

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Drenka I. Trivanović

**IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA I
FUNKCIONALNA SVOJSTVA HUMANIH
MATIČNIH ĆELIJA MASNOG TKIVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Drenka I. Trivanović

**IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA I
FUNKCIONALNA SVOJSTVA HUMANIH
MATIČNIH ĆELIJA MASNOG TKIVA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2014.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Drenka I. Trivanović

**ISOLATION, CHARACTERIZATION AND
FUNCTIONAL PROPERTIES OF HUMAN
ADIPOSE TISSUE STEM CELLS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2014.

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

prof. dr Milena Kataranovski, *naučni savetnik i redovni profesor Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu*

dr Diana Bugarski, *naučni savetnik Instituta za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu*

dr Aleksandra Jauković, *naučni saradnik Instituta za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu*

Datum odbrane:

Ova disertacija je u potpunosti urađena i napisana u **Laboratoriji za eksperimentalnu hematologiju i matične ćelije Instituta za medicinska istraživanja, Univerziteta u Beogradu** u okviru projekta **“Regenerativni i modulatorni potencijal adultnih matičnih ćelija”** OI 175062 finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, čiji je rukovodilac dr Diana Bugarski.

ZAHVALNICA

Najveću i najiskreniju zahvalnost dugujem mentorki dr Diani Bugarški, na pruženoj prilici da se bavim ovim poslom, na svim korisnim sugestijama i podršci tokom celokupnog rada, bez kojih ova teza nikada ne bi bila realizovana.

Posebno veliku zahvalnost dugujem mentorki prof. dr Mileni Kataranovski na svom pruženom znanju tokom studija, kao i vrhunskim predavanjima koja su usmerila moje interesovanje ka oblasti imunologije i celokupnoj pomoći pri izradi ove teze.

Neizmernu zahvalnost dugujem dr Aleksandri Jauković na iscrpnoj pomoći tokom izrade i pisanja ove teze, kao i svim dobronamernim savetima tokom eksperimentalnog rada i usmeravanju na naučni pristup problemima.

Zahvalnost dugujem dr Gordani Jovčić na ukazanoj prilici i svim dobronamernim i korisnim savetima tokom rada.

Izrazito veliku zahvalnost dugujem dr Juan Francisco Santibanez i dr Vesni Ilić na celokupnoj pomoći tokom realizacije eksperimenata, pruženom znanju i kreativnom pristupu. Posebno se zahvaljujem dragim kolegama dr Jeleni Krstić, dr Slavku Mojsiloviću, Ivani Okić-Đorđević, mladim koleginicama Tamari Kukolj i Hristini Obradović, kao i Snežani Marković na svojoj pomoći, korisnim savetima i prijateljskoj podršci, bez kojih ova teza nikada ne bi bila realizovana.

Najveću zahvalnost dugujem mojim roditeljima i porodici na najsrdačnijoj podršci i ljubavi tokom svih ovih godina.

IZOLACIJA, KARAKTERIZACIJA I FUNKCIONALNA SVOJSTVA HUMANIH MATIČNIH ĆELIJA MASNOG TKIVA

REZIME

Dosadašnja istraživanja su pokazala da matične ćelije poseduju regenerativna i modulatorna svojstva zahvaljujući kojima se intenzivno izučava njihova primena u regenerativnoj medicini i ćelijskoj terapiji. Mezenhimske matične ćelije (MMC) su rasprostranjene u mnogim tkivima i organima i izolovane su iz brojnih adultnih i neonatalnih tkiva. Najvažnije karakteristike MMC su samoobnavljanje i sposobnost diferenciranja u ćelije mezenhinskog (osteogene, adipogene, hondrogene, miogene), ali i ektodermalnog i endodermalnog porekla. Iako su ove osobine osnova za njihovu potencijalnu terapijsku primenu, mehanizmi regulacije brojnih funkcija MMC, kao i same diferencijacije nisu dovoljno ispitani i objašnjeni, što upućuje na neophodnost detaljnih analiza pre njihove kliničke primene.

Kako su prvootkrivene MMC izolovane iz kostne srži, ispitivanja njihove uloge u procesu hematopoeze, ali i transplantacijama hematopoetskih matičnih ćelija, usmerila su aktuelna istraživanja na interakcije MMC sa ćelijama imunskog sistema, pri čemu je pokazano da su ove interakcije dvosmerne prirode i uzrokuju promene fenotipa i funkcionalnih osobina i MMC i imunskih ćelija. Poznato je da MMC svoje delovanje na imunske ćelije ostvaruju kako direktnim ćelijskim kontaktima, tako i preko brojnih solubilnih faktora koje proizvode, pri čemu molekularna osnova mehanizama modulacije imunskog odgovora nije u potpunosti poznata. Široka rasprostranjenost, multipotentni potencijal diferencijacije i imunomodulatorna svojstva, čine MMC važnim učesnicima u procesu reparacije oštećenih tkiva, u kojem proizvodeći brojne solubilne faktore učestvuju u svim fazama obnavljanja oštećenog tkiva: regulaciji aktivacije i mobilizacije imunskih ćelija, angiogenezi, mobilizaciji fibroblastnih ćelija, obnavljanju i remodelovanju ekstracelularnog matriksa. Kako su ovi procesi uključeni i u razvoj tumorskog tkiva, mnoga savremena istraživanja usmerena su na proučavanje interakcija MMC i tumorskih ćelija. Pokazano je da MMC mogu biti privučene u tumorsku mikrosredinu posredstvom inflamatornih faktora prisutnih u tumorskom tkivu, ali njihovo delovanje, kao i mehanizmi i posledice interakcija sa tumorskim ćelijama još

uvek nisu razjašnjeni. Masno tkivo je najrasprostranjenije tkivo u ljudskom organizmu, koga pored adipocita čine i opredeljeni progenitori i MMC koji doprinose održavanju organizacije ovog tkiva na ćelijskom i strukturnom nivou, kao i brojne druge ćelije, među kojima su i imunske ćelije. Masno tkivo je i najzastupljenije tkivo dojke, a tumor dojke je trenutno najčešći vid malignog oboljenja kod žena. Stoga su interakcije inflamatornih faktora, MMC i tumorskih ćelija veoma važne za razumevanje uloge MMC u tumorskoj mikrosredini, kao i posledica koje ove interakcije imaju na razvoj tumora.

Ciljevi ove disertacije bili su izolacija i karakterizacija MMC iz humanog masnog (adipoznog) tkiva (AT-MMC) zdravih donora, ali i pacijenata sa malignim bolestima, kao i ispitivanje njihovih imunomodulatornih funkcija i efekata na tumorske ćelije. Kako bi se zadovoljili kriterijumi postavljeni od strane Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju, nakon izolacije dovoljnog broja ćelija koje ispoljavaju adherentnu, klonogenu i fibroblastnu prirodu, u cilju dalje karakterizacije izolovanih ćelija određivane su osobine AT-MMC iz različitih donora poređenjem njihovog proliferativnog i klonogenog kapaciteta, ekspresije površinskih i intracelularnih proteinskih markera karakterističnih za mezenhimske matične i hematopoetske ćelije, ekspresije markera embrionalnih matičnih ćelija, kao i multipotentnog potencijala diferencijacije, odnosno sposobnosti da se diferenciraju u četiri ćelijske loze, osteogenu, adipogenu, hondrogenu i miogenu. U drugom delu istraživanja analiziran je imunomodulatorni potencijal AT-MMC, određivanjem uticaja AT-MMC i njihovih kondicioniranih medijuma na spontanu, mitogenom i aloantigenom stimulisanu proliferaciju mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC), kao i genske ekspresije molekula povezanih sa imunomodulatornim delovanjem AT-MMC: HLA (*Human Leukocyte Antigen*)-A, HLA-DR, HLA-G5, cikloksigenaza 2 (COX2, *Cyclooxygenase* 2), indoleamin 2,3-dioksigenaza-1 (IDO-1), interleukin (IL)-6, i transformišući faktor rasta (TGF, *Transforming Growth Factor*)-β. Tećim delom istraživanja obuhvaćeni su eksperimenti u kojima je ispitivan uticaj AT-MMC na tumorske ćelije, na modelu tumorske ćelijske linije adenokarcinoma dojke MCF-7. Određivanje uticaja AT-MMC poreklom iz različitih donora, i njihovih kondicioniranih medijuma, na proliferaciju i klonogeni kapacitet MCF-7 ćelija. Dodatno, ispitivan je uticaj kondicioniranih medijuma AT-MMC izolovanih iz masnog tkiva iz neposrednog okruženja tumorskog

tkiva dojke (tdAT-MMĆ), i to kako u normalnim uslovima, tako i u uslovima proinflamatorne mikrosredine (u prisustvu proinflamatornih citokina interferona (IFN)- γ i/ili faktora nekroze tumora (TNF, *Tumor Necrosis Factor*)- α) na funkcionalne osobine MCF-7 ćelija: proliferaciju, klonogeni kapacitet, adhezivnost, migraciju i epitelo-mezenhimsku tranziciju, kao i na proteinsku i gensku ekspresiju molekula koji su od važnosti za invazivnost tumorskih ćelija. Pored toga, ispitivano je i učešće TGF- β molekula u efektima kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ na migraciju i epitelo-mezenhimsku tranziciju MCF-7 ćelija.

Naši rezultati su pokazali da su sve izolovane AT-MMĆ pokazivale karakteristike u skladu sa kriterijumima MeĀunarodnog društva za ćelijsku terapiju, ispoljavajući sliĀan proliferativni i klonogeni kapacitet, eksprimirale su sve markere mezenhimskih matićnih ćelija, dok nisu eksprimirale markere hematopoetskih ćelija i embrionalnih matićnih ćelija. TakoĀe sve izolovane AT-MMĆ su imale multipotentni potencijal diferencijacije pokazujući sposobnost ostogeneze, adipogeneze, hondrogeneze, i miogeneze.

U ispitivanjima imunomodulatornih karakteristika pokazano je da su AT-MMĆ, u zavisnosti od brojĀanog odnosa, stimulisale spontanu, a inhibirale mitogenom i aloantigenom stimulanu proliferaciju MNCĀ. Kondicionirani medijumi AT-MMĆ nisu uticali na spontanu i mitogenom, ali su inhibirali aloantigenom stimulanu proliferaciju MNCĀ. TakoĀe je pokazano da su AT-MMĆ poreklom iz razliĀitih donora konstitutivno eksprimirale iRNK za molekule ukljuĀene u imunomodulatorno delovanje: HLA-A, HLA-DR, IDO-1, COX2, IL-6 i TGF- β . Inflamatorni citokini IFN- γ i TNF- α , samostalno ili u kombinaciji, indukovali su poveĀanje genske ekspresije svih ispitivanih molekula sa imunomodulatornim delovanjem.

Naša istraŹivanja su pokazala i da su pri direktnim i indirektnim ćelijskim kontaktima, AT-MMĆ izolovane kako iz zdravih donora, tako i pacijenata sa malignitetom, stimulisale proliferaciju MCF-7 tumorskih ćelija. Kondicionirani medijumi prikupljeni nakon 24h kultivacije AT-MMĆ su takoĀe stimulisali proliferaciju tumorskih ćelija, za razliku od kondicioniranih medijuma prikupljenih nakon 48h kultivacije AT-MMĆ, koji su inhibirali proliferaciju MCF-7 ćelija. Inhibitorski efekat kondicioniranih medijuma prikupljenih nakon 48h kultivacije AT-MMĆ potvrĀen je i delovanjem na druge tumorske ćelijske linije, ali je ovakav efekat izostao na normalnim,

ne-tumorskim ćelijama. U sklopu daljih istraživanja uticaja MMC izolovanih iz masnog tkiva iz neposrednog okruženja tumorskog tkiva dojke, pokazano je da kondicionirani medijumi tdAT-MMC tretiranih proinflamatornim citokinima stimulišu proliferaciju MCF-7 ćelija. S druge strane, ovi kondicionirani medijumi nisu uticali na sposobnost formiranja kolonija MCF-7 ćelija, ali su tdAT-MMC tretirane proinflamatornim citokinima u uslovima direktnih ćelijskih kontakata stimulisale formiranje kolonija MCF-7 ćelija. Kondicionirani medijumi tdAT-MMC tretiranih proinflamatornim citokinima smanjili su adhezivnost, ali su stimulisali migraciju tumorskih MCF-7 ćelija. Takođe, kondicionirani medijumi tdAT-MMC su stimulisali epitelo-mezenhimsku tranziciju tumorskih ćelija, redukujući proteinsku i gensku ekspresiju E-kadherina, ne menjajući intracelularnu lokalizaciju β -katenina, a povećavajući proteinsku i gensku ekspresiju Vimentina kod MCF-7 ćelija. Kondicionirani medijumi tretiranih tdAT-MMC povećavali su i enzimsku aktivnost, proteinsku i gensku ekspresiju urokinaza (uPA), dok nisu uticali na enzimsku aktivnost matriksnih metaloproteinaza 2 (MMP2), ali su povećavali njihovu proteinsku i gensku ekspresiju kod MCF-7 ćelija. Farmakološki inhibitor za receptor TGF- β , poništio je stimulaciju migracije MCF-7 ćelija ostvarenu pri kultivaciji sa kondicioniranim medijumima tretiranih tdAT-MMC, uz smanjenje proteinske i genske ekspresije urokinaza (uPA). Takođe, prisustvo inhibitora receptora TGF- β poništilo je stimulaciju epitelo-mezenhimske tranzicije MCF-7 ćelija, blokiranjem redukcije proteinske ekspresije E-kadherina i povećanja proteinske ekspresije Vimentina, ostvarene pri kultivaciji sa kondicioniranim medijumom tretiranih tdAT-MMC, ukazujući da se efekat kondicioniranog medijuma tdAT-MMC na migraciju i epitelo-mezenhimsku tranziciju MCF-7 ćelija ostvaruje posredstvom TGF- β .

Imajući u vidu predstavljene rezultate, može se zaključiti da masno tkivo predstavlja potencijalno dobar izvor MMC, sa karakteristikama koje zadovoljavaju sve kriterijume Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju. Ove ćelije pored regenerativnih svojstava, ispoljavaju i modulatorne funkcije, pri čemu mogu ostvariti dvojako dejstvo, inhibitorno ili stimulatивно, na rast ili funkcionalne osobine imunskih i tumorskih ćelija. Rezultati su pokazali i da modulatorna svojstva AT-MMC nisu konstitutivno ispoljena, nego su umnogome uslovljena specifičnom mikrosredinom koja može značajno da modulira i karakteristike i funkcionalna svojstva MMC, što upućuje da uloga ovih ćelija

u patološkim stanjima mora da bude detaljno ispitana pre njihove potencijalne terapijske primene.

KLJUČNE REČI: mezenhimske matične ćelije, masno tkivo, imunofenotip, inflamatorni faktori, imunomodulacija, tumorske ćelije, migracija, epitelo-mezenhimska tranzicija

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Imunobiologija

UDK broj:

ISOLATION, CHARACTERIZATION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF HUMAN ADIPOSE TISSUE STEM CELLS

ABSTRACT

Numerous studies demonstrated that stem cells possess regenerative and modulatory properties and therefore their application in regenerative medicine and cell therapy is intensively considered. Mesenchymal stem cells (MSCs) are distributed in many tissues and organs, and have been isolated from numerous adult and perinatal tissues. The self-renewal and capacity for differentiation into mesodermal cell types, such as osteoblasts, chondrocytes, adipocytes, but also into cells of ectodermal and endodermal origin, are the most important characteristics of MSC. Although these properties provide MSCs a pivotal role in regenerative medicine, mechanisms involved in regulation of differentiation, as well as in the other functions of MSCs are only partly understood, and therefore additional studies are necessary before their clinical application. Discovery of bone marrow MSCs and investigation of their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cells transplantation, focused current research toward mutual interactions between MSCs and immune cells, which affect the phenotype and functions of both immune cells and MSCs. Immunomodulatory activity of MSCs could be mediated by direct cell contact or by secreted molecules, but the mechanisms by which MSCs exert this activity are still unclear. Due to their wide distribution, multipotent differentiation potential and immune properties, MSCs are also important participants in tissue renewal and repair. However, it was shown that beside the innate tropism for injured tissue, MSCs have the capacity to home to tumors and participate in tumor stroma formation. Additionally recent studies indicated that the proangiogenic, anti-apoptotic and/or immunomodulatory properties of MSCs may also act together as tumor promoters, raising significant safety concerns. Adipose tissue is the most distributed tissue in adult organism, consisting predominantly of adipocytes, but also progenitor cells and MSCs which contribute to tissue organization maintenance, as well as heterogeneous population of many other cell types, including immune cells. Adipose tissue is also the most abundant tissue in breast region, and breast cancer is the most frequent malignancy in women today, often associated with the reconstructive

surgery as an integral part of breast cancer treatment in which adipose tissue engineering and structural fat grafting, as well as the use of MSCs, are being applied as options for regenerative therapy. However, there are still insufficient data regarding the mutual cellular interactions of MSCs and tumor cells, especially regarding the tumor-associated MSCs or MSCs from cancer patients.

