S. N. Abraham and A. L. S. John, "Mast cell-orchestrated immunity to pathogens," *Nature Reviews Immunology*, 2010; 10(6): 440–452.
69. D. J. Farrell, J. E. Hines, A. F. Walls, P. J. Kelly, M. K. Bennett, and A. D. Burt, "Intrahepatic mast cells in chronic liver diseases," *Hepatology*, 1995; 22 (4/1) 1175–1181.
70. H. Francis and C. J. Meininger, "A review of mast cells and liver disease: what have we learned?" *Digestive and Liver Disease*, 2010; 42(8): 529–536.
71. M. Ishii, M. Iwai, Y. Harada et al., "A role of mast cells for hepatic fibrosis in primary sclerosing cholangitis," *Hepatology Research*, 2005; 31 (3): 127–131.
72. H. Francis, G. Alpini, and S. DeMorrow, "Recent advances in the regulation of cholangiocarcinoma growth," *American Journal of Physiology*, 2010; 299 (1):G1–G9.
73. S. Hida, M. Tadachi, T. Saito, and S. Taki, "Negative control of basophil expansion by IRF-2 critical for the regulation of Th1/Th2 balance," *Blood*, 2005; 106 (6): 2011–2017.
74. S. Kim, M. Prout, H. Ramshaw, A. F. Lopez, G. LeGros, and B. Min, "Cutting edge: basophils are transiently recruited into the draining lymph nodes during helminth infection via IL-3, but infection-induced Th2 immunity can develop without basophil lymph node recruitment or IL-3," *Journal of Immunology*, 2010; 184 (3): 1143–1147.

75. S. Terasaki, Y. Nakanuma, M. Yamazaki, and M. Unoura, "Eosinophilic infiltration of the liver in primary biliary cirrhosis: a morphological study," *Hepatology*, 1993; 17(2): 206–212.
76. V. J. Navarro and J. R. Senior, "Drug-related hepatotoxicity," *The New England Journal of Medicine*, 2006; 354 (7):731–739.
77. Landi A, Weismuller TJ, Lankisch TO, et al. Differential Serum Levels of Eosinophilic Eotaxins in Primary Sclerosing Cholangitis, Primary Biliary Cirrhosis, and Autoimmune Hepatitis. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2014;34(3):204-214.
78. C. A. Biron, K. B. Nguyen, G. C. Pien, L. P. Cousens, and T. P. Salazar-Mather, "Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines," *Annual Review of Immunology*, 1999; 17:189–220.
79. M. A. Caligiuri, "Human natural killer cells," *Blood*, 2008; 112(3):461–469.
80. K. L. Hokeness, W. A. Kuziel, C. A. Biron, and T. P. Salazar-Mather, "Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN- α/β -induced inflammatory responses and antiviral defense in liver," *Journal of Immunology*, 2005; 174(3):1549–1556.
81. Guidotti LG, Iannaccone M. Effector CD8 T cell trafficking within the liver. *Mol Immunol*. 2013;55(1):94-99.
82. Moreno-Cubero E, Larrubia JR. Specific CD8(+) T cell response immunotherapy for hepatocellular carcinoma and viral hepatitis. *World J Gastroenterol*. 2016 Jul 28;22(28):6469-6483.
83. Smyk-Pearson S, Tester IA, Klarquist J, Palmer BE, Pawlotsky JM, Golden-Mason L, Rosen HR. Spontaneous recovery in acute human hepatitis C virus infection: functional T-cell thresholds and relative importance of CD4 help. *J Virol*. 2008;82:1827–1837.
84. Webster GJ, Reignat S, Maini MK, Whalley SA, Ogg GS, King A, Brown D, Amlot PL, Williams R, Vergani D, et al. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology*. 2000;32:1117–1124.
85. Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: Insights from transgenic knockout models. *World Journal of Gastroenterology : WJG*. 2013;19(11):1683-1698.

86. Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, Gotto J, Williams R, Maini MK, Bertoletti A. Modulation of the CD8⁺-T-cell response by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol*. 2005 Mar; 79(6):3322-3228.
87. Wu Z, Han M, Chen T, Yan W, Ning Q. Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Liver Int*. 2010 Jul;30(6):782-794.
88. Wei HX, Chuang YH, Li B, et al. 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.
89. Wang X, Ning Q. Immune mediated liver failure. *EXCLI Journal*. 2014;13:1131-1144.
90. Viale R, Ware R, Maricic I, Chaturvedi V, Kumar V . NKT Cell Subsets Can Exert Opposing Effects in Autoimmunity, Tumor Surveillance and Inflammation. *Curr Immunol Rev*. 2012; 8(4):287-296.
91. 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.
92. Kumar V. NKT-cell subsets: promoters and protectors in inflammatory liver disease. *J Hepatol*. 2013 Sep; 59(3):618-620.
93. Ridgway WM, Gershwin ME. Prometheus unbound: NKT cells inhibit hepatic regeneration. *Hepatology* 2014; 60:1133-1135.
94. Spada FM, Koezuka Y, Porcelli SA. CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J Exp Med*. 1998 Oct 19; 188(8):1529-1534.
95. Brossay L, Jullien D, Cardell S, Sydora BC, Burdin N, Modlin RL, Kronenberg M. Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells. *J Immunol*. 1997 Aug 1; 159(3):1216-1224.
96. Arrenberg P, Halder R, Kumar V. Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *J Cell Physiol*. 2009 Feb; 218(2):246-250.
97. 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.
98. Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, Nakayama T, Taniguchi M, Wang CR, Koezuka Y, Kronenberg M. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med*. 2000 Sep 4; 192(5):741-754.