The aim of this dissertation was to isolate, characterize and compare MSCs derived from human adipose tissue (AT-MSCs) of healthy donors, but also patients with malignancy, including breast cancer patients and the corresponding adipose tissue locally adjacent to the breast cancer cells. To fulfill criteria recommended by International Society for Cellular Therapy and characterize isolated AT-MSCs, their morphology, proliferation, clonogenic capacity and immunophenotype, i.e. the expression of surface and intracellular markers of mesenchymal and hematopoietic cells, were assessed. Also, expression of embryonic stem cells markers was estimated, as well as the differentiation potential (osteogenic, adipogenic, chondrogenic and myogenic). Within the second part of the research, immunomodulatory capacity of AT-MSCs was analyzed, by evaluating the effects of AT-MSCs and their conditioned media on spontaneous, mitogen or alloantigen stimulated proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), as well as the mRNA expression of immune related molecules: Human Leukocyte Antigen (HLA)-A, HLA-DR, HLA-G5, cyclooxygenase (COX 2), indoleamine 2,3-dioxygenase-1 (IDO-1), interleukin (IL)-6, and Transforming Growth Factor (TGF)- β were estimated. In the third part, the influence of AT-MSCs on tumor cells, using human breast adenocarcinoma MCF-7 cell line as a model. The effects of AT-MSCs originating from different donors and their conditioned media on MCF-7 cells proliferation were analyzed. Additionally, the effects of conditioned media derived from interferon (IFN)- γ and/or tumor necrosis factor (TNF)- α primed breast cancer AT-MSCs (bcAT-MSCs) on different functional properties of MCF-7 cells, such as proliferation, clonogenic capacity, adhesion, migration and epithelial to mesenchymal transition were estimated, as well as the protein and gene expression of some molecules related to these properties. Also, involvement of TGF- β in the achieved effects of bcAT-MSC-derived conditioned media on migration and epithelial to mesenchymal transition was analyzed.

Results obtained demonstrated that all isolated AT-MSCs fulfilled the criteria of International Society for Cellular Therapy, exhibited similar morphology, proliferative and and clonogenic capacity, as well as the immunophenotype, expressing the characteristic mesenchymal, but not hematopoietic and embryonic stem cells markers. All AT-MSCs possessed multipotent differentiation potential, showing osteogenesis, adipogenesis, chondrogenesis and myogenesis. Regarding the immunomodulatory capacity of AT-MSCs, it was shown that AT-MSCs stimulated spontaneous, but inhibited mitogen and alloantigen stimulated proliferation of PBMC, in a manner dependent on the AT-MSCs and PBMC number ratio. Conditioned media of AT-MSCs did not affect the spontaneous and mitogen-, while inhibited alloantigen-stimulated PBMC proliferation. Additionally, AT-MSCs from different donors constitutively expressed mRNA of immunomodulation-related molecules: HLA-A, HLA-DR, IDO-1, COX2, IL-6, TGF- β . Inflammatory cytokines IFN- γ and/or TNF- α induced increase of mRNA expression of investigated immunomodulation related molecules.

Data obtained further showed that AT-MSCs isolated from healthy, as well as from patients with malignancy, significantly stimulated proliferation of MCF-7 cells, in both direct mixed co-cultures and indirect/transwell cell contacts. On the other hand, conditioned media derived from AT-MSCs cultivated for 24h stimulated, while conditioned media derived from AT-MSCs cultivated for 48h inhibited MCF-7 cells proliferation. The inhibitory effect of the conditioned media collected after 48 h cultivation of AT-MSCs on the proliferation was confirmed on other cell lines derived from different types of tumors, while this effect was absent in normal cells. When the effects of conditioned media derived from the inflammatory cytokines primed bcAT-MSC were analyzed stimulation of MCF-7 cells proliferation was also observed. In the same time, these conditioned media did not affect the colony forming ability of MCF-7 cells, although the inflammatory cytokines primed bcAT-MSCs in direct mixed co-cultures stimulated MCF-7 cells colony forming capacity. Moreover, the inflammatory cytokines primed bcAT-MSCs conditioned media decreased the adhesion, but stimulated the migration of MCF-7 cells. Additionally, these condition media stimulated the epithelial to mesenchymal transition of MCF-7 cells by reducing the protein and gene expression level of E-cadherin, no altering intracellular localization of β -catenin,

and increasing the protein and gene expression level of Vimentin in tumor cells. Furthermore, inflammatory cytokines primed bcAT-MSC conditioned media increased the enzyme activity, protein and gene expression of urokinases (uPA), while not affecting the enzyme activity of matrix metalloproteinases 2 (MMP2), although increased their protein and gene expression in MCF-7 cells. Pharmacological inhibition of TGF- β receptor abolished stimulation of MCF-7 cells migration achieved by cultivation in cytokine-primed bcAT-MSC conditioned media, and reduced the protein and gene expression of urokinases (uPA). Also, the pharmacological inhibitor of TGF- β receptor abolished stimulation of epithelial to mesenchymal transition of MCF-7 cells, blocking reduction of E-cadherin and increment of Vimentin protein expression, achieved by cultivation of MCF-7 cells in primed bcAT-MSC conditioned media.

Data obtained showed that adipose tissue represent an attractive potential source of MSCs that fulfill all the criteria of International Society for Cellular Therapy. These AT-MSCs, beside their regenerative properties, display modulatory functions, affecting the immune and tumor cells by both suppressing or favoring their growth or functional properties. Results also demonstrated that the modulatory capacity is not a constitutive property of AT-MSCs, emphasizing the importance of the specific surrounding microenvironment, and pointing to the significance of safety studies to exclude any potential clinical risk of their application in regenerative medicine.

KEY WORDS: mesenchymal stem cells, adipose tissue, immunophenotype, inflammatory factors, immunomodulation, tumor cells, migration, epithelial to mesenchymal transition

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SPECIAL TOPICS: Immunobiology

UDC number:

SADRŽAJ

1. UVOD

1.1. Matične ćelije	1-5
1.2. Mezenhimske matične ćelije	5-8
1.3. Uloga mezenhimskih matičnih ćelija u imunskom odgovoru	9-18
1.4. Uloga mezenhimskih matičnih ćelija u homeostazi i reparaciji oštećenog tkiva	19-20
1.5. Mezenhimske matične ćelije i tumori.....	21-26
1.6. Matične ćelije masnog tkiva	26-30
1.6.1. Niša matičnih ćelija masnog tkiva	31-32
1.7. Uloga matičnih ćelija masnog tkiva u tumorskoj mikrosredini	33-35

2. CILJEVI	36-38
------------------	-------

3. MATERIJAL I METODE

3.1. MEDIJUMI I PUFERI	39
------------------------------	----

3.2. ANTITELA I REAGENSI	40-41
--------------------------------	-------

3.3. HUMANI MATERIJAL

3.3.1. Mezenhimske matične ćelije (MMĆ) iz masnog tkiva	42-43
---	-------

3.3.1.1. Priprema kondicioniranog medijuma (KM) AT-MMĆ	43
--	----

3.3.2. Humane mononuklearne ćelije periferne krvi (MNĆ)	43
---	----

3.4. ĆELIJSKE LINIJE	44
----------------------------	----

3.5. EKSPERIMENTALNI DIZAJN

3.5.1. Karakterizacija mezenhimskih matičnih ćelija iz masnog tkiva (AT-MMĆ)	44-45
--	-------

3.5.2. Ispitivanje imunomodulatornog potencijala AT-MMĆ	45-46
---	-------

3.5.3. Uloga AT-MMĆ u tumorskoj mikrosredini	47-48
--	-------

3.6. ISPITIVANJE FUNKCIONALNIH SVOJSTAVA ĆELIJA

3.6.1. Proliferativni kapacitet AT-MMĆ	48-49
--	-------

3.6.2. Klonogeni kapacitet ćelija	49
---	----

3.6.3. Diferencijacija AT-MMĆ	49-50
-------------------------------------	-------

3.6.3.1. Osteogena diferencijacija	50
--	----

3.6.3.2. Adipogena diferencijacija	50
--	----

3.6.3.3. Hondrogena diferencijacija	50
---	----

3.6.3.4. Miogena diferencijacija	51
--	----

3.6.4.	Ispitivanje modulatnog uticaja AT-MMĆ na spontanu, fitohemaglutininom (PHA) i alogenima stimulisano proliferaciju MNC	
3.6.4.1.	Uticaj AT-MMĆ i njihovog KM na spontanu proliferaciju MNC	51
3.6.4.2.	Uticaj AT-MMĆ i njihovog KM na proliferaciju MNC stimulisano sa PHA	52
3.6.4.3.	Uticaj AT-MMĆ i njihovog KM na reakciju mešanih limfocita (MLR)	52-53
3.6.5.	Analiza ćelijske proliferacije BrdU testom	53
3.6.6.	Analiza ćelijske proliferacije MTT testom	53
3.6.7.	Analiza ćelijske adhezije	54
3.6.8.	Analiza ćelijske migracije	54
3.7.	ANALIZA ĆELIJSKIH PROTEINA	
3.7.1.	Imunofluorescentno bojenje ćelija	
3.7.1.1.	Protočna citometrija	55
3.7.1.2.	Indirektna imunofluorescenca	55-56
3.7.2.	Western blot analiza	
3.7.2.1.	Izolacija membranskih i citosolnih proteina	56
3.7.2.2.	Elektroforeza i SDS PAGE	57
3.7.2.3.	Imunoblot	57
3.7.2.4.	Detekcija proteinskih traka	57
3.7.3.	Analiza enzimske aktivnosti metodom zimografije	58
3.8.	ANALIZA GENSKE EKSPRESIJE	
3.8.1.	Izolacija RNK	59
3.8.2.	Reverzna transkripcija	59
3.8.3.	Reakcija lančanog umnožavanja	60
3.8.4.	Elektroforeza i vizuelizacija produkata PCR	60-61
3.9.	STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	62
4.	REZULTATI	
4.1.	MEZENHIMSKE MATIČNE ĆELIJE IZOLOVANE IZ MASNOG TKIVA (AT-MMĆ)	
4.1.1.	Izolacija i kultivacija mezenhimskih matičnih ćelija masnog tkiva	63-64
4.1.2.	Karakterizacija mezenhimskih matičnih ćelija iz masnog tkiva	

4.1.2.1. Klonogeni kapacitet AT-MMĆ	65-66
4.1.2.2. Imunofenotip AT-MMĆ	66-68
4.1.2.3. Diferencijacija AT-MMĆ	69
4.2. IMUNOMODULATORNE OSOBINE AT-MMĆ	
4.2.1. Uticaj AT-MMĆ na spontanu, mitogenom- i aloantigenom-stimulisanu proliferaciju MNC	70-72
4.2.2. Uticaj kondicioniranog medijuma (KM) AT-MMĆ na spontanu, mitogenom- i aloantigenom-stimulisanu proliferaciju MNC	72-74
4.2.3. Analiza genske ekspresije molekula uključenih u modulatorni potencijal AT-MMĆ	75-78
4.3. INTERAKCIJE AT-MMĆ SA TUMORSKIM ĆELIJAMA	
4.3.1. Uticaj AT-MMĆ i njihovih kondicioniranih medijuma na proliferaciju MCF-7 tumorskih ćelija.....	79-84
4.3.2. Uticaj tdAT-MMĆ i njihovih kondicioniranih medijuma na sposobnost formiranja CFU kolonija MCF-7 ćelija	85-86
4.3.3. Uticaj kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ na adhezivnost MCF-7 ćelija	87
4.3.4. Uticaj kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ na migraciju MCF-7 ćelija	88-89
4.3.5. Uticaj kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ na ekspresiju urokinaza i matriksnih metaloproteinaza	
4.3.5.1. Urokinaze uPA sistema	90-91
4.3.5.2 Matriksne metaloproteinaze (MMP)	92-93
4.3.6. Uticaj kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ na proces epitelo-mezenhimske tranzicije tumorskih ćelija	94-98
4.3.7. Uloga TGF- β u interakcijama tdAT-MMĆ sa MCF-7 tumorskim ćelijama	98-104
5.DISKUSIJA	105-120
6.ZAKLJUČCI	121-123
7.LITERATURA	124-143

1. UVOD

1.1. Matične ćelije

Istraživanja koja su u 19. veku bila posvećena rasvetljavanju evolucije organizama, filogeniji i definisanju zajedničkog pretka svih organizama, usmerila su pažnju naučnika sa filogenije i na ontogeniju, odnosno embriologiju. Pojam matične ćelije uveo je nemački biolog Ernst Haeckel u svojim radovima (*Haeckel, 1868*), označavajući zajedničkog pretka svih organizama ili jednu oplođenu jajnu ćeliju. Veliki doprinos u daljim istraživanjima u ovoj oblasti dao je August Weismann (*Weismann, 1885*), koji je podelio ćelije u organizmu na polne, od kojih mogu da nastanu ostale ćelije, i telesne, somatske ćelije. Nakon toga, Theodor Boveri i Valentin Hacker su u svojim radovima pokazali da polne ćelije sadrže hromatin koji se prenosi u sledeće generacije, kao i da se kod oplođenih jajnih ćelija i polnih ćelija javljaju asimetrične ćelijske deobe (*Boveri 1892, Hacker, 1892*). Međutim, zbog specifičnih osobina populacije matičnih ćelija, njihove izuzetno male brojčane zastupljenosti, kao i činjenice da se morfološki ne mogu razlikovati od ostalih tkivno-specifičnih ćelija, matične ćelije kao posebni ćelijski entiteti identifikovane su mnogo godina kasnije, početkom šezdesetih godina dvadesetog veka. Veliki napredak u identifikaciji i izučavanju biologije matičnih ćelija praćen je i razvojem metoda izolacije različitih matičnih ćelija, i paralelno sa razvojem bioeseja za testiranje njihovog potencijala nakon transplantacija *in vivo*.

Matične ćelije predstavljaju jedinice biološke organizacije uključene u razvoj i regeneraciju tkiva i organa, ali i ćinioce uključene u prirodnu selekciju. Prilikom deoba matičnih ćelija, ćerke ćelije mogu, s jedne strane, da budu usmerene ka formiranju specijalizovanih tipova ćelija, ili ka samoobnovi, procesu zahvaljujući kome se održava ukupni fond matičnih ćelija u adultnim organima. Ovakva ćelijska deoba se naziva asimetričnom i predstavlja neophodni fiziološki mehanizam održavanja populacija matičnih ćelija u tkivima i organima. Pretpostavlja se da iako je ćelijski ciklus matičnih ćelija usporen, zbog čega predstavljaju malu ćelijsku populaciju u tkivima, ove ćelije imaju visok klonogeni kapacitet, koji omogućava da od malobrojne populacije primitivnih matičnih ćelija nastaje niz tranzitnih kategorija matičnih ćelija od kojih diferenciranjem nastaju zrele ćelije (*Ramalho-Santos i Willenbring, 2006, Simons i Clevers, 2011, Eridani, 2014*).

Kada ćelije dostignu fiziološku zrelost, one mogu da podlegnu procesu apoptoze ili nekom drugom obliku ćelijske smrti, nakon čega ih zamenjuju nove ćelije nastale

postupnom diferencijacijom matičnih ćelija. Ontogenetski razvoj matičnih ćelija obuhvata nekoliko različitih stepena razvoja i zrelosti matičnih ćelija, koji se razlikuju na osnovu različitog potencijala diferenciranja. Totipotentne matične ćelije su zapravo blastomere koje nastaju u prvim deobama zigota, koje se mogu diferencirati u bilo koji tip ćelija, i od kojih nastaju sve ćelije i embriona i placentе, odnosno sva tkiva živog organizma. Pluripotentne matične ćelije su ćelije embriona, potomci totipotentnih ćelija koje mogu da se diferenciraju u ćelije sva tri klicina lista (ektoderm, mezoderm i endoderm), nalaze se u unutrašnjoj masi blastocista. Ove ćelije su prvi put izolovane iz embriona miša (*Evans, 1981*) kao embrionalne matične ćelije sposobne da daju sve somatske ćelije. Humane embrionalne matične ćelije su prvi put izolovane 1998. godine (*Thomson i sar., 1998.*) iz humanih embriona koje su donirali parovi koji su bili podvrgnuti *in vitro* fertilizaciji. Kasnije je pokazano da blastocist nije jedini izvor pluripotentnih matičnih ćelija, te da se embrionalne matične ćelije mogu dobiti iz primordijalnih germinativnih ćelija (*De-Miguel i sar., 2009*). Zbog svog širokog potencijala diferencijacije i potencijalne primene u regenerativnoj medicini, embrionalne matične ćelije su privukle posebnu pažnju današnjih istraživanja, ali iz etičkih razloga, ovakav način dobijanja embrionalnih matičnih ćelija je obustavljen u mnogim zemljama. Multipotentne matične ćelije se nalaze u mnogim adultnim i fetalnim tkivima i organima i one mogu da daju različite tipove ćelija, ali samo u okviru jednog klicinog lista, a najviše izučavane multipotentne matične ćelije su hematopoetske matične ćelije (HMC). Unipotentne matične ćelije se mogu diferencirati u samo jedan tip ćelija, pri tom zadržavajući sposobnost samobnove, kao što je na primer spermatogonijalna matična ćelija. Skoriji nalazi koji su pokazali da neke matične ćelije, posebno u kostnoj srži odraslog organizma i krvi pupčanika, mogu imati sposobnost diferencijacije u sva tri klicina sloja, uputili su na pretpostavku postojanja subpopulacije pluripotentnih matičnih ćelija i u adultnom organizmu (*Bianco i sar., 2008, Ratajczak i sar., 2008*).