99. Benlagha K, Weiss A, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *J Exp Med*. 2000 Jun 5; 191(11):1895-903.
100. Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol*. 1997; 15():535-562.
101. Yu KOA, Porcelli SA. The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy. *Immunology Letters*, 2005; 100:42-55.
102. Pellicci DG, Patel O, Kjer-Nielsen L, Pang SS, Sullivan LC, Kyparissoudis K, Brooks AG, Reid HH, Gras S, Lucet IS, Koh R, Smyth MJ, Mallevaey T, Matsuda JL, Gapin L, McCluskey J, Godfrey DI, Rossjohn J. Differential recognition of CD1d- α -galactosyl ceramide by the V beta 8.2 and V beta 7 semi-invariant NKT T cell receptors. *Immunity*. 2009 Jul 17; 31(1):47-59.
103. 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.
104. Arrenberg P, Halder R, Dai Y, Maricic I, Kumar V. Oligoclonality and innate-like features in the TCR repertoire of type II NKT cells reactive to a beta-linked self-glycolipid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 15; 107(24):10984-10989.
105. Cerundolo V, Silk JD, Masri SH, Salio M. Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:28-38.
106. 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.
107. 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.
108. Darmoise A, Teneberg S, Bouzonville L, Brady RO, Beck M, Kaufmann SH, Winau F. Lysosomal α -Galactosidase Controls the Generation of Self Lipid Antigens for Natural Killer T Cells. *Immunity* 2010; 33:216-228.

109. 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.
110. 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.
111. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:297-336.
112. 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.
113. Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:131-142.
114. 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.
115. Swain MG. Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clin Sci (Lond)* 2008; 114: 457-466.
116. Swain MG. Natural Killer T Cells within the Liver: Conductors of the Hepatic Immune Orchestra. *Digestive Diseases* 2010 28: 7-13.
117. Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000; 192:921-930.
118. 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: 1725-1731.
119. Wallace KL, Marshall MA, Ramos SI, Lannigan JA, Field JJ, Strieter RM, Linden J. NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN-gamma and CXCR3 chemokines. *Blood*. 2009 Jul 16; 114(3):667-76.
120. 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 U S A*. 2000 May 9; 97(10):5498-5503.
121. Schrumpf E, Tan C, Karlsen TH, Sponheim J, Björkström NK, Sundnes O, Alfsnes K, Kaser A, Jefferson DM, Ueno Y, Eide TJ, Haraldsen G, Zeissig S, Exley MA, Blumberg

- RS, Melum E. The biliary epithelium presents antigens to and activates natural killer T cells. *Hepatology*. 2015 Oct; 62(4):1249-59.
122. Bandyopadhyay K, Marrero I, Kumar V. NKT cell subsets as key participants in liver physiology and pathology. *Cellular and Molecular Immunology*. 2016;13(3):337-346.
123. Li J, Zhu X, Liu F, et al. Cytokine and autoantibody patterns in acute liver failure. *Journal of immunotoxicology*. 2010;7(3):157-164.
124. Wasmuth HE, Kunz D, Yagmur E, Timmer-Stranghöner A, Vidacek D, Siewert E, Bach J, Geier A, Purucker EA, Gressner AM, Matern S, Lammert F. Patients with acute on chronic liver failure display "sepsis-like" immune paralysis. *J Hepatol*. 2005 Feb; 42(2):195-201.
125. Nagaki M, Iwai H, Naiki T, Ohnishi H, Muto Y, Moriwaki H. High levels of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha are associated with fatality in fulminant hepatitis. *J Infect Dis*. 2000 Oct; 182(4):1103-1108.
126. Lian LH, Jin X, Wu YL, Cai XF, Lee JJ, Nan JX. Hepatoprotective effects of *Sedum sarmentosum* on D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced murine fulminant hepatic failure. *J Pharmacol Sci*. 2010; 114(2):147-157.
127. Tokushige K, Yamaguchi N, Ikeda I, Hashimoto E, Yamauchi K, Hayashi N. Significance of soluble TNF receptor-I in acute-type fulminant hepatitis. *Am J Gastroenterol*. 2000 Aug;95(8):2040-2046.
128. Shimizu Y, Margenthaler JA, Landeros K, Otomo N, Doherty G, Flye MW. The resistance of *P. acnes*-primed interferon gamma-deficient mice to low-dose lipopolysaccharide-induced acute liver injury. *Hepatology*. 2002 Apr; 35(4):805-814.
129. Nicoletti F, Zacccone P, Xiang M, Magro G, Di Mauro M, Di Marco R, Garotta G, Meroni P. Essential pathogenetic role for interferon (IFN-)gamma in concanavalin A-induced T cell-dependent hepatitis: exacerbation by exogenous IFN-gamma and prevention by IFN-gamma receptor-immunoglobulin fusion protein. *Cytokine*. 2000 Apr;12(4):315-323.
130. Khanam A, Trehanpati N, Garg V, Kumar C, Garg H, Sharma BC, Sarin SK. Altered frequencies of dendritic cells and IFN-gamma-secreting T cells with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) therapy in acute-on- chronic liver failure. *Liver Int*. 2014 Apr;34(4):505-513.

131. Jin X, Zimmers TA, Perez EA, Pierce RH, Zhang Z, Koniaris LG. Paradoxical effects of short-and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. *Hepatology*. 2006;43:474–484.
132. Kovalovich K, Li W, DeAngelis R, Greenbaum LE, Ciliberto G, et al. Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL. *J Biol Chem*. 2001;276:26605–26613.
133. Kovalovich K, Li W, DeAngelis R, Greenbaum LE, Ciliberto G, et al. Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL. *J Biol Chem*. 2001;276:26605–26613.
134. Klein C, Wüstefeld T, Assmus U, Roskams T, Rose-John S, Müller M, et al. The IL-6-gp130-STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell-mediated liver injury. *J Clin Invest*. 2005;115:860–869.
135. Berry PA, Antoniades CG, Hussain MJ, McPhail MJ, Bernal W, Vergani D, et al. Admission levels and early changes in serum interleukin-10 are predictive of poor outcome in acute liver failure and decompensated cirrhosis. *Liver Int*. 2010;30:733–740.
136. Song Y, Yang JM. Role of interleukin (IL)-17 and T-helper (Th)17 cells in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017 Nov 4;493(1):1-8.
137. Coquet JM, Chakravarti S, Kyparissoudis K, McNab FW, Pitt LA, McKenzie BS, Berzins SP, Smyth MJ, Godfrey DI. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 12; 105(32):11287-11292.
138. Shen F, Gaffen SL. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine*. 2008 Feb; 41(2):92-104.
139. Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine*. 2013 Nov; 64(2):477-485.
140. Eljaafari A, Robert M, Chehimi M, Chanon S, Durand C, Vial G, Bendridi N, Madec AM, Disse E, Laville M, Rieusset J, Lefai E, Vidal H, Pirola L. Adipose Tissue-Derived Stem Cells From Obese Subjects Contribute to Inflammation and Reduced Insulin Response in Adipocytes Through Differential Regulation of the Th1/Th17 Balance and Monocyte Activation. *Diabetes*. 2015 Jul; 64(7):2477-2488.

141. Cho ML, Kang JW, Moon YM, Nam HJ, Jhun JY, Heo SB, Jin HT, Min SY, Ju JH, Park KS, Cho YG, Yoon CH, Park SH, Sung YC, Kim HY. STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Immunol*. 2006 May 1; 176(9):5652-5661.
142. Lafdil F, Miller AM, Ki SH, Gao B. Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases. *Cellular and Molecular Immunology*. 2010;7(4):250–254.
143. Ye Y, Xie X, Yu J, Zhou L, Xie H, Jiang G, et al. Involvement of Th17 and Th1 effector responses in patients with Hepatitis B. *J Clin Immunol*. 2010;30:546–555.
144. Lemmers A, Moreno C, Gustot T, Marechal R, Degre D, Demetter P, et al. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009; 49:646–657.
145. Furuya S, Kono H, Hara M, Hirayama K, Sun C, Fujii H. Interleukin 17A plays a role in lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced fulminant hepatic injury in mice. *J Surg Res* 2015;199:487-493.
146. Yan S, Wang L, Liu N, Wang Y, Chu Y. Critical role of interleukin-17/interleukin-17 receptor axis in mediating Con A-induced hepatitis. *Immunol Cell Biol* 2012;90:421-428.
147. You Q, Cheng L, Reilly TP, Wegmann D, Ju C. Role of neutrophils in a mouse model of halothane-induced liver injury. *Hepatology*. 2006;44(6):1421–1431.
148. Puel A, Döffinger R, Natividad A, et al. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *Journal of Experimental Medicine*. 2010;207(2):291–297.
149. Rowan AG, Fletcher JM, Ryan EJ, et al. Hepatitis C virus-specific Th17 cells are suppressed by virus-induced TGF- β . *Journal of Immunology*. 2008;181(7):4485–4494.
150. Zhang JY, Zhang Z, Wang FS, et al. Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*. 2010;51(1):81–91.

151. 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 Nov; 177(5):2334-2346.
152. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol.* 2012;56(3):671-685.
153. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet.* 2008 Mar 8;371(9615):838-51.
154. Bunchorntavakul C, Reddy KR. Acute Liver Failure. *Clin Liver Dis.* 2017Nov;21(4):769-792.
155. 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 Nov;32(11):2818-23.
156. Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol.* 2013 Sep; 59(3):583-94.
157. Bataller, R., & Brenner, D. A. (2005). Liver fibrosis. *Journal of Clinical Investigation*, 115(2), 209–218.
158. Novo E, Cannito S, Paternostro C, Bocca C, Miglietta A, Parola M. Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 2014 Apr 15;548:20-37.
159. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol.* 2014 Mar;14(3):181-194.
160. Nallagangula KS, Nagaraj SK, Venkataswamy L, Chandrappa M. Liver fibrosis: a compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression. *Future Sci OA.* 2017 Oct 5;4(1):FSO250.
161. Poilil Surendran, S., George Thomas, R., Moon, M. J., & Jeong, Y. Y. (2017). Nanoparticles for the treatment of liver fibrosis. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 6997–7006.
162. Pinzani M. Liver fibrosis. *Semin Immunopathol.* 1999; 21(4):475-90.
163. Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut.* 2000 Apr; 46(4):443-6.

164. Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000 Aug; 279(2):G245-9.
165. Ebrahimi, H., Naderian, M., & Sohrabpour, A. A. (2016). New Concepts on Pathogenesis and Diagnosis of Liver Fibrosis; A Review Article. *Middle East Journal of Digestive Diseases*, 8(3), 166–178.
166. Friedman, Scott L. Liver fibrosis – from bench to bedside. *Journal of Hepatology* , Volume 38 , 38 – 53.
167. Fattovich, G, Giustina, G, Degos, F, Tremolada, F, Diodati, G, Almasio, P et al, Morbidity and mortality in compensated cirrhosis type C: a retrospective follow-up study of 384 patients. *Gastroenterology*. 1997;112:463–472.
168. El-Serag, H.B, Mason, A.C. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch Intern Med*. 2000;160:3227–3230.
169. Hernaez R, Solà E, Moreau R, Ginès P. Acute-on-chronic liver failure: an update. *Gut*. 2017 Mar;66(3):541-553.
170. Xu R, Zhang Z, Wang F-S. Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Cellular and Molecular Immunology*. 2012;9(4):296-301.
171. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* 2013; 14: 996–1006.
172. Pradere JP, Kluwe J, De MS, Jiao JJ, Gwak GY, Dapito DH et al. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology* 2013; 58: 1461–1473.
173. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest*. 2005;115:56–65.
174. Rivera CA, Bradford BU, Hunt KJ, Adachi Y, Schrum LW, Koop DR, et al. Attenuation of CCl₄-induced hepatic fibrosis by GdCl₃ treatment or dietary glycine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;281:G200–G207.
175. Taimr P, Higuchi H, Kocova E, Rippe RA, Friedman S, Gores GJ. Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology*. 2003;37:87–95.

176. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 2008;134:657–667.
177. Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D - dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology*. 2006;130:435–452.
178. Bonecchi R, Facchetti F, Dusi S, Luini W, Lissandrini D, Simmelink M, et al. Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *J Immunol*. 2000;164:3862–3869.
179. de Lalla C, Galli G, Aldrighetti L, Romeo R, Mariani M, Monno A, et al. Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis progression in chronic viral hepatitis. *J Immunol*. 2004;117:3417–3425.
180. V. Racanelli and B. Rehermann, “The liver as an immunological organ,” *Hepatology*, 2006; 43 (2):Suppl. 1:S54–S62.
181. I. N. Crispe, “The liver as a lymphoid organ,” *Annual Review of Immunology*, 2009; 27:147–163.
182. L. Hammerich, F. Heymann, and F. Tacke, “Role of IL-17 and Th17 Cells in Liver Diseases,” *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2011.
183. L. H. Glimcher and K. M. Murphy. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes and Development*, 2000; 14(14): 1693–1711.
184. K. M. Murphy and S. L. Reiner. The lineage decisions of helper T cells, *Nature Reviews Immunology*, 2002; 2(12): 933–944.
185. A. O’Garra and N. Arai. The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends in Cell Biology*. 2000; 10(12): 542–550.
186. Sakaguchi, “Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 2004; 22, 531–562.
187. J. D. Fontenot, M. A. Gavin, and A. Y. Rudensky, “Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells,” *Nature Immunology*, 2003; 4(4): 330–336.
188. Abe, M., Hiasa, Y., & Onji, M. (2013). T Helper 17 Cells in Autoimmune Liver Diseases. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013, 607073.

189. N. J. Wilson, K. Boniface, J. R. Chan et al., "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells," *Nature Immunology*, 2007; 8(9):950–957
190. E. V. Acosta-Rodriguez, G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nature Immunology*, 2007; 8(9): 942–949.
191. C. Dong, "Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines," *Immunological Reviews*, 2008; 226(1):80–86.
192. Parola M, Marra F, Pinzani M. Myofibroblast - like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Mol Aspects Med* 2008; 29(1-2): 58-66.
193. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14(7): 397-411.
194. Waisako K, Jiang C, Zhang M, Cong M, Moore-Morris TJ, Park TJ et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(32): E3297-330.
195. Lindquist JN, Marzluff WF, Stefanovic B. Fibrogenesis III. Posttranscriptional regulation of type I collagen. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(3): G471-476.
196. Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A et al. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 1997; 25(2): 361-367.
197. Viñas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Berenguer C, Enrich C et al. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* 2003; 38(4): 919-929.
198. Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3): 417-426.
199. Powell EE, Edwards-Smith CJ, Hay JL, Clouston AD, Crawford DH, Shorthouse C et al. Host genetic factors influence disease progression in chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 31(4): 828-833.

200. Sasaki K, Tsutsumi A, Wakamiya N, Ohtani K, Suzuki Y, Watanabe Y et al. Mannose-binding lectin polymorphisms in patients with hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35(9): 960-965.
201. Akuta N, Chayama K, Suzuki F, Someya T, Kobayashi M, Tsubota A et al. Risk factors of hepatitis C virus-related liver cirrhosis in young adults: positive family history of liver disease and transporter associated with antigen processing 2(TAP2)*0201 Allele. *J Med Virol* 2001; 64(2): 109-116.
202. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10(1): 76-99.
203. Marra F. Chemokines in liver inflammation and fibrosis. *Front Biosc.* 2002; 7: d1899-914.
204. Streetz KL, Tacke F, Leifeld L, Wüstefeld T, Graw A, Klein C, Kamino K, Spengler U, Kreipe H, Kubicka S, Müller W, Manns MP, Trautwein C. Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases. *Hepatology* 2003; 38(1): 218-229.
205. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* 1997;15:797-819.
206. Streetz KL, Wüstefeld T, Klein C, Kallen KJ, Tronche F, Betz UA et al. Lack of gp130 expression in hepatocytes promotes liver injury. *Gastroenterology* 2003; 125(2): 532-543.
207. Nasir GA, Mohsin S, Khan M, Shams S, Ali G, Khan SN et al. Mesenchymal stem cells and Interleukin-6 attenuate liver fibrosis in mice. *J Transl Me* 2013; 11: 78.
208. Adachi K, Tsutsui H, Kashiwamura S, Seki E, Nakano H, Takeuchi O, Takeda K, Okumura K, Van Kaer L, Okamura H, Akira S, Nakanishi K. Plasmodium berghei infection in mice induces liver injury by an IL-12- and toll-like receptor/myeloid differentiation factor 88-dependent mechanism. *J Immunol* 2001; 167(10): 5928-5934.
209. Sugimoto R, Enjoji M, Nakamuta M, Ohta S, Kohjima M, Fukushima M, Kuniyoshi M, Arimura E, Morizono S, Kotoh K, Nawata H. Effect of IL-4 and IL-13 on collagen production in cultured LI90 human hepatic stellate cells. *Liver Int* 2005; 25(2): 420-428.