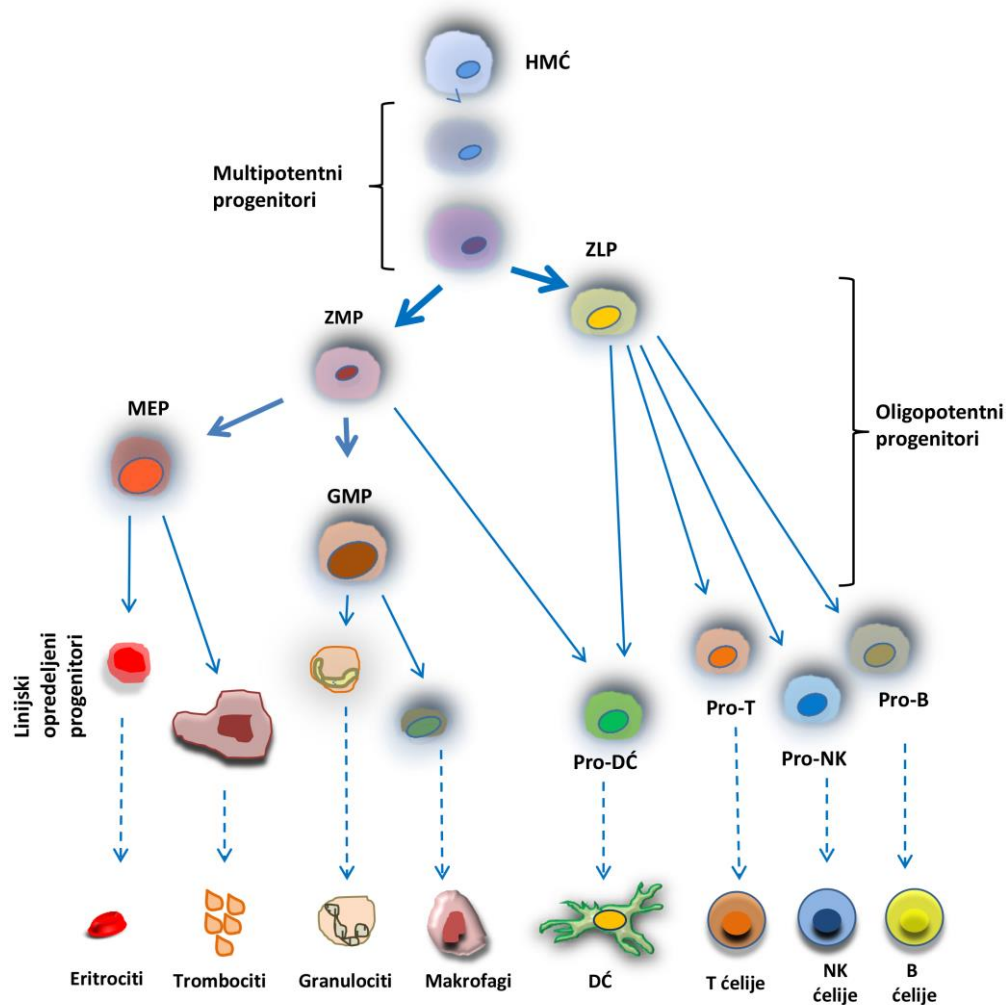
Celokupna današnja istraživanja matičnih ćelija prvenstveno su zasnovana na saznanjima o hematopoetskim matičnim ćelijama (HMC). Prvi nalazi o postojanju HMC javljaju se još u 19. veku, kada je Artur Pappenheim prvi pretpostavio da crvene i bele ćelije krvi potiču od jedne zajedničke prekursorske ćelije koju je opisao kao matičnu ćeliju (*Pappenheim, 1896, Pappenheim 1905*). Otkriću HMC, sposobnih da se

diferenciraju u sve ćelije krvi, doprinela su ispitivanja započeta neposredno nakon Drugog svetskog rata, kada se u prvim istraživanjima pretpostavilo postojanje potencijalnih ćelijskih i humoralnih faktora kostne srži, uključenih u oporavak miševa izloženih zračenju (*Jacobson i sar., 1949, Lorenz i sar., 1951, Till i McCulloch 1961, Eridani 2014*). Početkom šezdesetih godina prošlog veka, u klasičnim eksperimentima Till-a i McCullocha pokazano je da se u slezini letalno ozračenih miševa nakon ubrizgavanja ćelija kostne srži normalnih miševa nalaze repopulišuće ćelije koje formiraju makroskopski vidljive „čvoriće“, koje su nazvane jedinicama formiranja kolonija slezine (CFU-S, *Colony-Forming Unit- Spleen*). Ovaj prvi klonalni ogled u eksperimentalnoj hematologiji doprineo je otkriću HMC, za koje je kasnije pokazano da imaju svojstva samoobnavljanja i diferencijacije (*Till i McCulloch 1961, Siminovitch i sar., 1963*).

Dalje studije posvećene HMC odvijale su se u dva pravca. Jedan se odnosio na istraživanja različitog kapaciteta samoobnavljanja kod HMC, kao i heterogenosti populacije ovih ćelija, s obzirom na pokazano postojanje kako funkcionalnih razlika, tako i razlika u zrelosti ćelija unutar populacije HMC. Danas se HMC grubo dele na dve populacije, dugotrajno repopulišuće, tj. primitivnije HMC (LT-HSC, *Long-Term Hematopoietic Stem Cells*) koje dugoročno obnavljaju hematopoezu i kratkotrajno repopulišuće, relativno manje primitivne HMC (ST-HSC, *Short-Term HSC*) koje imaju ograničen potencijal obnavljanja hematopoeze (*Morrison, 1994, Eridani, 2014*). Drugi pravac istraživanja se odnosio na samu ontogeniju HMC i kao što je danas poznato, hematopoeza se tokom razvića odvija na različitim mestima: žumančana kesa u embrionalnoj fazi, jetra u fetalnoj fazi, timusu i slezini, te od petog meseca intrauterinog života u kostnoj srži, koja postaje glavni hematopoezni organ i postnatalno potpuno preuzima funkciju hematopoeze. U specifičnoj mikrosredini kostne srži, HMC se nalaze u tzv. nišama, endostealnim i perivaskularnim prostorima između krvnih sudova, koje se nalaze na različitim mestima u kostnoj srži u zavisnosti od vrste hematopoetskih ćelija i njihove diferenciranosti i koje imaju vrlo važnu ulogu u održavanju populacije matičnih ćelija hematopoeze (*Eridani, 2014*).

Hematopoeza je izuzetno kompleksan, hijerarhijski organizovan proces stvaranja zrelih ćelija krvi, koje bez obzira na morfološku i funkcionalnu raznolikost i

specijalizovanost vode poreklo od zajedničke multipotentne matične ćelije hematopoeze. Zrele i terminalno diferencirane ćelije hematopoeze proliferišu brzo i imaju kratak životni vek, te u cilju održavanja homeostaze organizma kroz kontinuirane procese proliferacije, diferencijacije i sazrevanja od malobrojne populacije primitivnih multipotentnih matičnih ćelija hematopoeze nastaje niz tranzitnih kategorija matičnih ćelija, opredeljenih za više, dve ili samo jednu krvnu lozu, od kojih diferenciranjem nastaju morfološki prepoznatljive ćelije date loze iz kojih dalje nastaju zrele ćelije krvi. Stoga se heterogena ćelijska populacija matičnih ćelija hematopoeze često predstavlja kao “razvojni kontinuum” ćelija različitog stepena zrelosti i opisuju se kao populacija piramidalne organizacije, u kojoj svaki sledeći odeljak karakteriše povećani kapacitet za proliferaciju i amplifikaciju, odnosno uvećanje broja ćelija, tako da je svaki sledeći, ishodni odeljak veći od prethodnog. Opredeljivanjem i prelaskom HMC u sledeći odeljak, HMC progresivno gube sposobnost za samoobnavljanje, ali uz povećanu proliferativnu aktivnost dolazi do povećane diferenciranosti, odnosno progresivne specijalizacije ćelija. Na ovaj način mali broj ćelija prethodnika stvara veliki broj zrelih ćelija (*Bryder i sar., 2006, Morrison i sar., 2008*). Postepena diferencijacija HMC ogleda se u nastajanju multipotentnih opredeljenih progenitora koji su znatno brojniji od HMC, oligopotentnih progenitorskih ćelija mijeloidne i limfoidne loze, i linijski opredeljenih progenitora koji svojom diferencijacijom daju ćelije mijeloidne (eritrociti, trombociti, granulociti, makrofagi) i limfoidne (T, B i NK ćelije) loze kao i dendritične ćelije (**Slika 1.**) (*Bryder i sar., 2006*).



Slika 1. Shematski prikaz organizacije procesa hematopoeze. ZMP - zajednički mijeloidni progenitori; ZLP - zajednički limfoidni progenitori; MEP - megakariocitni-eritrocitni progenitori; GMP - granulocitno-monocitni progenitori; pro-DČ – progenitori dendritičnih ćelija; pro-T – progenitori T ćelija; pro-NK - progenitori NK ćelija; pro-B – progenitori B ćelija; DČ - dendritične ćelije, NK- od eng. *Natural Killer* ćelije. **Preuzeto i izmenjeno prema Bryder i sar., 2006.**

1.2. Mezenhimske matične ćelije (MMC)

Klasični eksperimenti transplantacije kostne srži na različita anatomska mesta koje su rezultovale *de novo* stvaranjem kosti i kostne srži (Friedenstein i sar., 1966), a takođe i radovi Tavassoli-a i Crosby-a (Tavassoli i Crosby, 1968), ukazali su na nerazdvojivost osteogenog potencijala kosti sa kostnom srži. Na osnovu ovih nalaza,

nastao je današnji koncept mezenhimskih matičnih ćelija (MMĆ), termin koji je prvi uveo Caplan 1991. godine (*Caplan, 1991*).

Fridenstein i saradnici su u serijskim istraživanjima od 1960. do 1970. godine pokazali da osteogeni potencijal koje je otkriven pri transplantaciji ćelija kostne srži, bio povezan zapravo sa posebnom, malom subpopulacijom ćelija iz kostne srži. Ove ćelije su se razlikovale od ostalih, prvenstveno hematopoetskih ćelija, po brzoj adherentnosti za sudove za kultivaciju, kao i po svom obliku sličnom fibroblastima, ukazujući da vode poreklo iz strome hematopoetske mikrosredine kostne srži. Radovi Fridensteina i saradnika bili su posvećeni istraživanju stromalnih ćelija kostne srži, te je na pokazanoj sposobnosti formiranja kolonija iz samo jedne ćelije i razvoju originalnog sistema kultivisanja kolonija ćelija sličnih fibroblastima (CFU-F, *Colony Forming Unit-Fibroblast*) ukazano na njihovu adherentnu, klonogenu, nefagocitnu i fibroblastnu prirodu (*Friedenstein i sar., 1966, Friedenstein i sar., 1970*). Transplantacije *in vivo* su potvrdile da skeletna tkiva (kost, hrskavica, masno i fibrozno tkivo) mogu nastati od jedne stromalne ćelije kostne srži (*Friedenstein i sar., 1987*). Fiedenstein i Owen su ovu ćeliju nazvali osteogenom matičnom ćelijom ili stromalnom matičnom ćelijom kostne srži (*Owen i Friedenstein, 1988*). Ova saznanja značajno su doprinela razvoju eksperimentalne hematologije, ali i kasnijem izučavanju kako biologije, tako i različitih oboljenja, kostiju. Koncept o nehematopoetskoj matičnoj ćeliji u kostnoj srži je prihvaćen tek 1999. godine (*Pittenger i sar., 1999*), a u sklopu istovremenog otkrivanja embrionalnih matičnih ćelija, termin mezenhimska matična ćelija je predložen kao alternativa za „stromalnu“ odnosno „osteogenu“ matičnu ćeliju (*Caplan, 1991*).

Niše koje hematopoetske matične ćelije (HMC) zauzimaju tokom razvoja organizma (*Campagnoli i sar., 2001*), kao i potporne uloge koju MMĆ imaju u hematopoezi koja se odvija u kostnoj srži, a koja se ogleda u podržavanju preživljavanja, proliferacije i diferencijacije HMC (*Pontikoglou i sar., 2011*), govore o tome da MMĆ mogu svoju potpornu ulogu da ispoljavaju i tokom embrionalne faze razvoja, kada se hematopoeza odvija u žumančanoj kesi. Pokazano je da se (MMĆ) nalaze u stromalnom sloju koji se nalazi ispod primitivnog hematopoetskog sloja dorzalne aorte u aorto-gonadalno-mezonefričkom regionu kod humanih embriona u kome se nalazi gusto pakovan ćelijski sloj mezenhima, čije ćelije ne eksprimiraju

hematopoetske i endotelske markere, ali eksprimiraju proteine ekstracelularnog matriksa koji formiraju stromu (*Javazon i sar., 2004, Wang i sar., 2008*). Pretpostavlja se da MMĆ iz aorto-gonadalno-mezonefričkog regiona, migriraju naseljavajući fetalnu jetru, a kasnije i kostnu srž, „prateći“ HMC (Wang i sar., 2008). Smatra se da su mezotelne ćelije koje potiču iz aorto-gonadalno-mezonefričkog regiona, zapravo ćelije od kojih potiču HMC i MMĆ (*De-Miguel i sar., 2009*), kao i da se populacije matičnih ćelija prisutnih u embrionu raspoređuju u različita adultna tkiva i organe tokom razvoja gde imaju ulogu u obnavljanju i regeneraciji tkiva (*Ratajczak i sar., 2008, De-Miguel i sar., 2009*). Tako je danas je prihvaćeno da se MMĆ nalaze u brojnim adultnim tkivima u kojima imaju ulogu održavanja ćelijske populacije tkiva, kao i obnavljanju tkiva nakon oštećenja (*Feng i sar., 2011*).

Do danas, izolovane su MMĆ iz različitih adultnih i perinatalnih tkiva: kostne srži, masnog tkiva, periferne krvi, dentalnih, ali i amniotske tečnosti i membrane, horionske membrane i resica, placente, krvi pupčanika i samog tkiva pupčanika (Vartanova sluz) (*Hass i sar., 2011*). Brojni istraživači su razvili metode izolacije i ekspanzije MMĆ, ali je ubrzo postalo jasno da unutar ovih izolovanih ćelijskih populacija postoji velika heterogenost u pogledu potencijala diferencijacije, proliferacije i prisutnosti površinskih antigena. Razlike u metodološkim pristupima i tkivima iz kojih potiču, otežavale su poređenje bioloških svojstava MMĆ i rezultata eksperimenata, a posebno u kontekstu njihovog korišćenja u ćelijskoj terapiji. Iz tih razloga, Komitet za mezenhimalne i tkivne matične ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju postavio je standarde za definisanje MMĆ, korišćenih kako za eksperimentalna naučna istraživanja, tako i za predkliničke i kliničke studije (*Bary i Murphy, 2004, Dominici i sar., 2006, Kolf i sar., 2007, Ding i sar., 2011*). Ovi kriterijumi počivaju na najbitnijim karakteristikama MMĆ. Prvi uslov se odnosi na adherentnost MMĆ za plastiku, koja se održava pri kultivaciji ćelija u standardnim uslovima. Drugi se odnosi na specifičnu ekspresiju površinskih antigena koju moraju da zadovoljavaju, te je stoga neophodno da MMĆ eksprimiraju površinske CD (*Cluster of Differentiation*) markere CD105, CD90 i CD73, koji su najpoznatiji markeri za identifikaciju MMĆ. S druge strane, markeri hematopoetskih ćelija CD34, CD45, CD11b, CD14, CD79, CD19, kao i molekuli HLA (*Human Leukocyte Antigen*) klase II ne bi trebalo da budu zastupljeni u populaciji MMĆ (*Dominici i sar., 2006, Kolf i sar., 2007*). Treći uslov je multipotentni potencijal

diferencijacije izolovanih MMĆ, odnosno sposobnost diferenciranja u tri linije ćelija mezodermalnog porekla: osteoblaste, adipocite i hondroblaste u standardnim *in vitro* uslovima. Potrebno je naglasiti da nijedan od ovih kriterijuma ne može da se uzima u obzir samostalno kad je u pitanju identifikacija MMĆ, već je neophodno sagledati kako ekspresiju antigena, tako i funkcionalne osobine izolovanih MMĆ. Takođe, zahvaljujući velikom potencijalu ekspanzije MMĆ u *in vitro* uslovima, neophodno je sva tri kriterijuma proveravati tokom različitih pasaža, a posebno se naglašava provera kariotipa, jer tokom kultivacije ćelija može da dođe do različitih hromozomskih aberacija, transformacije ili čak nastanka nove ćelijske linije koja se više ne može opisati kao MMĆ (Dominici i sar., 2006).

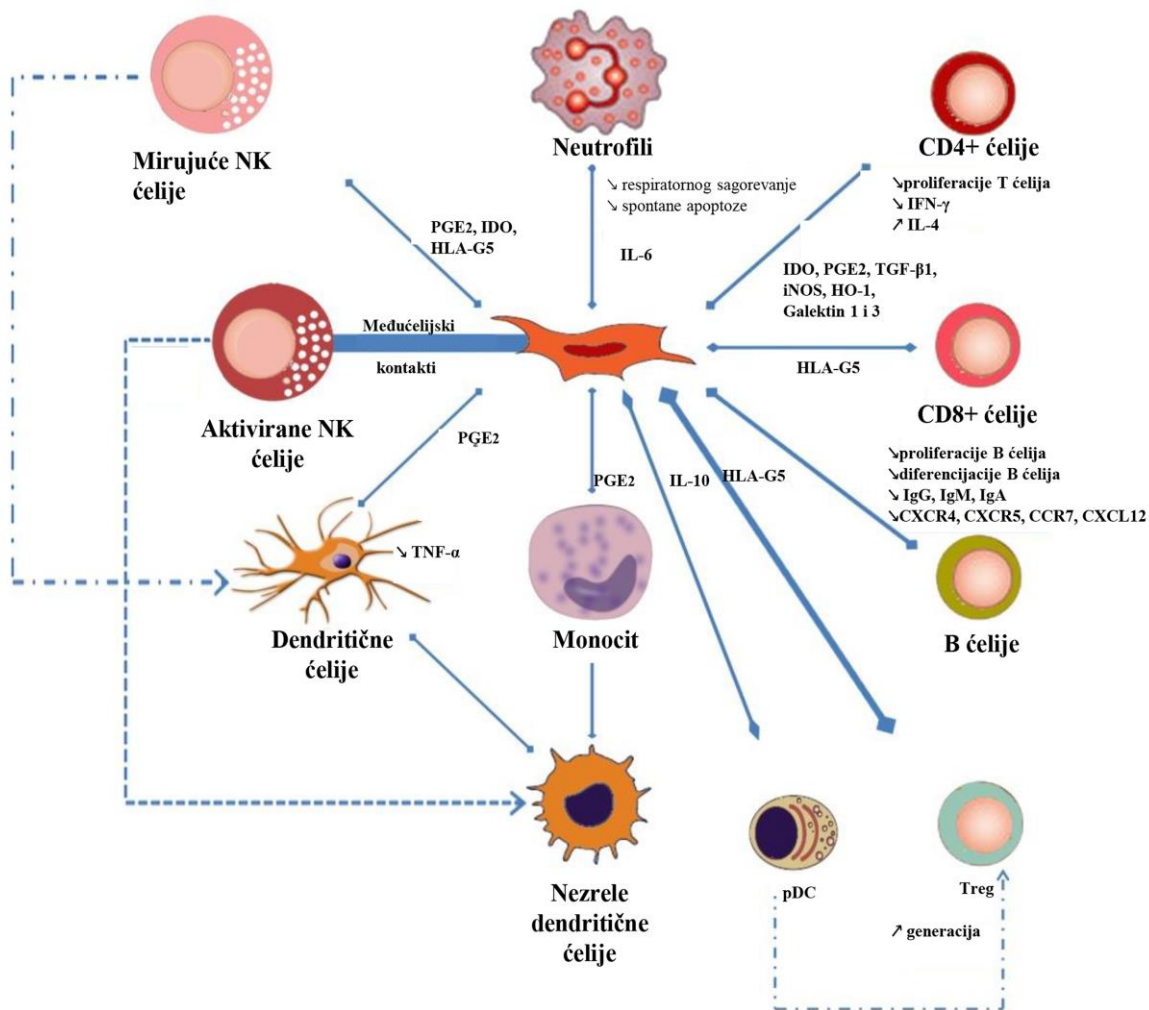
Regenerativni potencijal MMĆ zasniva se na sposobnosti diferencijacije u različita mezenhimska tkiva kao što su kost, hrskavica, mišići, ligamenti, masno tkivo i druga vezivna tkiva. Zahvaljujući potvrđenom multipotentnom potencijalu diferencijacije, pri čemu MMĆ daju ćelije mezodermalnog (osteoblasti, hondroblasti i adipociti), ali i ektodermalnog (neuralne ćelije) i endodermalnog (ćelije jetre i pankreasa) (Caplan i sar., 2007, Patel i sar., 2013) porekla, kao i lako dostupnim izvorima za izolaciju, MMĆ pokazuju veliki potencijal za različite terapijske primene u regenerativnoj medicini i inženjeringu tkiva. Pored toga, MMĆ proizvode brojne bioaktivne molekule koji imaju imunoregulatornu ulogu, ali i učestvuju u brojnim procesima u okviru specifične mikrosredine prilikom povrede tkivne strukture i/ili funkcije ćelija. Parakrina funkcija, kao i sposobnost migracije MMĆ na mesta gde su nastala oštećenja tkiva gde MMĆ ubrzavaju procese reparacije tkiva, čine MMĆ važnim trofičkim faktorima (Caplan i sar., 2007, Murphy i sar., 2013). Sve ove osobine čine MMĆ dobrim kandidatima za lečenje bolesti jetre, bubrega, kostiju, srca i imunskih oboljenja (Caplan i sar., 2007, Patel i sar., 2013.). Međutim, i pored ogromnog napretka u razumevanju biologije MMĆ i intenzivnih ispitivanja usmerenih ka novim terapijskim pristupima, jasno je i da su za njihovu konačnu primenu u terapiji neophodna još mnogobrojna istraživanja (Borolongan, 2011, Rodgeron i sar., 2011, Murphy i sar., 2013).

1.3. Uloga mezenhimskih matičnih ćelija u imunskom odgovoru

Fiziološka lokacija MMĆ, odnosno specifična niša u kostnoj srži, pružila je informacije o njihovoj različitoj ulozi u ovom tkivu. Naime, pored regenerativnog potencijala, pokazano je da MMĆ poseduju i izražena imunomodulatorna svojstva. Prvootkrivene MMĆ poreklom iz kostne srži, lokalizovane su u mećuprostoru između periferije i šupljine u srži, i predstavljaju svojevrsnu prvu liniju odbrane kostne srži. Kasniji eksperimentalni podaci pokazali su da MMĆ u zavisnosti od faktora mikrosredine u kojoj se nalaze mogu imati imunostimulatorno ili imunosupresivno dejstvo (*Ma i sar., 2013*). Takoće, pokazano je da MMĆ mogu na različite načine da stupaju u interakcije sa imunskim ćelijama, pri ćemu su ove interakcije dvosmerne prirode, i njihove posledice se ogledaju u promenama i na MMĆ i na imunskim ćelijama (*Yagi i sar., 2010*).

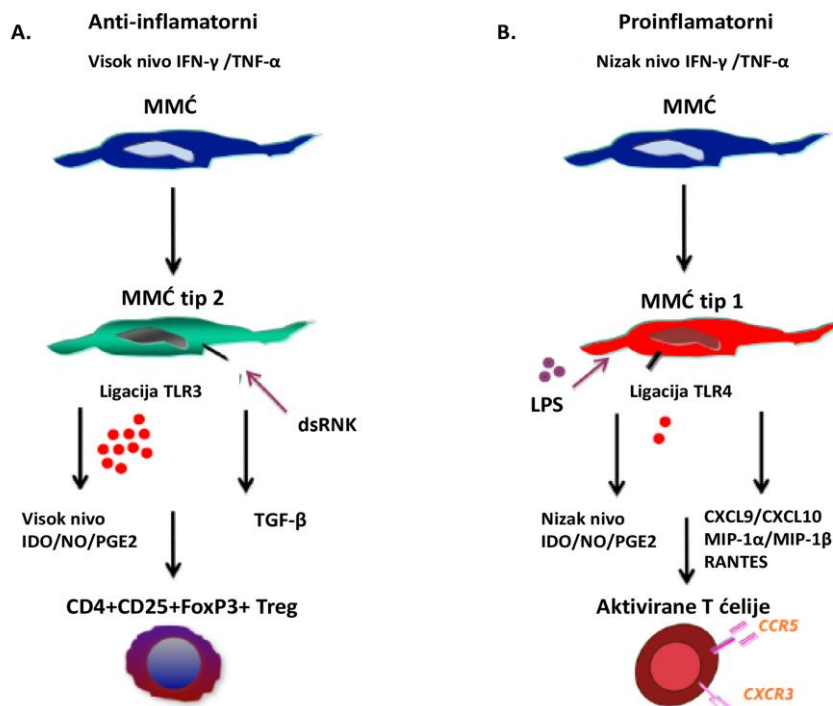
Naćin na koji MMĆ mogu spontano da menjaju imunski status, zasniva se na njihovoj mogućnosti da obraćuju antigene i eksprimiraju kostimulatorne molekule u imunološkoj sinapsi. Prvobitni nalazi o imunoprivilegovanosti MMĆ bili su zasnovani na detektovanoj smanjenoj ekspresiji glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) molekula klase I i II, kao i kostimulatornih molekula CD40, CD80 i CD86 ali i rezultatima *in vitro* testova u kojima MMĆ nisu dovodile do aktivacije i proliferacije T ćelija (*Le Blanc i sar., 2003, Agarawal i sar., 2005., Bassi i sar., 2011, Ma i sar., 2014*). Mećutim, pokazano je i da MMĆ mogu da eksprimiraju molekule glavnog kompleksa histokompatibilnosti (MHC, *Major Histocompatibility Complex*), uključujući i klasu II MHC molekula, kao i da je nivo ekspresije MHC molekula podloćan promeni, odnosno moće da se povećava kada su MMĆ izloćene proinflamatornim citokinima (*Ankrum i sar., 2014*). Na taj naćin moće doći do povećanja antigen-prezentujuće sposobnosti i imunogenosti MMĆ. Pored toga, pokazno je i da inflamatorni citokini (produkovani od strane T ćelija) mogu izazvati ekspresiju negativnog kostimulatornog molekula B7-H1, odnosno liganda programirane ćelijske smrti (PD-L1, *Programmed Death-Ligand 1*) na MMĆ, ćime se stvara povratna sprega i opadanje imunskog odgovora (*Yagi i sar., 2010, Hass i sar., 2011*). Ovi nalazi govore u prilog tome da MMĆ zapravo nisu imunoprivilegovane, već su naprotiv, reaktivne na ćelijske i humoralne faktore imunskog odgovora.

Brojna istraživanja ukazuju na izražene imunosupresorske karakteristike MMC, koje se ogledaju u uticaju na proliferaciju i funkcije najvažnijih ćelija učesnika imunskog odgovora: T i B limfocite, NK ćelije, regulatorne T ćelije (Treg), dendritične ćelije, i to kako u *in vitro* tako i *in vivo* uslovima (Ghannam i sar., 2010, Chen i sar., 2011). Osnovni vidovi supresije imunskog odgovora posredstvom MMC odnose se na inhibiciju diferencijacije dendritičnih ćelija, povećanje broja Treg ćelija, i smanjenje broja efektorskih T i NK (*Natural Killer*) ćelija (Hass i sar., 2011). Mećućelijski kontakti i brojni solubilni faktori su glavni regulatori imunosupresorskih svojsta MMC (Slika 2.).



Slika 2. Mehanizmi interakcija MMC sa imunskim ćelijama. MMC mogu da inhibiraju proliferaciju i citotoksičnost mirujućih NK ćelija, kao i $CD4^+$ T ćelija. MMC takođe inhibiraju diferencijaciju monocita u nezrele mijeloidne dendritične ćelije (DĆ) ali i, inhibiraju produkciju $TNF-\alpha$ od strane DĆ i povećavaju produkciju IL-10 od strane plazmocitoidnih DĆ (pDC). Ovi mehanizmi su posredovani sa više solubilnih faktora: prostaglandina 2 (PGE_2), indoleamin-oksigenaza (IDO), transformišući faktor rasta ($TGF-\beta$, *Transforming Growth Factor-β*), faktor rasta hepatocita (HGF, *Hepatocyte Growth Factor*), inducibilna azot-oksida sintetaza (iNOS, *inducible nitric oxide synthase*), hemoksigenaza-1 (HO-1) i HLA-G5. Inhibicija citotoksičnosti $CD8^+$ T ćelija i diferencijacija Treg je direktno posredovana oslobađanjem sHLA-G5 od strane MMC. Pored toga, povećana produkcija IL-10 od strane plazmocitoidnih DĆ rezultuje u produkciji Treg. Inhibicija funkcija B ćelija je posredovana kako direktnim ćelijskim kontaktima, tako i solubilnim faktorima. Konstitutivno eksprimiranje i oslobađanje IL-6 odlaže spontanu apoptozu neutrofila. *Preuzeto i izmenjeno prema Haddad, 2011.*

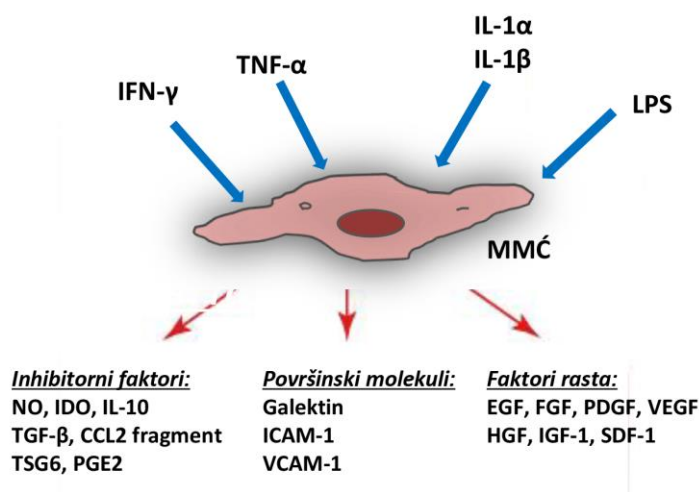
Sposobnost MMC da moduliraju imunski odgovor zasniva se na uticaju ovih ćelija kako na adaptivni tako i na urođeni imunski odgovor. Novija ispitivanja potvrđuju da MMC aktivno reaguju sa komponentama urođene imunosti i da preko tih interakcija mogu da ispoljavaju i antiinflamatorno i proinflamatorno dejstvo (*Le Blanc i Mougiakakos, 2012, Prockop i Oh, 2012, Bernardo i Fibbe, 2013, Ma i sar., 2013*). Samo nekoliko sati nakon inflamatornog stimulusa, molekuli eksprimirani od strane patogena ili povređenog tkiva bivaju prepoznati od strane receptora sličnom Toll-u (TLRs, *Toll Like Receptor*) na efektorskim ćelijama urođene imunosti. Ligacija TLR dovodi do fagocitoze i oslobađanja inflamatornih medijatora koji indukuju urođeni imunski odgovor aktivacijom makrofaga i neutrofila. Ligacija TLR mećutim dovodi i do aktivacije MMC kao stromalnih ćelija, formirajući na taj način inflamatornu mikrosredinu (*Bernardo i Fibbe, 2013*). Pokazano je da aktivacija razlićitih TLR prisutnih na MMC (prvenstveno TLR4 i TLR3) dovodi do razlićitih modulatornih efekata MMC na imunski odgovor, ali utiće i na produkciju razlićitih solubilnih molekula od strane MMC (*Waterman i sar., 2010*). Pod uticajem proinflamatornih citokina kao što su interferon (IFN)- γ i faktor nekroze tumora (TNF- α , *Tumor Necrosis Factor- α*), koji su produkovani od strane makrofaga ili T ćelija, MMC mogu “usvojiti” anti-inflamatorni (Tip 2) fenotip, koji suprimira inflamaciju i promoviše tkivnu homeostazu. Ovi procesi su zavisni kako od mećućelijskih kontakata, tako i od lokalno produkovanih solubilnih faktora. Naime, MMC konstitutivno produkuju IL-6, koji indukuje stvaranje M2 makrofaga koji potom produkuju IL-10. U odsustvu IL-6, MMC indukuju stvaranje M1 makrofaga od monocita, koji produkuju proinflamatorne citokine INF- γ i TNF- α . Ovi citokini prisutni u povećanim koncentracijama zauzvrat deluju na MMC kao povratni anti-inflamatorni mehanizam (*Eggenhofer i sar., 2011, Bernardo i Fibbe, 2013*) (**Slika 3.**). S druge strane, lipopolisaharid (LPS) Gram negativnih bakterija može u početnoj fazi inflamacije aktivirati TLR4 kod MMC, kada ove ćelije stiću pro-inflamatorni (Tip 1) fenotip. Ova ligacija TLR4 indukuje produkciju IL-6, IL-8, GM-CSF (GM-CSF, *Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor*) kao i inhibitorni faktor migracije makrofaga (MIF, *macrophage migration inhibitory factor*), što mobilise neutrofile i omogućava njihovu proinflamatornu aktivnost. Pored toga MMC produkuju i brojne hemokine (CXCL-9, CXCL-10 i CXCL-11) čime se stimuliše mobilizacija limfocita na mesto inflamacije (*Cassatella i sar., 2011*) (**Slika 3.**).



Slika 3. Polarizacija MMČ ka proinflamatornom (Tip 1) i antiinflamatornom (Tip 2) fenotipu. A. U prisustvu inflamatorne sredine (IFN- γ i TNF- α), MMČ se aktiviraju i usvajaju M2 imunosupresivni fenotip. Prelaz od Tip 1 ka Tip 2 fenotipu može takođe da se desi stimulacijom receptora za Toll-like (TLRs) koji su eksprimirani na njihovoj površini. Stimulacija TLR3 dovodi do antiinflamatornog fenotipa Tip 2. Usled produkcije TGF- β , pojavljuju se i Treg ćelije. B. U odsustvu inflamatornih signala, MMČ mogu usvojiti inflamatorni fenotip Tip 1, olakšavajući T ćelijski odgovor, sekrecijom hemokina koji dovode limfocite na mesto inflamacije (inflamatorni protein makrofaga (MIP, *Macrophage Inflammatory Protein*), CCL5, CXCL9 i CXCL10). Ovi hemokini se vezuju za receptore na T ćelijama (CCR5, CXCR3). Stimulacija TLR4 takođe polarizuje MMČ u pravcu Tip 1 fenotipa. Preuzeto i izmenjeno prema Bernardo i Fibbe, 2013.

Ovo svojstvo MMČ da prilagođavaju svoj fenotip kao odgovor na inflamatornu sredinu je presudno za razumevanje njihovog terapijskog potencijala u imunskim oboljenjima, s obzirom da MMČ mogu da budu senzori inflamacije koja nastaje kao protektivni odgovor izazvan infekcijom patogenima, ali i nakon povreda tkiva. Stoga, za razumevanje imunoregulatornih svojstava MMČ potrebno je imati u vidu da inflamatorna mikrosredina posredstvom citokina, ali i brojni faktori koje MMČ

ekspimiraju i proizvode, oblikuju funkcije MMĆ koje one imaju u imunskom sistemu i popravci oštećenja tkiva (*Shi i sar., 2012, Ma i sar., 2013*). Sposobnost MMĆ posredovana inflamatornom sredinom da inhibira aktivnost imunskih ćelija pokazana je u brojnim radovima (*Ryan i sar., 2007, Prockop i Oh, 2011*), pri čemu citokini poput IFN- γ i TNF- α imaju posebno važnu i kompleksnu ulogu. Interferon- γ u kombinaciji sa nekim od proinflamatornih citokina, TNF- α , IL-1 α ili IL-1 β može da stimuliše MMĆ na produkciju brojnih imunosupresivnih faktora, kao i hemokina i adhezivnih molekula, uključujući CXCR3 i CCR5 ligande, intercelularni adhezivni molekul-1 (ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*) i adhezivni molekul vaskularnih ćelija (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1*) (**Slika 4.**). Njihova usklađena aktivnost dovodi do akumulacije imunskih ćelija u blizini MMĆ, amplifikujući aktivnost faktora MMĆ i dovodeći do imunosupresije. S druge strane TNF- α može da indukuje faktor nekroze tumora-inducibilni gen-6 (TSG6, *tumor necrosis factor-inducible gene-6*) kao antiinflamatorni protein (*Prockop i Oh, 2011, Shi i sar., 2012, Ma i sar., 2013*).