210. Shimamura T, Fujisawa T, Husain SR, Kioi M, Nakajima A, Puri RK. Novel role of IL-13 in fibrosis induced by nonalcoholic steatohepatitis and its amelioration by IL-13R-directed cytotoxin in a rat model. *J Immunol* 2008; 181: 4656-4665.
211. Borish L, Aarons A, Rumbly J, Cvietusa P, Negri J, Wenzel S. Interleukin-10 regulation in normal subjects and patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 1996; 97: 1288-1296.
212. Wan S, LeClerc JL, Schmartz D, Barvais L, Huynh CH, Devière J et al. Hepatic release of interleukin-10 during cardiopulmonary bypass in steroid-pretreated patients. *Am Heart J* 1997; 133(3): 335-339.
213. Louis H, Van Laethem JL, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K et al. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 1998; 28(6): 1607-1615.
214. Mathurin P, Xiong S, Kharbanda KK, et al. IL-10 receptor and coreceptor expression in quiescent and activated hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2002;282:G981-90.
215. Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Uitto J. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest* 1994; 94:2489-2492.
216. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front. Biosci* 2002; 7:d793-807.
217. Shek FW, Benyon RC. How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis? *Eur J Gastroentero Hepatol* 2004; 16:123-126.
218. Meng F, Wang K, Aoyama T, Grivennikov SI, Paik Y, Scholten D, Cong M, Iwaisako K, Liu X, Zhang M, Österreicher CH, Stickel F, Ley K, Brenner DA, Kisseleva T. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2012; 143(3): 765-766.
219. Lan RY, Salunga TL, Tsuneyama K, Lian ZX, Yang GX, Hsu W et al. Hepatic IL-17 responses in human and murine primary biliary cirrhosis. *J Autoimmun* 2009;32(1):43-51.

220. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007; 26(3): 371-381.
221. Sun XF, Gu L, Deng WS, Xu Q. Impaired balance of T helper 17/T regulatory cells in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 2062.
222. Tan Z, Qian X, Jiang R, Liu Q, Wang Y, Chen C et al. IL-17 A plays a critical role in the pathogenesis of liver fibrosis through hepatic stellate cell activation. *J Immunol*. 2013 Aug 15;191(4):1835-1844.
223. Tang Y, Bian Z, Zhao L, Liu Y, Liang S, Wang Q et al. Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Immunol* 2011; 166(2): 281-290.
224. Ma S, Cheng Q, Cai Y, Gong H, Wu Y, Yu X et al. IL-17A produced by $\gamma\delta$ T cells promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2014; 74(7): 1969-1982.
225. Shen X, Peng Y, Li H. The Injury-Related Activation of Hedgehog Signaling Pathway Modulates the Repair-Associated Inflammation in Liver Fibrosis. *Front Immunol* 2017; 8: 1450.
226. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001; 344(7): 495-500.
227. Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(6): 1160-1674.
228. Bedossa P, Poynard T. An algorithm for the grading of activity in chronic hepatitis C. The METAVIR Cooperative Study Group. *Hepatology* 1996; 24(2):289-293.
229. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22(6): 696-699.
230. Giannakeas N, Tsipouras MG, Tzallas AT, Kyriakidi K, Tsianou ZE, Manousou P et al. A clustering based method for collagen proportional area extraction in liver biopsy images. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2015; 2015: 3097-3100.
231. D'Ambrosio R, Aghemo A, Rumi MG, Ronchi G, Donato MF, Paradis V et al. A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis. *Hepatology* 2012; 56(2): 532-543.

232. Neuman MG, Cohen LB, Nanau RM. Hyaluronic acid as a non-invasive biomarker of liver fibrosis. *Clin Biochem* 2016; 49(3): 302-315.
233. Walsh KM, Timms P, Campbell S, MacSween RN, Morris AJ. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases -1 and -2 (TIMP-1 and TIMP-2) as noninvasive markers of liver disease in chronic hepatitis C: comparison using ROC analysis. *Dig Dis Sci* 1999; 44(3): 624-630.
234. Rosso C, Caviglia GP, Abate ML, Vanni E, Mezzabotta L, Touscoz GA et al. Cytokeratin 18-Aspartate396 apoptotic fragment for fibrosis detection in patients with non-alcoholic fatty liver disease and chronic viral hepatitis. *Dig Liver Dis* 2016; 48(1): 55-61.
235. Wai CT, Greenon JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38(2):518-526.
236. Ebrahimi H, Naderian M, Sohrabpour AA. New Concepts on Pathogenesis and Diagnosis of Liver Fibrosis; A Review Article. *Middle East J Dig Dis* 2016;8(3):166-178.
237. Sandrin L, Fourquet B, Hasquenoph JM, Yon S, Fournier C, Mal F, Christidis C et al. Transient elastography: a new noninvasive method for assessment of hepatic fibrosis. *Ultrasound Med Biol* 2003; 29(12): 1705-1713.
238. Yoon JH, Lee JM, Joo I, Lee ES, Sohn JY, Jang SK et al. Hepatic fibrosis: prospective comparison of MR elastography and US shear-wave elastography for evaluation. *Radiology* 2014; 273(3):772-782.
239. Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3): 437-451.
240. 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.
241. 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.
242. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315-317.