Slika 4. Efekat inflamatornih citokina na MMĆ. Saradnja MMĆ i imunskog sistema ogleda se u efektima inflamatornih citokina na MMĆ koji dovode do oslobađanja a) imunosupresivnih faktora, b) izmenjene ekspresije površinskih molekula i c) produkcije faktora rasta. Ovi faktori/molekuli su ključne komponente imunoregulacije i popravke tkiva posredovane MMĆ. *Preuzeto i izmenjeno prema Shi i sar., 2012.*

Interferon (IFN)- γ je glavni citokin aktivacije makrofaga i ima ključnu ulogu u imunosti usmerenoj protiv intracelularnih bakterijskih infekcija. On pripada grupi interferona tipa II, čije se funkcije, i pored određenih antiviralnih i antitumorskih efekata, uglavnom vezuju za aktivaciju efektorskih ćelija imunskog sistema. Ovaj protein homodimer, pored CD4⁺ Th1 ćelija, produkuju i NK i CD8⁺ T ćelije, a glavne funkcije IFN- γ su aktivacija makrofaga i ubijanje fagocitovanih mikroba, dejstvo na B ćelije i stimulacija izmene određene IgG potklase (IgG2a i IgG2c), stimulacija diferencijacije CD4⁺ Th1 subpopulacije i inhibicija diferencijacije Th2 i Th17 ćelija (Abbas, 2012, Bao i sar., 2014). Vezivanjem za receptor, koji se sastoji iz dva strukturno homologa polipeptida IFN- γ R1 i IFN- γ R2, IFN- γ indukuje dimerizaciju dva receptorska lanca, što dovodi do aktivacije signalnog puta kinaza i provodnika signala i aktivatora transkripcije u ćelijama, JAK/STAT (*Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*), koji stimuliše transkripciju nekoliko gena. Prvi geni koji se aktiviraju usled stimulacije IFN- γ su zapravo transkripcioni faktori, poput IRF-1, koji reguliše transkripciju ostalih gena. Međugenima koji bivaju aktivirani sa IFN- γ , su geni za antigen-prezentujuću sposobnost, molekuli MHC I i II, geni povezani sa antiviralnim efektom IFN- γ , kao i imunomodulatornom funkcijom, poput iNOS, IL-12, ICAM-1 (Schroder i sar., 2004).

Faktor nekroze tumora (TNF)- α je medijator akutne inflamacije i deo je odgovora organizma na Gram negativne i Gram pozitivne bakterije i druge infektivne mikrobe, ali i liganda koji se oslobađaju iz bakterija, poput lipopolisaharida (LPS) i lipoteoične kiseline. Molekul TNF produkuju makrofagi, dendritične ćelije, T ćelije i neutrofili (Grivennikov i sar., 2005, Abbas, 2012). Molekul TNF se sintetise kao neglikozilovan membranski protein tip II, i eksprimira se kao homotrimer koji može da vezuje i do tri receptorska molekula. Postoje dva različita TNF receptora, nazvani su tip I (TNF-RI) i tip II (TNF-RII) i prisutni su uglavnom na svim tipovima ćelija. Vezivanje TNF za TNF receptore, kao što je TNF-RI, TNF-RII, dovodi do aktivacije faktora, koji su nazvani TRAF (*TNF receptor-associated factors*) koji su zapravo deo citoplazmatskog domena receptora. Aktivacija TRAF pokreće aktivaciju transkripcionih faktora, nuklearni faktor lakog κ lanca-stimulanta B ćelija (NF- κ B, *Nuclear Factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells*) i aktivatorski protein-1 (AP-1, *Activator Protein-1*). Kao posledica aktivacije NF- κ B stimuliše preživljavanje i sazrevanje ćelija, ali i s druge strane kaspaze

koje regulišu ćelijsku apoptozu odnosno nekrozu (*Dempsey i sar., 2003*), dok AP-1 reguliše ekspresiju citokina ćelija i predstavlja važan modulator inflamatornih oboljenja (*Zenz i sar., 2008*).

Stoga, za razumevanje imunoregulatornih svojstava MMC potrebno je imati u vidu da inflamatorna mikrosredina posredstvom citokina, kao i brojni faktori koje MMC ekspimiraju, oblikuju funkcije MMC koje one imaju u imunskom sistemu i popravci oštećenja tkiva.

Važan mehanizam imunomodulatorne uloge MMC u organizmu ostvaruje se preko sekrecija velikog broja biološki aktivnih molekula (**Slika 2.**). U dosadašnjim istraživanjima identifikovani su različiti molekuli koji učestvuju u imunomodulaciji posredovanoj MMC, i ukazano je da je krajnji ishod efekata MMC na imunski odgovor kumulativan i orkestriran delovanjem više solubilnih molekula produkovanih od strane MMC (*Ghannam i sar 2010, Bassi i sar., 2011, Habadad, 2011*).

Indoleamin 2,3-dioksigenaza-1 (IDO) je jedan od metaboličkih molekula produkovanih od strane MMC uključen u kontrolu imunskog odgovora posredovanog T ćelijama (*Ghannam i sar., 2010, Prasanna i sar., 2010, Li i sar., 2012*). Ovaj enzim metaboliše triptofan do kinurenina, što rezultira razgradnjom triptofana i akumulacijom toksičnih produkata kinurenina, koji dalje učestvuju u inhibiciji proliferacije T ćelija u lokalnoj mikrosredini (*Moffet i sar., 2003*). U mnogim eksperimentima, sve do 1998. godine, na mišjim modelima je dokazivano da je placentalni enzim IDO zadužen za sprečavanje odbacivanja fetusa tokom trudnoće. Zatim je pokazano da humani makrofagi (*Munn i sar., 1999*) i dendritične ćelije (*Terness i sar., 2002*) proizvode IDO koji suprimira proliferaciju T ćelija. Istraživanja u pravcu potvrđivanja hipoteze da bi IDO mogao da bude molekul koji je uključen u inhibiciju imunskog odgovora, potekla su od nalaza da IFN- γ i drugi proinflamatorni citokini indukuju produkciju IDO od strane antigen-prezentujućih ćelija, što zatim uzrokuje inhibiciju T-ćelijskog odgovora na autoantigene (*Meisel i sar., 2004*). Na osnovu ovih istraživanja, proistekle su zapažanja da je IDO jedan od metaboličkih molekula produkovanih od strane MMC uključen u kontrolu imunskog odgovora posredovanog T ćelijama (*Ghannam i sar., 2010, Prasanna i sar., 2010, Li i sar., 2012*), koja su bila povezana sa nalazom da se ovaj enzim, sekretuje nakon stimulacije MMC sa IFN- γ (*Ryan i sar., 2007*). Pored toga, pokazano je i da MMC ostvaruju imunosupresivnu ulogu posredstvom molekula IDO

kada se nalaze u direktnim ćelijskim kontaktima sa imunskim ćelijama (*Wang i sar., 2014*).

Azot-monoksid (NO - *Nitric Oxide*) je takođe jedan od molekula uključenih u imunomodulatorno delovanje MMC. Kao produkt NO-sintaze (NOS), nastaje delovanjem jednog od tri tipa ovog enzima: inducibilna (iNOS), endotelna NOS (eNOS) i neuralna NOS (nNOS). Pokazano je da NO ima višestruku imunoregulatornu ulogu, koja se ispoljava u svim fazama inflamacije, inhibicijom funkcija i proliferacije T ćelija (*Coleman, 2001, Guzik i sar., 2003*). Smatra se da je NO glavni medijator imunomodulturne uloge MMC miševa, dok kod humanih MMC ova uloga NO nije izražena (*Ren i sar., 2009*).

Prostaglandin E₂ (PGE₂) je produkt metabolizma arahidonske kiseline koji snažno suprimira imunski odgovor, inhibirajući mitogenezu T ćelija i produkciju IL-2, a sa druge strane je kofaktor indukcije aktivnosti Th2 ćelija. Molekul PGE₂ se sintetiše od strane makrofaga, folikularnih dendritičnih ćelija i fibroblasta, te indukuje apoptozu CD4⁺CD8⁺ timocita *in vitro* i *in vivo* u zavisnosti od stepena sazrevanja i aktiviranosti, dok sa druge strane modulacijom ekspresije Fas liganda na površini T ćelija, štiti T ćelije od TCR-aktivacije povezanom sa ćelijskom smrću (*Phipps i sar., 1991*). Prostaglandin E₂ je finalni produkt enzima ciklooksigenaze (COX, *cyclooxygenase*), signalnog puta u inflamaciji, koji doprinosi lokalnom porastu protoka krvi, formiranju edema i senzitivizaciji na bol, i pokazano je da enzimi COX1 i COX2 učestvuju u produkciji PGE₂ (*Chen i sar., 2000*). Po mnogim autorima, PGE₂ je ključan molekul imunosupresorskih aktivnosti MMC (*Hoogdujin i sar., 2010, Duffy i sar., 2011*), s obzirom da je pokazano je da MMC konstitutivno ekspimiraju COX1 i COX2, a da produkcija PGE₂ raste kada se MMC ko-kultiviraju sa T ćelijama, pri čemu dolazi do stimulacije Th2 odgovora i lučenja IL-4, IL-5 i IL-10 (*Aggarawal i sar., 2005*). Takođe je pokazano da IFN- γ i TNF- α stimulišu produkciju PGE₂ od strane MMC, kao i da inhibitor PGE₂ obnavlja diferencijaciju dendritičnih ćelija i ostalih funkcija imunskih ćelija koje su bile inhibirane od strane MMC (*Spaggiari i sar., 2009*).

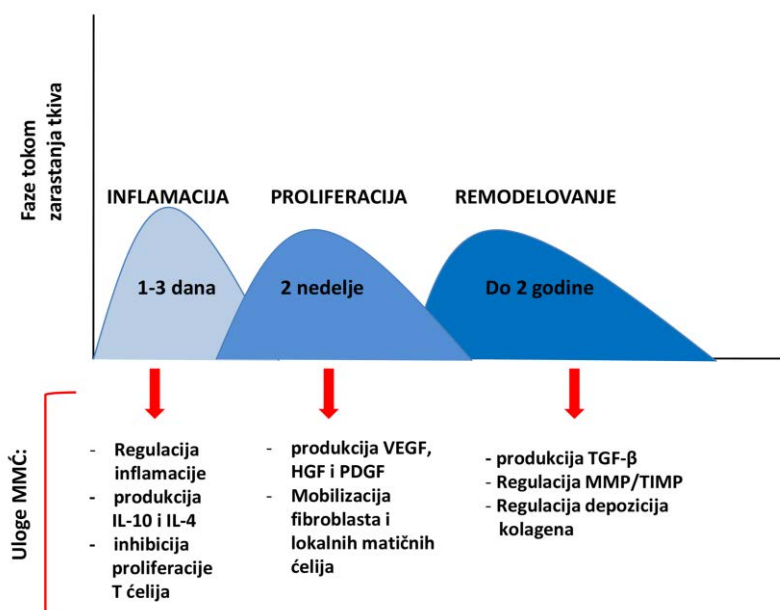
Interleukin (IL)-6 je citokin koji ima važnu ulogu u imunomodulaciji, angiogenezi, obnavljanju oštećenog tkiva i rezistenciji tumorskih tkiva na lekove. Kontrolom procesa angažovanja leukocita, te njihove aktivacije i apoptoze, IL-6 predstavlja jedan od glavnih molekula koji regulišu preusmeravanje urođenog na

adaptivni imunski odgovor (Jones, 2005). Kao sekretorni produkt MMC, IL-6 je uključen u inhibiciju diferencijacije monocita u dendritične ćelije, smanjujući njihovu sposobnost stimulacije T ćelija. Osim što se sekrecija IL-6 od strane MMC povećava u prisustvu IFN- γ , TNF- α i IL-2, produkcija IL-6 je povezana sa imunosupresorskim dejstvom PGE₂ i polarizacijom imunskog odgovora ka Th2 profilu od strane MMC (Bouffi i sar., 2010). Molekul IL-6 koji proizvode MMC reguliše funkciju COX-2 kod ovih ćelija, ali utiče i na formiranje i sazrevanje dendritičnih ćelija (Melief i sar., 2013), a može da bude uključen i u stvaranje Treg (Bouffi i sar., 2010). Pored regulacije COX-2, IL-6 modulira stvaranje iNOS kod MMC, jer u odsustvu IL-6, produkcija NO, kao i PGE₂ opada. Ekspresija i produkcija IL-6 od strane MMC je takođe uslovljena prisustvom proinflamatornih faktora (IFN- γ , IL-2 i TNF- α) (Djouad i sar., 2007, Bouffi i sar., 2010). Pokazano je da je ekspresija PGE₂ i IL-6 kod MMC stimulirana pri kokultivaciji MMC sa T limfocitima, ali je njihova uloga u inhibiciji proliferacije T limfocita nezavisna, iako je *in vivo* pokazano da IL-6 stimuliše produkciju PGE₂ (Wang i sar., 2012).

U regulaciji imunskog odgovora učestvuju i četiri forme nekласičanih HLA I molekula, niskog polimorfizma, vezanih za membranu (HLA-G1, G2, G3, G4) i tri solubilne forme (HLA-G5, G6, G7). Postoje dva načina na koja HLA-G molekuli utiče na imunski sistem: inhibicijom progresije ćelijskog ciklusa alogernih T ćelija, i indukcijom apoptoze T ćelija preko Fas signalnog puta. Imunomodulatorne sposobnosti ovih molekula su uglavnom vezane za solubilnu izoformu HLA-G5 (Selmani i sar., 2008, Giuliani i sar., 2011). Solubilna forma HLA-G5 proizvodjena od strane MMC suprimira proliferaciju T ćelija, kao i citotoksičnost NK i T ćelija, a sa druge strane stimuliše stvaranje Treg ćelija. Sam ćelijski kontakt MMC i aktiviranih T ćelija indukuje produkciju IL-10, koji je ključan za oslobađanje solubilnog HLA-G5. Uključenost HLA-G5 u inhibiciju proliferacije alogeno stimuliranih T limfocita od strane MMC, potvrđena je u reakciji mešanih limfocita (MLR, *Mixed Lymphocyte Reaction*), a maksimum produkcije HLA-G5 pokazan je u direktnim ćelijskim kontaktima MMC i T limfocita (Ghannam i sar., 2010, Bassi i sar., 2011).

1.4. Uloga mezenhimskih matičnih ćelija u homeostazi i reparaciji oštećenog tkiva

Široka distribucija, multipotentni potencijal diferencijacije i dobro okarakterisane osobine u mnogobrojnim studijama, opravdano su dale MMC ključnu ulogu i u reparaciji oštećenog tkiva (**Slika 5.**). Obnavljanje oštećenog tkiva je dinamičan i kompleksan proces, koji uključuje više koordinisanih događaja, uključujući krvarenje i koagulaciju uz aktivaciju trombocita, akutnu inflamaciju, migraciju imunskih i matičnih ćelija, proliferaciju i diferencijaciju matičnih ćelija specifičnog tkiva, angiogenezu, obnavljanje epitela, i sintezu i remodelovanje ekstracelularnog matriksa (*Maxon i sar., 2012, DiMarino i sar., 2013*).



Slika 5. Uloge MMC u svim fazama tokom zarastanja oštećenog tkiva. Matriks-metaloproteinaze (MMP), tkivni inhibitori matriks-metaloproteinaza (TIMP). *Preuzeto i izmenjeno prema Maxon i sar., 2012.*

Povreda tkiva je uvek povezana sa aktivacijom imunskih/inflamatornih ćelija, ne samo makrofaga i neutrofila, već i ćelija adaptivne imunosti, uključujući CD4⁺ T ćelije, CD8⁺ T ćelije i B ćelije, koje su mobilisane i privučene faktorima produkovanim i/ili oslobođenim iz apoptotskih i nekrotičnih ćelija oštećene mikrovaskulature i strome.

Inflamatorni medijatori, kao što su $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, slobodni radikali, hemokini i leukotrieni, često su produkovani od strane fagocita u odgovoru na oštećena tkiva i ćelijski sadržaj. Inflamatorni molekuli zajedno sa imunskim ćelijama, endotelskim ćelijama i fibroblastima uzrokuju promene u mikrosredini, koje dovode do mobilizacije i usmeravanja diferencijacije MMĆ u pravcu stromalnih ćelija ili specifičnih ćelija oštećenog tkiva. U ovom procesu mogu biti uključene kako rezidentne MMĆ prisutne u oštećenom tkivu, tako i ćelije mobilisane iz kostne srži, a precizni mehanizmi koji se nalaze u osnovi ovih procesa su još uvek nedovoljno ispitani (*Shi i sar., 2010*).

Kada MMĆ jednom dođu u mikrosredinu oštećenog tkiva, mnogi faktori, uključujući citokine kao što su $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 , toksini, infektivni agensi i hipoksija, stimulišu oslobađanje i brojnih faktora rasta od strane samih MMĆ, uključujući epidermalni faktor rasta (EGF, *epidermal growth factor*), faktor rasta fibroblasta (FGF, *fibroblast growth factor*), trombocitni faktor rasta (PDGF, *platelet-derived growth factor*), transformišući faktor rasta- β ($\text{TGF-}\beta$, *transforming growth factor*), vaskularno endotelski faktor rasta (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), faktor rasta hepatocita (HGF, *hepatocyte growth factor*), insulinski faktor rasta-1 (IGF-1, *insulin growth factor-1*), angiopoetin-1 (Ang-1), faktor rasta keratinocita (KGF, *keratinocyte growth factor*) i faktor stromalnih ćelija-1 (SDF-1, *stromal-cell derived factor-1*). Zauzvrat, ovi faktori rasta promovišu razvoj fibroblasta, endotelskih i progenitorskih ćelija u tkivu, što omogućava regeneraciju i popravku tkiva (*Kalinina i sar., 2011, Maxon i sar., 2012, DiMarino i sar., 2013*). Dugotrajni oporavak oštećenog tkiva zavisi od diferencijacije progenitorskih i matičnih ćelija tkiva. Pokazano je da presađene matične ćelije diferenciraju u određene tkivne ćelije, ali i produkuju faktore rasta uključujući faktor matičnih ćelija (SCF, *stem cell factor*), faktor stimulacije stvaranja kolonija makrofaga (M-CSF, *macrophage colony-stimulating factor*), SDF-1, leukemija inhibirajući faktor (LIF, *leukemia inhibitory factor*), angiopoetin-1 i druge hemokine, koji svi zajedno otpočinju popravku tkiva (*Ma i sar., 2014*).

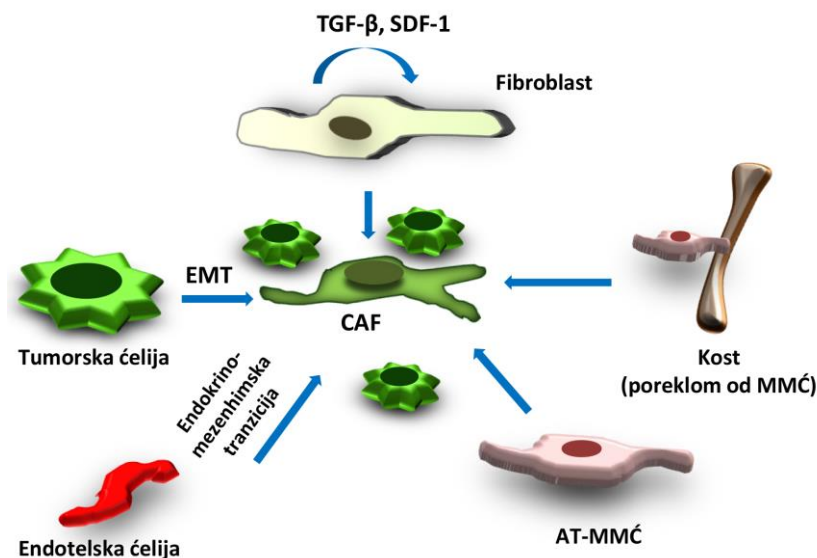
1.5. Mezenhimske matične ćelije i tumori

Pored aktivne uloge u procesima reparacije i regeneracije tkiva, gde učestvuju i kao modulatori imunskog odgovora, MMC imaju uticaj i na razvoj tumorskog tkiva. Tokom obnavljanja oštećenih tkiva, MMC učestvuju u aktivaciji angiogeneze, koja može da dovede i do progresije tumorskog tkiva (*Dittmer i Leyh, 2014*). Tumori su poznati kao tkiva u kojima inflamacija uspostavlja specifičnu tumorsku mikrosredinu, u koju MMC mogu da budu privučene. Kada se nađu u inflamatornoj tumorskoj mikrosredini, MMC ispoljavaju slične faktore rasta i hemokine kao i u slučaju popravke oštećenog normalnog tkiva, ali u ovom slučaju, parakrini faktori MMC, ali i ćelijski kontakti sa tumorskim ćelijama mogu da podržavaju razvoj tumora. Naime, MMC mogu da omoguće proliferaciju tumorskih ćelija i inhibiciju njihove apoptoze, supresiju imunskog odgovora organizma na nastalo tumorsko tkivo, angiogenezu i progresiju tumora, i konačno metastazu (*Hass i Otte, 2012, Yang i sar., 2013*).

Povezanost pojave tumora i procesa inflamacije, prvi je uočio Rudolf Virchow još 1863.godine, a na osnovu prisustva leukocita u tumorskom tkivu. Međutim, tek u poslednjoj deceniji dvadesetog veka pruženi su jasni dokazi o kritičnoj ulozi inflamacije u tumorogenezi, a razjašnjeni su i neki molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi ovih procesa. Najvećim delom, gotovo 90%, tumori su povezani sa somatskim mutacijama i faktorima spoljašne sredine, a mnogi od spoljašnjih uzroka i rizičnih faktora su povezani sa nekim oblikom hronične inflamacije. Smatra se da više od 20% tumora je povezano sa hroničnim infekcijama (*Aggarawal i Gehlot, 2009, Grivennikov i sar., 2010, Quail i Joyce, 2013*), koje mogu biti izazvane spoljašnjim faktorima, ishranom, infekcijama, autoimunskim bolestima. Uzrokujući mutacije i genetičke nestabilnosti, imunosupresiju i angiogenezu, inflamacija ima važnu ulogu u svim stadijumima tumorskog razvoja, uključujući inicijaciju, promociju, povećanje malignosti, invaziju i metastazu (*Grivennikov i sar., 2010*). Posebno kompleksnu aktivnost ima inflamacija koja nastaje u samom tumorskom tkivu i inflamacija indukovana terapijom, koja može uzrokovati kako antitumorske, tako i protumorske efekte. Naime, u tumorskom tkivu detektovane su gotovo sve imunske ćelije koje mogu imati i stimulišuće i inhibirajuće efekte na razvoj tumora (*Grivennikov i sar., 2010, Quail i Joyce, 2013*). Najučestalije imunske ćelije unutar tumora su makrofagi

pridruženi tumorima koji stimulišu rast tumora i imaju vrlo aktivnu ulogu u angiogenezi, invaziji i metastazi, kao i T ćelije koje obuhvataju različite subpopulacije ($CD8^+$ citotoksične T ćelije, $CD4^+$ pomoćničke Th1 i Th2 ćelije, Th17 i Treg ćelije) i koje mogu i inhibirati i stimulisati razvoj tumora (*Grivennikov i sar., 2010, Allavena i sar., 2008, Baeyart i sar., 2013*). U zavisnosti od imunskih ćelija, u tumorskoj mikrosredini prisutni su i različiti citokini i hemokini, koji takođe na različite načine mogu da promovišu ili inhibiraju rast i razvoj tumora. Citokini moduliraju efekat imunskog i inflamatornog miljea tumorske mikrosredine na razvoj tumora preko aktivacije različitih transkripcionih faktora (NF- κ B, AP-1, STAT i SMAD), kao i kaspaza. Posledice toga mogu biti antitumorska imunost koja se ogleda u aktivnosti IL-12, TRAIL i IFN- γ , podrška rasta tumora (IL-6, IL-17, IL-23) ili produkcija molekula koji imaju direktan efekat na rast i preživljavanje tumorskih ćelija (TRAIL, FasL, TNF- α , EGFR ligandi, TGF- β , IL-6) (*Grivennikov i sar., 2010*).

Pored imunskih ćelija, u tumorskoj mikrosredini veoma važnu ulogu imaju i fibroblasti pridruženi tumoru (CAF, *cancer associated fibroblasts*) koji predstavljaju i najbrojnije ćelije mikrosredine tumora dojke i prostate (*Korkaya i sar., 2011, D'Anselmi i sar., 2013, Mao i sar., 2013*). Postoje različite hipoteze o poreklu CAF u kojima se kao potencijalne ćelije od kojih nastaju CAF pominju aktivirani rezidentni fibroblasti, MMĆ i tumorske ćelije. Kao dokaz o mezenhimskom poreklu CAF, lokalizovane su MMĆ u tumorskoj masi, sa visokom ekspresijom aktina glatkih mišića (α -SMA, α - *Smooth Muscle Actin*), proteina aktiviranih fibroblasta (FAP, *Fibroblast Activated Protein*) i tenascina-C. Pored toga pokazano je i da solubilni faktori tumorskih ćelijskih linija stimulišu diferenciranje MMĆ u CAF (*Barcellos-de-Souza i sar., 2013, Mao i sar., 2013*) (**Slika 6.**).



Slika 6. Poreklo fibroblasta pridruženih tumorskom tkivu. Šematski prikaz ćelija koje mogu da se transformišu u CAF. EMT-epitelo-mezenhimska tranzicija; AT-MMĆ-mezenhimske matične ćelije masnog tkiva. *Preuzeto i izmenjeno prema Mao i sar., 2013.*

Mezenhimske matične ćelije utiču na brojne funkcije tumorskih ćelija uključujući proliferaciju, pokretljivost, mogućnost transdiferencijacije u CAF, invazivnost, angiogenezu i proces epitelo-mezenhimske tranzicije, koja je važan preduslov za metastazu tumorskih ćelija. Ove uloge MMĆ ostvaruju se posredstvom nekoliko produkovanih faktora među kojima su: TGF- β , IL-6, IL-10, VEGF i matriksne metaloproteinaze (MMP) (*Barcellos-de-Souza i sar., 2013*).

Superfamilija TGF- β je najveća familija sekretovanih proteina (liganda) kod sisara i čine je preko trideset strukturno povezanih polipeptida u koje spadaju: faktori rasta, molekuli iz familije morfogenetskih proteina kosti (BMP, *Bone Morphogenic Protein*), kao i faktori diferencijacije poput miostatina (*Gordon i Blobe, 2008*). Ovi ligandi se vezuju za transmembranski receptor koji se sastoji od dve subjedinice, TGF- β R I i TGF- β R II, pri čemu inicijalna interakcija liganda indukuje dimerizaciju subjedinica i sledstvenu aktivaciju TGF- β R I receptorske subjedinice, često označene i kao kinaza slična aktivinskom receptoru (ALK, *activine receptor-like kinase*), koja aktivira dalje nishodne signalne puteve, od kojih su najznačajniji molekuli SMAD familije transkripcionih faktora (*Byfield i sar., 2003, Peng i sar., 2013*). Molekul TGF- β je produkovan od strane ćelija limfoidne loze, kao i makrofaga i dendritičnih ćelija i ima ulogu u regulaciji proliferacije, adhezije, migracije i diferencijacije kako imunskih

ćelija, tako i stromalnih i tumorskih ćelija (Taylor, 2009). Ovaj faktor rasta može da se zadrži u ekstracelularnom matriksu u obliku latentne forme, ali se u odgovoru na promene u ekstracelularnom matriksu, poput mehaničkog stresa, oštećenja tkiva i inflamacije, prevodi u aktivnu formu citokina TGF- β . Aktivna forma ovog molekula učestvuje u svim fazama reparacije i remodelovanja tkiva, a pokazano je i da ovaj citokin ima aktivnu ulogu u mobilizaciji MMC koje učestvuju u ovim procesima (Maxon i sar., 2012, Wan i sar., 2012).

Pored učesća TGF- β u reparaciji tkiva, dokumentovana je i uloga TGF- β u inicijaciji, progresiji i metastazama tumora (Massague, 2000). Prvobitno pokazana uloga TGF- β bila je povezana sa efektima na tumorske ćelije, ali danas je poznato da ovaj molekul reguliše funkcije kako tumorskih ćelija, tako i imunskih ćelija, kao i njihove interakcije sa ostalim ćelijama u mikrosredini. Pokazano je i da TGF- β reguliše anti-tumorsko delovanje imunskih ćelija, koje u zavisnosti od konteksta mikrosredine mogu dovesti do supresije ili stimulacije tumora (Bierie i sar., 2010). Stoga, uloga TGF- β u razvoju tumora može da bude dvojake prirode. Naime, TGF- β može da inhibira progresiju ćelijskog ciklusa epitelnih ćelija i stimuliše njihovu apoptozu, što doprinosi njegovoj supresivnoj ulozi u prvim fazama razvoja tumora, odnosno inicijaciji i progresiji. Međutim, pokazano je da TGF- β može da stimuliše proces epitelo-mezenhimske tranzicije koja je povezana sa pokretljivošću ćelija, invazijom i metastazom, procesima kasnije faze tumorskog razvoja (Bierie i sar., 2010, Lebrun, 2012). S obzirom da je TGF- β uključen u brojne ćelijske procese, u cilju inhibicije njegovog dejstva kao potencijalni lek sintetisan je farmakološki inhibitor SB505124, koji inhibira TGF- β R I (ALK, *Activin Receptor-like Kinase*) receptorsku subjedinicu, koji je danas i pogodno sredstvo za ispitivanje signalnih puteva aktiviranih TGF- β . Ovo selektivno jedinjenje na dozna zavisna način može da inhibira ALK- 4, -5 i -7, zbog čega se koristi u ispitivanjima aktivacije provodnika signala SMAD transkripcionih faktora, kao i proteinskih kinaza aktiviranih mitogenom (MAPK, *Mitogen Activated Protein Kinases*) koji kontrolišu ekspresiju drugih molekula uključenih u regulaciju procesa epitelo-mezenhimske tranzicije (Byfield i sar., 2003, Yang i Weinberg, 2008).

Epitelo-mezenhimska tranzicija je biološki proces tokom kojeg polarizovane epitelne ćelije postepeno gube kontakt sa bazalnom membranom i okolnim ćelijama, a zadobijaju svojstva mezenhimskih ćelija, kao što su kapacitet migracije i produkcija

komponentata ekstracelularnog matriksa. Proces epitelo-mezenhimske tranzicije se tokom ontogeneze javlja u različitim fazama: embrionalna epitelo-mezenhimska tranzicija, tokom koje nastaju različiti tipovi ćelija; epitelo-mezenhimska tranzicija koja se javlja pri obnavljanju oštećenih tkiva (fibroza tkiva) i onkogeni tip epitelo-mezenhimske tranzicije koja nastaje u ćelijama neoplazija (*Kalluri i Weinberg, 2009, Samatov i sar., 2013*). Inflamatorni citokini produkovani od strane okolnih imunskih i tumorskih ćelija, hipoksija i povećana koncentracija TGF- β , aktivacijom transkripcionih faktora ZEB (*Zinc finger E-box-binding homebox*), snail, slug i twist, mogu indukovati epitelo-mezenhimsku tranziciju. Navedeni transkripcioni faktori utiču na smanjenje ekspresije molekula koji regulišu meĈućelijske adhezivne veze, E-kadherina, ali i dezmozoplakina i kladina (*Samatov i sar., 2013*). Ekstracelularni domen molekula E-kadherina ostvaruje veze izmeĈu ćelija, dok se njegov intracelularni domen vezuje za molekul β -katenina, koji se nalazi sa unutrašnje strane membrane. U prisustvu TGF- β , koji je poznat inicijator epitelo-mezenhimske tranzicije, dolazi do razgradnje kompleksa E-kadherin/ β -katenin, pri Ĉemu se β -katenin nalazi slobodan u citoplazmi i moĈe se translocirati u nukleus, gde utiĈe na Wnt signalizaciju i indukciju ekspresije onkogeno *c-myc* i *cyclin D1* (*Tien i sar., 2011*). S druge strane, prilikom epitelo-mezenhimske tranzicije, dolazi i do povećanja ekspresije molekula karakteristiĈnih za mezenhimski fenotip: Vimentin, N-kadherin, fibronektin, MMP, α -SMA, Ĉime ćelije stiĈu invazivnost i metastatski potencijal, migrirajuĈi na udaljena mesta u organizmu (*Foroni i sar., 2011, KovaĈić i sar., 2012*).

U procesima degradacije ekstracelularnog matriksa i postepene invazije tumorskih ćelija u okolna tkiva ukljuĈeno je i nekoliko enzimskih sistema poput sistema aktivator plazminogena urokinaznog tipa (uPA) i matriksne metaloproteinaze (MMP). Sistem uPA se sastoji iz serinske proteaze uPA, receptora (uPAR), kao i dva serinska inhibitora aktivatora plazminogena, PAI1 i PAI2. Efekat ovog sistema se ogleda u aktivnosti uPA da konvertuje plazminogen u plazmin, koji narušava komponente matriksa i aktivira latentne metaloproteinaze i faktore rasta, dok inhibitor proteaza PAI1 povećava migraciju tumorskih ćelija i stimuliše angiogenezu (*Duffy, 2002*). ProteolitiĈka aktivnost uPA sistema moĈe da aktivira i latentnu formu TGF- β , koji zauzvrat kod tumorskih ćelija stimuliše aktivnost uPA, formirajuĈi tako povratnu petlju. Sistem TGF- β -uPA je

uključen u mnoge patološke procese koji su povezani i sa oštećenjem zdravog tkiva (*Tanaka i sar., 2004, Philippou i sar., 2008*).

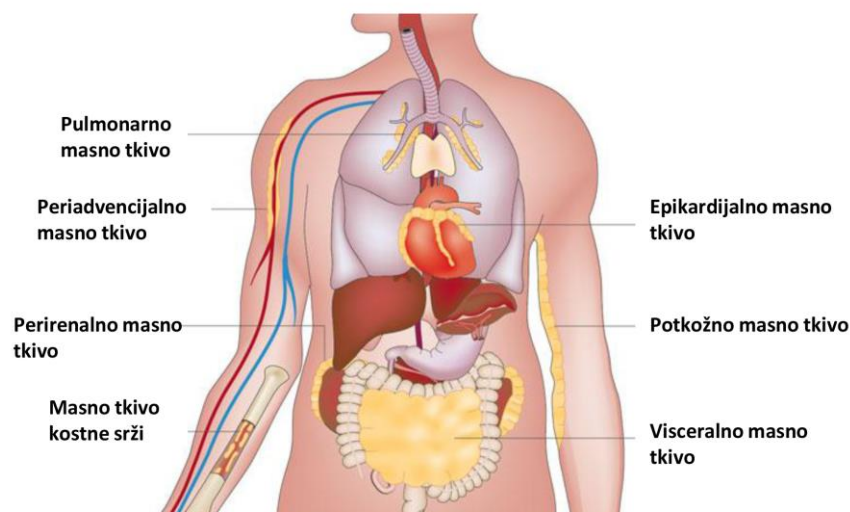
Matriksne metaloproteinaze (MMP) su enzimi uključeni u procese tkivnog remodelovanja, angiogeneze, ovulacije i obnavljanja oštećenog tkiva. Ovo je familija strukturno i funkcionalno povezanih endopeptidaza (kod ljudi je poznato 23 člana), koje su na osnovu svojih specifičnosti za substrate podeljene u 6 potklasa: kolagenaze, želatinaze, stromelizini, matrilizini, membranski-tip MMP i elastaze makrofaga. U tumorskim tkivima je narušena ravnoteža između proteolitičke degradacije tkiva i inhibicije ovog procesa, te je naglašena uloga MMP u degradaciji ekstracelularnog matriksa, zahvaljujući čemu tumorske ćelije migriraju u okolna tkiva (*Weigelt i sar., 2005, Köhrmann i sar., 2009*). Na osnovu prethodnih saznanja učešću MMP u patološkim stanjima, poput tumora, pretpostavlja se da bi aktivnost MMP mogla da bude regulisana sa TGF- β (*Hsieh i sar., 2010, Gomes i sar., 2012*).