243. 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.
244. Gazdic M, Volarevic V, Arsenijevic N, Stojkovic M. Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem Cell Rev* 2015; 11(2): 280-287.
245. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 2005; 35(5): 1482-1490.
246. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 2013; 13(4):392–402.
247. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F et al. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 2008; 26(1):151–162.
248. Cassatella MA, Mosna F, Micheletti A, Lisi V, Tamassia N, Cont C et al. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells* 2011; 29(6): 1001-1011.
249. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K et al. 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(1):42-49.
250. Nauta AJ, Fibbe EW. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007; 110(10): 3499-3506.
251. Nasef A, Chapel A, Mazurier C, Bouchet S, Lopez M, Mathieu N et al. 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(4-5):217-226.
252. 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(1): 33–41.
253. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105(4): 1815–1822.

254. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99(10): 3838–3843.
255. Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'huillie A et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 2009; 27(8): 1954-1962.
256. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2007; 109(1): 228–234.
257. 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(3):136-143.
258. 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(12): 4619–4621.
259. Ling W, Zhang J, Yuan Z, Ren G, Zhang L, Chen X, et al. Mesenchymal stem cells use IDO to regulate immunity in tumor microenvironment. *Cancer Res* 2014; 74(5): 1576-1587.
260. 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(1):74–85.
261. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(6): 386–398.
262. 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(3): 693-702.
263. Gazdic M, Simovic Markovic B, Vucicevic L, Nikolic T, Djonov V et al. Mesenchymal stem cells protect from acute liver injury by attenuating hepatotoxicity of liver NKT cells in iNOS and IDO dependent manner. *J Tissue Eng Regen Med* 2017. doi: 10.1002/term.2452.

264. Guo Y, Chen B, Chen LJ, Zhang CF, Xiang C. Current status and future prospects of mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *J Zhejiang Univ Sci B* 2016; 17(11): 831-841.
265. Eom YW, Shim KY, Baik SK. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Korean J Intern Med.* 2015; 30(5): 580-589.
266. van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology* 2008; 47(5):1634–1643.
267. Xagorari A, Siotou E, Yiangou M, Tsolaki E, Bougiouklis D, Sakkas L et al. Protective effect of mesenchymal stem cell conditioned medium on hepatic cell apoptosis after acute liver injury. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6(5): 831-840.
268. Kubo N, Narumi S, Kijima H, Mizukami H, Yagihashi S, Hakamada K et al. Efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for fulminant hepatitis in mice induced by concanavalin A. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27(1):165-172.
269. 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(3): 477–486.
270. Sun K, Xie X, Xie J, Jiao S, Chen X, Zhao X et al. Cell-based therapy for acute and chronic liver failures: distinct diseases, different choices. *Sci Rep* 2014; 4: 6494.
271. Eom YW, Shim KY, Baik SK. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Korean J Intern Med* 2015; 30(5): 580-589.
272. Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion* 2014;54(5):1418-1437.
273. Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, De Bruyn C, Bron D, Toungouz M et al. Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming. *Stem Cell Rev* 2012; 8(4): 1188-1898.
274. Haddad R, Saldanha-Araujo F. Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: what do we know so far? *Biomed Res Int* 2014; 2014: 216806.

275. 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(4): 255-263.
276. Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2007; 2(9): e941.
277. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 2005; 35(5): 1482-9140.
278. Kupcova Skalnikova H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie* 2013; 95(12):2196-2211.
279. Usunier B, Benderitter M, Tamarat R, Chapel A. Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough. *Stem Cells Int* 2014; 2014: 340257.
280. Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, Kobayashi N, Tilles AW, Berthiaume F et al. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363(2): 247-252.
281. Lin N, Hu K, Chen S, Xie S, Tang Z, Lin J et al. Nerve growth factor-mediated paracrine regulation of hepatic stellate cells by multipotent mesenchymal stromal cells. *Life Sci* 2009; 85(7-8): 291-295.
282. Semedo P, Correa-Costa M, Antonio Cenedeze M, Maria Avancini Costa Malheiros D, Antonia dos Reis M, Shimizu MH et al. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem Cells* 2009;27(12):3063-3073.
283. Rabani V, Shahsavani M, Gharavi M, Piryaei A, Azhdari Z, Baharvand H. Mesenchymal stem cell infusion therapy in a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model affects matrix metalloproteinase expression. *Cell Biol Int* 2010; 34(6): 601-605.
284. Wu Y, Huang S, Enhe J, Ma K, Yang S, Sun T et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. *Int Wound J* 2014; 11(6): 701-710.

285. Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000;81(2):145-157.
286. Ryska M, Kieslichová E, Pantoflíček T, Ryska O, Zazula R, Skibová J et al. Devascularization surgical model of acute liver failure in minipigs. *Eur Surg Res* 2004; 36(3): 179-184.
287. Frühauf NR, Oldhafer KJ, Westermann S, Sotiropoulos GC, Kaiser GM. Acute hepatic failure in swine: hepatectomy versus vascular occlusion. *J Invest Surg* 2004; 17(3):163-71.
288. Wan XL, Lu YF, Xu SF, Wu Q, Liu J. Oleanolic acid protects against the hepatotoxicity of D-galactosamine plus endotoxin in mice. *Biomed Pharmacother* 2017; 93:1040-1046.
289. Wang HX, Liu M, Weng SY, Li JJ, Xie C, He HL et al. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2012; 18(2): 119-125.
290. 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(3): 1540-1550.
291. Liao CC, Day YJ, Lee HC, Liou JT, Chou AH, Liu FC. Baicalin Attenuates IL-17-Mediated Acetaminophen-Induced Liver Injury in a Mouse Model. *PLoS One* 2016; 11(11): e0166856.
292. Boll M, Weber LW, Becker E, Stampfl A. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Z Naturforsch C* 2001; 56(7-8): 649-659.
293. Nayak NC, Chopra P, Dhar A, Das PK. Diverse mechanisms of hepatocellular injuries due to chemicals: evidence in rats administered carbon tetrachloride or dimethylnitrosamine. *Br J Exp Pathol* 1975;56(2): 103-112.
294. De Groot H, Littauer A, Hugo-Wissemann D, Wissemann P, Noll T. Lipid peroxidation and cell viability in isolated hepatocytes in a redesigned oxystat system: evaluation of the hypothesis that lipid peroxidation, preferentially induced at low oxygen partial pressures, is decisive for CCl₄ liver cell injury. *Arch Biochem Biophys* 1988;264(2):591-599.
295. Constandinou C, Henderson N, Iredale JP. Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med* 2005;117:237-250.

296. Volarevic V, Simovic Markovic B, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H et al. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol* 2015; 45(2): 531-543.
297. Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25(2): 319-333.
298. Hung JT, Huang JR, Yu AL. Tailored design of NKT-stimulatory glycolipids for polarization of immune responses. *J Biomed Sci* 2017; 24(1): 22.
299. 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(1): 8-19.
300. 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(3): 513-28.
301. Swain MG. Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clin Sci (Lond)* 2008; 114(7): 457-466.
302. 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(1): 21-8.
303. Wang H, Feng D, Park O, Yin S, Gao B. Invariant NKT cell activation induces neutrophil accumulation and hepatitis: opposite regulation by IL-4 and IFN- γ . *Hepatology* 2013; 58(4): 1474-1485.
304. Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One* 2014; 9(9): e107001.
305. Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med* 2009;41(5): 315-324.
306. Ling W, Zhang J, Yuan Z, Ren G, Zhang L, Chen X et al. Mesenchymal stem cells use IDO to regulate immunity in tumor microenvironment. *Cancer Res* 2014; 74(5): 1576-1587.
307. Zhang X, Yang Y, Zhang L, Lu Y, Zhang Q, Fan D et al. Mesenchymal stromal cells as vehicles of tetravalent bispecific Tandab (CD3/CD19) for the treatment of B cell

- lymphoma combined with IDO pathway inhibitor D-1-methyl-tryptophan. *J Hematol Oncol* 2017;10(1):56.
308. Cheeseman KH, Albano EF, Tomasi A, Slater TF. Biochemical studies on the metabolic activation of halogenated alkanes. *Environ Health Perspect* 1985;64:85-101.
309. Huang JR, Tsai YC, Chang YJ, Wu JC, Hung JT, Lin KH et al. α -Galactosylceramide but not phenyl-glycolipids induced NKT cell anergy and IL-33-mediated myeloid-derived suppressor cell accumulation via upregulation of *egr2/3*. *J Immunol* 2014; 192(4): 1972-1981.
310. Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, et al. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2013;6:19.
311. Trautwein C, Trebicka J, Weiskirchen R. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2013;6(1): 19.
312. Dong S, Chen QL, Song YN, Sun Y, Wei B, Li XY et al. Mechanisms of CCl₄-induced liver fibrosis with combined transcriptomic and proteomic analysis. *J Toxicol Sci* 2016; 41(4): 561-572.
313. Fujii T, Fuchs BC, Yamada S, Lauwers GY, Kulu Y, Goodwin JM et al. Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 79.
314. Mitra A, Satelli A, Yan J, Xueqing X, Gagea M, Hunter CA et al. IL-30 (IL27p28) attenuates liver fibrosis through inducing NKG2D-*rae1* interaction between NKT and activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology* 2014; 60(6): 2027-2039.
315. Rabani V, Shahsavani M, Gharavi M, Piryaee A, Azhdari Z, Baharvand H. Mesenchymal stem cell infusion therapy in a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model affects matrix metalloproteinase expression. *Cell Biol Int* 2010; 34(6): 601-605.
316. Strick-Marchand H, Masse G, Weiss M, Di Santo J. Lymphocytes support oval cell-dependent liver regeneration. *J of Immunol* 2008; 181(4): 2764 -2771.

317. Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K et al. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem* 2014; 62(10): 751-758.
318. Blom KG, Qazi M, Matos JB, Nelson BD, DePierre JW, Abedi-Valugerdi M, et al. Isolation of murine intrahepatic immune cells employing a modified procedure for mechanical disruption and functional characterization of the B, T and natural killer T cells obtained. *Clin Exp Immunol* 2008;155(2): 320-329.
319. Pala P, Hussel T, Openshaw PJM. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Meth* 2000; 243(1-2): 107-124.
320. Henschler R, Fehervizyova Z, Bistran R, Seifried E. A mouse model to study organ homing behaviour of haemopoietic progenitor cells reveals high selectivity but low efficiency of multipotent progenitors to home into haemopoietic organs. *Br J Haematol* 2004; 126(1): 111-119.
321. Wang S, Zhang X, Ju Y, Zhao B, Yan X, Hu J, et al. MicroRNA-146a feedback suppresses T cell immune function by targeting Stat1 in patients with chronic hepatitis B. *J Immunol* 2013; 191(1): 293-301.
322. 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(9): 1054-1061.
323. Rouse M, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. The role of IL-2 in the activation and expansion of regulatory T-cells and the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunobiology* 2013; 218(4): 674-682.
324. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 2004; 34(9): 2480-2488.
325. Bartneck M, Warzecha KT, Tag CG, Sauer-Lehnen S, Heymann F, Trautwein C et al. Isolation and time lapse microscopy of highly pure hepatic stellate cells. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2015; 2015: 417023.

326. Riccalton-Banks L, Bhandari R, Fry J, Shakesheff KM. A simple method for the simultaneous isolation of stellate cells and hepatocytes from rat liver tissue. *Mol Cell Biochem* 2003;248 (1-2): 97-102.
327. Yu MC, Chen CH, Liang X, et al. Inhibition of T-cell responses by hepatic stellate cells via B7-H1-mediated T-cell apoptosis in mice. *Hepatology* 2004; 40(6): 1312-1321.
328. 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(6): 2960-2969.
329. Subramanian M, Kini R, Madasu M, Ohta A, Nowak M, Exley M et al. Extracellular adenosine controls NKT-cell-dependent hepatitis induction. *Eur J Immunol* 2014;44(4): 1119-1129.
330. Nagy L. Would eating carrots protect your liver? A new role involving NKT cells for retinoic acid in hepatitis. *Eur J Immunol* 2012; 42(7): 1677-1680.
331. 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(3): 1540-1550.
332. Santodomingo-Garzon, T., et al., Natural killer T cells regulate the homing of chemokine CXC receptor 3-positive regulatory T cells to the liver in mice. *Hepatology*, 2009. 49(4): 1267-1276.
333. Cheng X, Shan YY, Luo YW. Dynamic change in Th17/regulatory T cell ratio in peripheral blood of patients with acute hepatitis B and its significance. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2016; 24(8): 565-568.
334. Xue-Song L, Cheng-Zhong L, Ying Z, Mo-Bin W. Changes of Treg and Th17 cells balance in the development of acute and chronic hepatitis B virus infection. *BMC Gastroenterol* 2012;12:43.
335. Favre D, Mold J, Hunt PW, Kanwar B, Loke P, Seu L et al. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Sci Transl Med* 2010; 2(32): 32ra36.

336. Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, Mileti E, Fallarino F, Puccetti P et al. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* 2010; 59(5): 595-604.
337. Tataru R, Ozaki K, Kikuchi Y, Hatanaka K, Oh I, Meguro A et al. Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation. *Cytotherapy* 2011; 13(6): 686-694.
338. Santodomingo-Garzon T, Han J, Le T, Yang Y, Swain MG. Natural killer T cells regulate the homing of chemokine CXC receptor 3-positive regulatory T cells to the liver in mice. *Hepatology* 2009; 49: 1267.
339. Gu L, Deng WS, Sun XF, Zhou H, Xu Q. Rapamycin ameliorates CCl₄-induced liver fibrosis in mice through reciprocal regulation of the Th17/Treg cell balance. *Mol Med Rep* 2016; 14(2): 1153-1161.
340. Petursdottir DH, Hardardottir I. Dietary fish oil increases the number of splenic macrophages secreting TNF-alpha and IL-10 but decreases the secretion of these cytokines by splenic T cells from mice. *J Nutr* 2007; 137(3): 665-670.
341. Russo FP, Alison MR, Bigger BW, Amofah E, Florou A, Amin F et al. The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis. *Gastroenterology* 2006; 130(6): 1807-1821.
342. di Bonzo LV, Ferrero I, Cravanzola C, Mareschi K, Rustichell D, Novo E et al. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut* 2008; 57(2): 223-231.
343. Baertschiger RM, Serre-Beinier V, Morel P, Bosco D, Peyrou M, Clément S et al. Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver. *PLoS One* 2009; 4(8): e6657.
344. Meier RP, Mahou R, Morel P, Meyer J, Montanari E, Muller YD et al. Microencapsulated human mesenchymal stem cells decrease liver fibrosis in mice. *J Hepatol* 2015;62(3):634-641.
345. Wang J, Bian C, Liao L, Zhu Y, Li J, Zeng L, Zhao RC. Inhibition of hepatic stellate cells proliferation by mesenchymal stem cells and the possible mechanisms. *Hepatol Res* 2009; 39(12): 1219-1228.

346. Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Niioka M et al. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2007; 45(1): 213-222.
347. Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, et al. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* 2010; 59: 595.
348. Ogiso H, Ito H, Ando T, Arioka Y, Kanbe A, Ando K et al. The Deficiency of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Aggravates the CCl4-Induced Liver Fibrosis in Mice. *PLoS One* 2016; 11(9): e0162183.