1.6. Mastične ćelije masnog tkiva

Masno tkivo je najrasprostranjenije tkivo kod ljudi i predstavlja 10-29% težine tela kod odraslih ljudi sa normalnom telesnom težinom. To je visoko specijalizovano vezivno tkivo, a kod ljudi i ostalih sisara postoji u formi: belog masnog tkiva, koje može da bude visceralno i potkožno, i braon masnog tkiva, a svako od njih ima svoju specifičnu ćelijsku organizaciju. Za razliku od visceralnog masnog tkiva koje može indukovati štetne metaboličke efekte, potkožno belo i braon masno tkivo mogu pozitivno uticati na metabolizam omogućavajući homeostazu glukoze i povećanje iskorišćavanja energije (*Thien i Kahn, 2010*).

Belo masno tkivo je rasprostranjeno u celom telu, a najveći intraabdominalni depoi se nalaze oko omentuma (sloj peritoneuma), intestinuma i perirealnog prostora, kao i u potkožnim depovima ekstremiteta i abdomena (**Slika 7.**). Belo masno tkivo reguliše čuvanje i oslobađanje energije organizma. Zbog toga, ovo masno tkivo poseduje visoku plastičnost koja se ogleda u hipertrofičnoj ekspanziji i zrelih adipocita, kao i diferencijaciji prekursorskih ćelija prisutnih u stromi. Na osnovu strukturnih i ultrastrukturnih osobina belo masno tkivo se deli na depozitno, strukturno i fibrozno. Depozitno belo masno tkivo se uglavnom nalazi u abdominalnom regionu

(periumbilikalno), a ćelije unutar ovog tkiva su krupne, gusto pakovane i povezane tankim nitima kolagenih vlakana, a mikrocirkulaciju čine tankozidni kapilari. Strukturno belo masno tkivo se nalazi u stromalnom delu ekstremiteta i kukova. Ovo tkivo ima dobru vaskularizaciju, a ćelije su obmotane kolagenim vlaknima, što čini ovo masno tkivo posebno dobrim izvorom za regenerativne procedure zasnovane na autologom tkivu. Fibrozno masno tkivo ima upadljivu fibroznu komponentu i obično se nalazi u delovima tela koji su izloženi nekom mehaničkom stresu, dok su adipociti ovog tkiva pojedinačno uvijeni u fibrozni omotač (*Sbarbati i sar., 2010*).

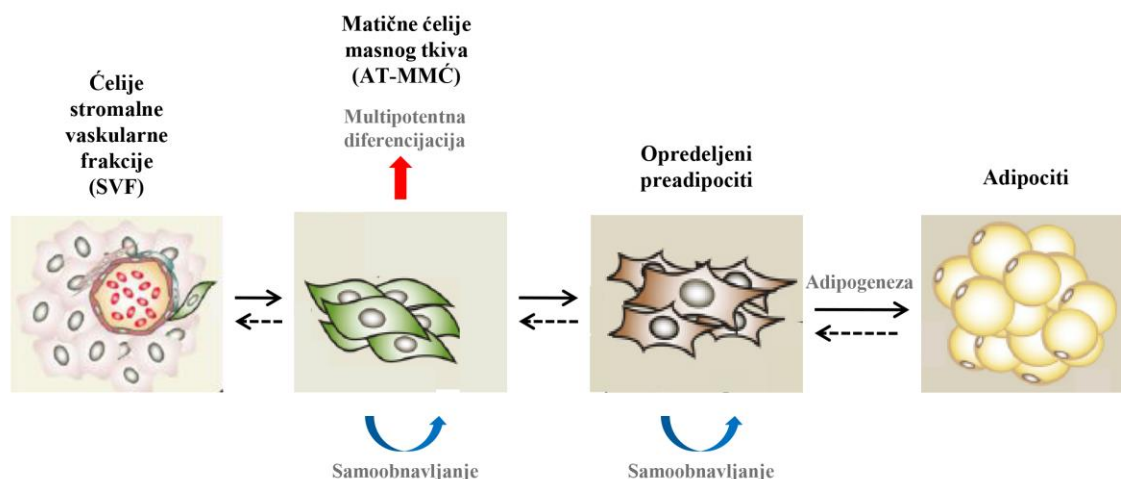


Slika 7. Raspored masnog tkiva u organizmu. Masno tkivo se uglavnom nalazi potkožno ili u visceralnim odeljcima tela. Ukoliko se radi o gojaznosti, masno tkivo se proširuje i na druge delove tela. Najčešće se masno tkivo akumulira u okolini srca, bubrega i krvnih sudova. Adipokini koji se proizvode od strane masnog tkiva mogu uticati na funkciju nekog organa ili sistemskog metabolizma. *Preuzeto i izmenjeno prema Ouchi i sar., 2011.*

Na ćelijskom nivou, najveći deo zapremine belog masnog tkiva čine zreli adipociti koji sadrže velike masne kapljice (čak do 90% od ukupne citoplazme), dok ostatak čini stromalna vaskularna frakcija (SVF) u kojoj se nalaze: mezenhimske matične ćelije (MMC), opredeljeni progenitori masnog tkiva, fibroblasti, mišićne ćelije krvnih sudova, endotelne ćelije, rezidentni monociti/makrofagi i limfociti i zajedno sa

matriksom vezivnog tkiva čine integrisanu celinu (Zuk i sar., 2001, Mizuno i sar., 2012, Zuk, 2013). Pored uloge u energetskej regulaciji, masno tkivo održava telesne konture omogućavajući mehaničku zaštitu, ali i predstavlja izvor više autokrinih, parakrinih i endokrinih faktora, kao što su proteini (adipokini), masne kiseline, steroidni hormoni i prostaglandini (Bauer-Kreisel i sar., 2010, Sun i sar., 2011). Meću endokrinim faktorima koje proizvodi masno tkivo u odgovoru na aferentne signale hormonskog i centralnog nervnog sistema su i: leptin, IL-6, TNF- α , adiponektin, komponente komplementa, inhibitor-1 aktivatora plazminogena (PAI-1), proteine sistema renin-angiotenzin i rezistin (Kershaw i Flier, 2004).

Karakterisanje gojaznosti kao jedne vrste oboljenja javilo se još u vreme Hipokrata, ali su se istraživanja o poreklu adipocita kao i pojavi hipetrofije i hiperplazije masnog tkiva započela tek sa pojavom koncepta matične ćelije, odnosno početkom 20. veka (Cawthorn i sar., 2012a). Da se u masnom tkivu nalaze matične ćelije pretpostavilo se nakon ranih četrdesetih godina dvadesetog veka, kada su histološka ispitivanja ukazala na pojavu adipocita u presaćenim ušima živih zečeva (Clark i Clark, 1940), kao i na osnovu nekih patoloških stanja, na primer bolesti progresivne koštane heteroplazije, kada dolazi do stvaranja ektopične kosti unutar sloja potkožnog masnog tkiva (Kaplan i sar., 1994). Naime, histološke analize pokazale su prisustvo osteoblasta i hondrocita pored adipocita u ovim lezijama (Yeh i sar., 2000, Shore i sar., 2002). Takođe, istraživanja su ukazala i da su tumori mekog tkiva (lipomi i liposarkomi) upravo poreklom od matičnih ćelija prisutnih u masnom tkivu (Gimble i sar., 2007, Sun i sar., 2011). Pored toga, problem prekomerne težine ili gojaznost takođe govori o prisustvu matičnih ćelija u masnom tkivu. Obnavljanje masnog tkiva, čija primarna i pozitivna funkcija jeste u održavanju energetskog statusa, počiva na zameni terminalno diferenciranih adipocita „novim“ ćelijama. Neki naučnici ovaj homeostatski mehanizam nazivaju „adipostat“ podrazumevajući održavanje zapremine masnog tkiva na konstantnom nivou (Gimble i sar., 2007).



Slika 8. Veza ćelija stromalne vaskularne frakcije (SVF), matičnih ćelija masnog tkiva (AT-MMĆ) i opređenih preadipocita i zrelih diferenciranih adipocita u obnavljanju masnog tkiva. Preuzeto i izmenjeno prema Cawthorn^a 2012.

Zuk i saradnici su 2001. godine identifikovali i opisali multipotentne matične ćelije izolovane iz lipoaspirata, a ujedno su i pokazali da se u okviru izolovane stromalne vaskularne frakcije (SVF) nalazi veliki broj matičnih ćelija (Zuk i sar., 2001) (Slika 8.). Matične ćelije izolovane iz masnog tkiva u literaturi imaju nekoliko naziva: ASCs (*adipose-derived stem/stromal cells*), ADAS (*adipose-derived adult stem cells*), AdMSCs (*adipose mesenchymal stem cells*), kao i lipoblasti, periciti i ćelije lipoaspirata (PLA, *processed lipoaspirate cells*). Ova imena dovode do zabune u literaturi. Zbog toga je Međunarodna federacija za nauku o terapeutima masnog tkiva (IFATS, *International Federation for Adipose Therapeutics Science*) donela konsenzus da se usvoji termin ASCs (*adipose-derived stem cells*) koji podrazumeva izolovane, adherentne i multipotentne ćelijske populacije (Gimble i sar., 2007, Kreisel i sar., 2010, Zuk, 2013). Zahvaljujući dostupnosti masnog tkiva, AT-MMĆ predstavljaju dobre kandidate za ćelijsku terapiju. Iako se uglavnom govori o multipotentnoj prirodi ovih ćelija, pokazano je da se one mogu diferencirati i u tkiva ektodermalnog (neuroni, retina) i endodermalnog porekla (β -ćelije pankreasa, hepatociti) (Zuk i sar., 2002, Li i sar., 2012, Banas i sar., 2008, Lee i sar., 2008, Chandra i sar., 2009, Cawthorn i sar., 2012b, Lee i sar., 2012, Tomita i sar., 2012). Takođe je pokazano da se indukovane pluripotentne ćelije (iPĆ) mogu dobiti transgenom manipulacijom, reprogramiranjem i ektopičnom ekspresijom transkripcionih faktora Oct-4, Sox2, Klf4 i c-MYC kako

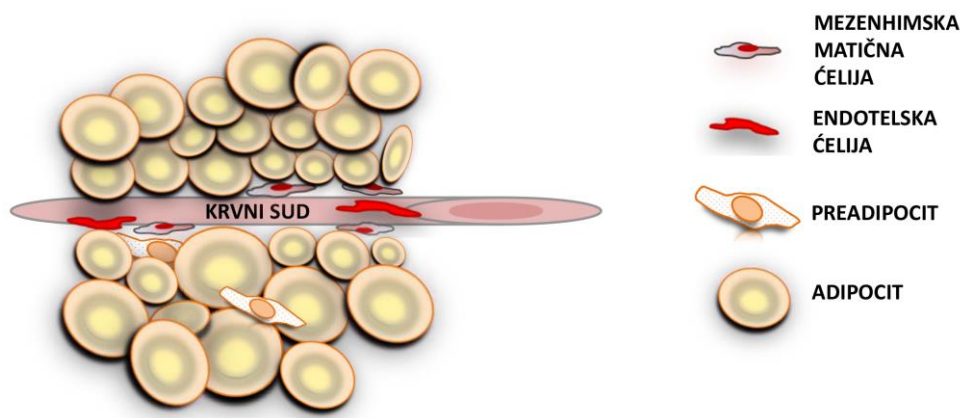
mišjih, tako i humanih AT-MMĆ i da ove ćelije imaju sve karakteristike embrionalnih matičnih ćelija koje pokazuju pluripotentni potencijal diferencijacije (*Qu i sar., 2012, Sun i sar., 2009, Yamanaka, 2006*).

Iako najnovija saznanja o AT-MMĆ otvaraju nove poglede na ćelijsku terapiju, potencijalna klinička primena AT-MMĆ mora da uzme u obzir sve pozitivne i negativne osobine AT-MMĆ. Naime, iako imaju “širok” kapacitet diferencijacije, multipotentnost AT-MMĆ nosi sa sobom rizik od nepravilne diferencijacije, koja može da rezultuje kalcifikacijom mekog tkiva ili može da dođe do formiranja abnormalnog tkiva (*Cawthorn i sar., 2012b*). Iz tih razloga, u okviru potencijalne primene AT-MMĆ sve više istraživanja je usmereno ka ispitivanju njihove sposobnosti modulacije biologije tkiva primaoca, nego njihovog potencijala diferencijacije.

Pored toga, AT-MMĆ proizvode i brojne solubilne faktore koji mogu imati dvojak efekat na okolne ćelije. Iako parakrini efekti AT-MMĆ leže u osnovi reparacije i regeneracije tkiva, oni mogu izazvati i negativne efekte, kao što je stimulacija formiranja tumorske mikrosredine i rasta tumora. Proizvodnja leukemija inhibirajućeg faktora (LIF), Kyn i prostaglandina 2 (PGE₂) od strane AT-MMĆ stvara imunosupresorski milje u mikrosredini, dok su pokazana sposobnost neovaskularizacije tkiva i ekspresija SDF-1, limfoidnog hemokina CCL5 i TGF-β mogući promotori tumorogeneze. Stoga su imunosupresija i tumorogeneza posredovana AT-MMĆ predmet mnogobrojnih današnjih istraživanja čiji su rezultati još uvek nedovoljno usaglašeni i konzistentni (*Cawthorn i sar., 2012b, Zuk 2013*).

1.6.1. Niša matičnih ćelija masnog tkiva

Analogno konceptu niša u kojima su smeštene matične ćelije hematopoeze i za matične ćelije masnog tkiva se smatra da su lokalizovane u specifičnim nišama. Niša obuhvata sve elemente koji istovremeno okružuju matične ćelije, uključujući i druge ćelije koje mogu biti u direktnim kontaktima sa njima kao i ekstracelularni matriks i solubilne molekule. Svi elementi deluju udruženo kako bi se matične ćelije održale u nediferenciranom stanju. Stoga, potencijalni stimulusi moraju svoje dejstvo da usmere ka niši kako bi signal stigao do matičnih ćelija čija sposobnost diferencijacije je neophodan preduslov za regeneraciju i repopulaciju tkiva (*Kolf i sar., 2007, Mohyeldin sar., 2010*). U mećućelijskim interakcijama MMC i ostalih ćelija niše, važnu ulogu u diferencijaciji, migraciji, adheziji i polaritetu imaju transmembranski proteini, kadherini. Identifikacija niše matičnih ćelija unutar masnog tkiva je vrlo kompleksna zbog nepostojanja jedinstvenog specifičnog markera za prepoznavanje nediferenciranih AT-MMC, kao ni MMC generalno. Rezultati imunohistohemijskih analiza ukazuju da su niše lokalizovane u perivaskularnom delu, gde AT-MMC koegzistiraju sa pericitima i endotelskim ćelijama. Prema pojedinim navodima u literaturi, AT-MMC su predstavljene kao subpopulacija pericita ili vaskularnih matičnih/prekursorskih ćelija različitog stepena diferenciranosti, koje se nalaze u sloju tkiva koje okružuje vaskulaturu, što je u skladu sa pretpostavkom da krvni sudovi svih organa i tkiva održavaju MMC u svojim perivaskularnim nišama (*Kolf i sar., 2007, Baer i Geiger, 2012*) (**Slika 9**). Mnogi autori su kao potvrdu o perivaskularnom poreklu AT-MMC navodili ekspresiju specifičnog površinskog antigena (CD, *Cluster of Differentiation*) CD34, pored ekspresije standardnih MMC markera CD44, CD73, CD90 i CD105, dok se CD31, CD140 β , i α -SMA ne ekspimiraju (*Lin i sar., 2010, Zimmerlin i sar., 2010, Trktuev i sar., 2008*). Iako postojanje niša AT-MMC još uvek nije konačno dokazano, opšte je prihvaćeno da komponente mikrosredine u velikoj meri određuju specifičnost niša i imaju ključnu ulogu u regulaciji i održavanju funkcija i fenotipa ovih ćelija. Tako se smatra da upravo perivaskularna niša omogućava AT-MMC da prolaze kroz endotelijum, migriraju i naseljavaju povrećna tkiva, obezbeđujući im važnu ulogu u procesu regeneracije i reparacije tkiva (*Baer i Geiger, 2012*).



Slika 9. Komponente masnog tkiva. Šematski prikaz perivaskularne niše AT-MMĆ u masnom tkivu. *Preuzeto i izmenjeno prema Lindroos i sar., 2011.*

I dok su zreli adipociti terminalno diferencirani, a njihov potencijal proliferacije smanjen, MMĆ i progenitorske ćelije imaju veliki kapacitet proliferacije i diferencijacije. Proces adipogeneze regulisan je mnogim indukujućim i inhibirajućim faktorima, kako egzogenim tako i endogenim, kao što su faktori rasta i hormoni. Takođe, na diferencijaciju progenitora u adipocite mogu da utiču mećućelijske i interakcije ćelija sa ekstracelularnim matriksom, kao i koncentracija kiseonika (O_2) u lokalnoj mikrosredini. Na molekularnom nivou, adipogenezu prate kompleksne serijske promene u genskoj i proteinskoj ekspresiji različitih molekula u ćelijama, uključujući kompleksnu mrežu transkripcionih faktora i intermedijarnih molekula različitih signalnih puteva. Karakteristika masnog tkiva je i dobro definisana i gusta mreža kapilara, te je svaki adipocit u kontaktu sa najmanje jednim kapilarom. Stoga, ekspanzija masnog tkiva može biti potpomognuta neovaskularizacijom (hiperplazija adipocita) ili remodelovanjem postojećih kapilara (hipertrofija adipocita). U fetalnom razvoju, razvoj adipocita je uslovljen arteriolarnom diferencijacijom i to su dva, usko povezana procesa. Pokazano je da u ishemičnim/hipoksičnim uslovima, dolazi do postepenog izumiranja adipocita, endotelskih ćelija, nervnih ćelija, dok AT-MMĆ opstaju i počinju da se diferenciraju u nove adipocite (Zeve i sar., 2009, Sun i sar., 2011).

1.7. Uloga matičnih ćelija masnog tkiva u tumorskoj mikrosredini

Osim raznovrsnosti na osnovu ćelijskih mutacija, tumori se razlikuju i po koncepciji tumorske mikrosredine (TMS), proporciji stromalnih ćelija i njihovom statusu. Kao odgovor na uslove spoljašnje sredine i onkogene signale rastućih tumora, TMS se menja kontinuirano sa progresijom tumora, čime se zapravo postavlja pitanje na koji način TMS utiče na dinamičan proces kao što je metastaza, i obrnuto kako tumorske ćelije prilagođavaju novu nišu sebi (*Quail i Joyce, 2013*). U brojnim studijama je pokazano da TMS zapravo može da ima i pozitivne efekte, u smislu antitumorigenih efekata, ali i potpornu ulogu u razvoju tumora. Za razliku od tumorskih ćelija, ćelije strome su genetički stabilne, i time predstavljaju pogodnu metu za delovanje terapeuta, pri čemu se smanjuje i rizik od rezistencije i rekurentnosti tumora. S tim u vezi, smatra se da bi re-edukacija stromalnih ćelija, umesto kompletne ablacije *per se*, mogla biti efikasna strategija za lečenje tumora (*Quail i Joyce, 2013, Korkaya i sar., 2011, D'Anselmi i sar., 2013*).

Tumor dojke je trenutno najčešći oblik malignog oboljenja kod žena. Međutim, kod pacijenata, glavni uzrok mortaliteta nisu primarni tumori, već metastaze na mestima koja su udaljena od primarnih neoplazija. Masno tkivo koje se sastoji od adipocita i progenitora, među kojima su i AT-MMC je najzastupljenije tkivo koje okružuje tumorske ćelije dojke. Postoje brojni dokazi o tome da je masno tkivo pridruženo tumoru (CAA, *cancer associated adipose*) ključna komponenta progresije tumora dojke (*Kucerova i sar., 2013, Strong i sar., 2013, Bielli i sar., 2014*). Tumor dojke je veoma kompleksno i heterogeno oboljenje. Ova heterogenost na molekularnom nivou je definisana kroz analizu genske ekspresije, koja je dodatno poboljšala taksonomiju baziranu na histološkim parametrima, stanju limfnih čvorova i prisustvu markera kao što su estrogenski receptor (ER) i receptor za EGF (HER2, *human epidermal growth factor receptor 2*) u sofisticiraniju podelu na podgrupe: luminalni A, luminalni B, bazalni tip, i HER2 pozitivan. U istraživanjima kancera dojke, jedan od pristupa je i korišćenje imortalizovanih ćelijskih linija kao modela. Prva ćelijska linija karcinoma dojke BT-20 je ustanovljena još 1958. godine. Nakon 20 godina, ustanovljuju se više tumorskih ćelijskih linija, uključujući MD Andersonova serija i linija koja je najkorišćenija širom sveta. Od 1973. godine, ustanovljena je MCF-7 linija od strane

Miçigenske fondacije za kancer. Ova linija je doživela široku upotrebu zahvaljujući svojoj senzitivnosti na hormone, ekspresiji ER, što ih čini idealnim modelom za studije hormonskog odgovora. Čelijska linija MCF-7 kao i većina tumorskih čelijskih linija tumora dojke nije dobijena iz primarnih tumora, već pleuralom efuzijom metastaza. Ovo govori o tome da je zapravo istraživanje na MCF-7 liniji reprezentativno za progresivniju fazu tumorskog razvoja (kasna faza bolesti). Da bi oformile metastazu, tumorske ćelije moraju da „napadnu“ okolno tkivo domaćina, uđu u cirkulaciju i kapilare udaljenih organa, napadnu novo okolno tkivo i proliferišu. Suprotno brojnim istraživanjima vezanim za cirkulišuće tumorske ćelije, danas se pojavljuje teorija o postojanju samo nekoliko tumorskih ćelija sposobnih za iniciranje tumora, koje su označene kao tumorske matične ćelije (CSC, *cancer stem cells*), odnosno matične ćelije tumora dojke (*Weigelt i sar., 2005, Mohyeldin i sar., 2010*).

Istraživanja koja se, s jedne strane, bave povezanošću gojaznosti i maligniteta u smislu brojnih parakrinih i endokrinih faktora masnog tkiva koji mogu doprineti tumorogenezi, a s druge strane, rekonstitucijom mekog tkiva dojke nakon mastektomije kod pacijenata koji su imali tumore, uveliko su usmerili pažnju na mećućelijske odnose AT-MMĆ i tumorskih ćelija (*Rietjens i sar., 2010, Zhang i sar., 2010*). Pokazano je da AT-MMĆ u prisustvu tumorskih ćelija i njihovih solubilnih faktora, povećavaju proliferaciju, produkciju proangiogenih faktora, ali umesto adipogene diferencijacije, dolazi do miogeneze čime se menja fenotip AT-MMĆ. Ovakve AT-MMĆ stvaraju izmenjeni ekstracelularni matriks koji pogoduje razvoju tumorskog tkiva (*Chandler i sar., 2012*), a miofibroblastni fenotip AT-MMĆ čini ove ćelije potencijalnim fibroblastima pridruženim tumorskom tkivu (CAF) (*Jotzu i sar., 2011*). Mećutim, odnos između AT-MMĆ i tumorskih ćelija dojke ipak nije tako jednostavan, već efekat AT-MMĆ na tumorske ćelije može da zavisi i od toga u kojoj fazi čelijskog ciklusa se nalaze tumorske ćelije. Naime, AT-MMĆ svojim brojnim solubilnim faktorima (hormoni, faktori rasta, citokini) mogu stimulisati proliferaciju aktivnih tumorskih ćelija (kojima su ovi signali neophodni), čime zapravo stimulišu invazivnost i metastazu, ali ovi faktori nemaju efekat na dormantne tumorske ćelije koje se ne dele (*Bielli i sar., 2014*). Shodno tome, postoje brojne studije koje pokazuju da AT-MMĆ mogu imati inhibitorno (*Ryu i sar., 2014*), ali i stimulatorno delovanje (*Rowan i sar., 2014*) na razvoj tumora dojke. Pored uloge u oblikovanju funkcija tumorskih ćelija, AT-MMĆ

moгу uticati na odnos imunskog sistema prema tumorima. Pokazano je da AT-MMĆ produkcijom imunosupresivnih faktora, indukuju stvaranje Treg, kao i preusmeravanje Th1 imunskog odgovora ka Th2 odgovoru (*Patel i sar., 2010*).

S obzirom da MMĆ mogu da ispolje potpuno drugačije funkcije i efekte u tumorskoj mikrosredini, jer različiti signalni putevi mogu biti aktivirani u ovim ćelijama, objavljeni radovi koji se bave ovom problematikom imaju različite i često suprotne rezultate. Usled toga, primećeno je da postoji razlika između MMĆ koje su prisutne u TMS, takozvane tumorske MMĆ (T-MSC, *Tumor MSCs*), i onih MMĆ koje se nalaze van ovog regiona, normalne MMĆ (N-MSC, *naïve MSCs*). Naime, pokazano je da N-MSC nakon mobilizacije u tumorska tkiva bivaju „obučene“ u inflamatornim uslovima TMS-a, i transformisane u T-MSC čija se uloga u razvoju tumorskog tkiva intenzivno istražuje (*Sun i sar., 2014*).

Zahvaljujući brojnim svojstvima, poput regenerativnog potencijala, odnosno uloge u obnavljanju i popravci tkiva i organa, te održavanja njihove homeostaze, sve više se razmatra mogućnost primene MMĆ u ćelijskoj terapiji. Međutim, interakcije MMĆ sa imunskim, ali i tumorskim ćelijama, govore da mikrosredina može znatno da utiče na posledice ovih interakcija, ali i osobine MMĆ. Na taj način, MMĆ i faktori mikrosredine koji regulišu regenerativna, ali i modulatorna svojstva MMĆ, čine jednu kompleksnu i nerazdvojnu celinu.

2.CILJEVI

Mezenhimske matične ćelije (MMC) predstavljaju predmet mnogobrojnih današnjih istraživanja, s obzirom da ih njihove jedinstvene karakteristike, multipotentni potencijal diferencijacije i sposobnost samoobnavljanja, čine dobrim kandidatima za primenu u ćelijskoj terapiji i tkivnom inženjeringu. Naime, MMC imaju važnu ulogu u strukturnom i funkcionalnom sazrevanju tkiva tokom razvoja, kao i obnavljanju i reparaciji tkiva odraslog organizma. Regenerativna svojstva MMC povezana su sa njihovim multipotentnim potencijalom diferencijacije u ćelijske loze mezenhinskog sloja, poput osteogene, adipogene i hondrogene, ali je sve više dokaza da MMC mogu da se diferenciraju i u ćelije ektoderma i mezoderma. Svoju ulogu u procesima obnavljanja tkiva, MMC ispoljavaju produkcijom brojnih parakrinih faktora, a s obzirom da MMC imaju izraženu sposobnost migracije ka povrećenim tkivima, MMC predstavljaju važne trofičke faktore. U ovim procesima MMC interaguju sa ćelijama imunskog sistema ispoljavajući svoje imunomodulatorno delovanje, koje je na osnovu mnogobrojnih studija opisano kao imunosupresivno (*Bianco i sar., 2008, Kode i sar., 2009, Ghannam i sar., 2010, Ma i sar., 2014*). S druge strane, pojave neoplazija u organizmu dovode do oštećenja zdravog tkiva, čime se omogućava migracija MMC i ka tumorskoj mikrosredini, u kojoj ove ćelije imaju vrlo kompleksnu ulogu, što otvara nova pitanja o interakcijama koje MMC ostvaruju sa tumorskim i imunskim ćelijama i uticaju koje MMC imaju na ove ćelije (*Hass i Otte, 2012, Sun i sar., 2014*).

Jedan od izvora adultnih MMC je i masno tkivo koje kao najrasprostranjenije tkivo u organizmu, predstavlja potencijalno bogat i lako dostupan izvor MMC, s obzirom na to da se ovo tkivo odbacuje nakon redovnih hirurških intervencija ili rekonstruktivne hirurgije. Karakteristike MMC izolovanih iz masnog tkiva (AT-MMC) uglavnom su definisane kod zdravih donora tkiva, međutim do sada nije ispitivano da li patološka stanja, a posebno maligniteti mogu da utiču na važne karakteristike AT-MMC. Imunomodulatorni potencijal AT-MMC je još uvek nedovoljno razjašnjen, posebno imajući u vidu da u interakciji AT-MMC i imunskih ćelija važnu ulogu imaju direktni ćelijski kontakti, ali i brojni solubilni faktori produkovani od strane AT-MMC, a posebno je interesantno na koji način inflamatorni faktori mogu da utiču na imunomodulatorne osobine AT-MMC. Imajući u vidu da je masno tkivo najzastupljenije tkivo dojke, najnovija istraživanja pokazala su važnu ulogu AT-MMC u mikrosredini tumora dojke, gde je uloga AT-MMC važna kako zbog njihovih parakrinih

faktora, tako i zbog njihovog uticaja na različite funkcije tumorskih ćelija. I pored rastućeg broja istraživanja u ovoj oblasti, mehanizmi ovih uticaja su nedovoljno jasni. Polazeći od ovih činjenica u kontekstu definisanja funkcionalnih svojstava mezenhimskih matičnih ćelija izolovanih iz masnog tkiva postavljeni su sledeći:

Ciljevi istraživanja:

- Izolacija i karakterizacija AT-MMĆ
- Ispitivanje imunomodulatornih funkcija AT-MMĆ
- Određivanje uticaja AT-MMĆ na tumorske ćelije

Kako bi se ovi ciljevi ostvarili, eksperimenti tokom rada sprovedeni su u sledećim fazama:

1. Izolovanje i karakterizacija MMĆ iz humanog masnog tkiva:

- uspostavljanje optimalnih uslova za kultivaciju i ekspanziju AT-MMĆ
- karakterizacija AT-MMĆ izolovanih iz zdravih osoba i pacijenata sa malignim bolestima, a prema kriterijumima Komiteta za mezenhimске matične ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju (*Dominici i sar., 2006*) ispitivanjem sledećih karakteristika:
 - sposobnost adhezije AT-MMĆ za plastiku
 - određivanje proliferativnog potencijala AT-MMĆ
 - određivanje klonogenog kapaciteta AT-MMĆ
 - ekspresija mezenhimskih markera i odsustvo ekspresije hematopoetskih markera
 - ekspresija embrionalnih markera
 - određivanje multipotentnog potencijala diferencijacije na osnovu sposobnosti AT-MMĆ da se diferenciraju u četiri ćelijske loze (osteogenu, adipogenu, hondrogenu i miogenu)

2. Analiza imunomodulatornog potencijala AT-MMĆ:

- određivanjem efekata AT-MMĆ na proliferaciju mitogenom- ili alogenom-stimuliranih mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC)
- određivanjem efekata kondicioniranog medijuma (KM) AT-MMĆ na spontanu, mitogenom i alogenom stimuliranu proliferaciju MNC
- određivanjem nivoa konstitutivne genske ekspresije kao i genske ekspresije molekula povezanih sa imunomodulatornim delovanjem nakon kultivacije AT-MMĆ u različitim uslovima mikrosredine

3. Analiza uticaja AT-MMĆ izolovanih iz zdravih osoba i pacijenata sa malignitetima na tumorske ćelije (na modelu MCF-7 tumorske ćelijske linije adenokarcinoma dojke):

- Određivanjem uticaja AT-MMĆ i njihovih kondicioniranih medijuma na proliferaciju tumorskih ćelija i njihov klonogeni kapacitet
- Određivanjem uticaja kondicioniranih medijuma AT-MMĆ na: adhezivnost, migraciju i epitelo-mezenhimsku tranziciju tumorskih ćelija
- Određivanjem uticaja kondicioniranih medijuma AT-MMĆ na: ekspresiju enzimski aktivnih proteina urokinaza i matriksnih metaloproteinaza, i proteinsku i gensku ekspresiju molekula od važnosti za invazivnost tumorskih ćelija

3.MATERIJAL I METODE

3.1. MEDIJUMI I PUFERI

Standardni medijum (SM) za kultivaciju ćelija sastojao se iz: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle' Medium*, Sigma-Aldrich, St.Louis, Mo, SAD), obogaćenog sa 10% fetalnog govečeg seruma (FCS, *Fetal Calf Serum*, PAA Laboratories, Linz, Austria), 2 mM L glutamina (PAA Laboratories), 100 U/ml penicilina i 100 U/ml streptomicina (PAA Laboratories) i Hepes (PAA Laboratories).

Medijum sa hranljivim dodacima (HM) se sastojao se iz: DMEM, 2 mM L glutamina, 100 U/ml penicilina i 100 U/ml streptomicina i Hepes, kao i dodatog nutritivnim dodatkom Ham's F-12 (Invitrogen Carlsbad, CA, SAD) (u odnosu 1:1), obogaćenim sa 10% FCS.

Izotonični rastvor fosfatnog pufera za ćelijske kulture (PBS, *Phosphate Buffered Saline*, PAA Laboratories).

Alkalni rastvor puferovan Trisom korišćen za analizu ekspresije proteina (TBS, *Tris Buffered Saline*, Serva, Nemačka).

Pufer za lizu eritrocita sastojao se iz 155 mM NH₄Cl, 0.1 mM Na₂EDTA i 10 mM NaHCO₃.

Pufer za lizu ćelija u cilju izolacije membranskih i citosolnih proteina (RIPA, *Radioimmunoprecipitation buffer*) sastojao se iz 1% NP-40, 0.1% SDS, 1mM EDTA, 50 mM NaF, i 1% sodium deoksiholata.

Pufer za lizu ćelija za izolaciju ćelijski-vezanih enzima urokinaza i matriks-metaloproteinaza sastojao se iz 0.5% Triton X-100 u 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 8.1).

3.2. ANTITELA I REAGENSI

Podaci o korišćenim antitelima, citokinima i ostalim reagensima nalaze se u **Tabeli 1, 2 i 3.**

Tabela 1. Podaci o korišćenim antitelima. PE-*phycoerithrin*, FITC-*fluorescein isothiocyanate*. Primena: protočna citometrija (FC-*Flow cytometry*), imunofluorescenca (IF-*immunofluorescence*), western blot (WB), imunocitohemija (ICH, *immunocytochemistry*).

Antitelo	Poreklo	Proizvođač	Primena
anti-humano CD45- PE	miš	RnD Systems, SAD	FC
anti-humano h5-Nucleotidase- PE	miš	RnD Systems, SAD	FC
anti-humano Siglec3- FITC	miš	RnD Systems, SAD	FC
anti-humano CD11b- FITC	miš	RnD Systems, SAD	FC
anti-humano CD105- konjugovano PE	miš	RnD Systems, SAD	FC
anti-humano Glycophorin/CD235a- PE	miš	RnD Systems, SAD	FC
anti-humano CD90- PE	miš	RnD Systems, SAD	FC
anti-humano CD34-/R- PE	miš	RnD Systems, SAD	FC
anti-humano- HLA-DR- FITC	miš	RnD Systems, SAD	FC
anti-humano CD44- PE	miš	RnD Systems, SAD	FC
Stro-1	miš	RnD Systems, SAD	IF
Vimentin	miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD	IF, WB
α SMA	miš	Sigma Aldrich, SAD	IF
Oct-4	zec	Cell Signaling Technology, SAD	FC
SSEA4	miš	Cell Signaling Technology, SAD	FC
Sox-2	miš	Cell Signaling Technology, SAD	FC
Nanog	miš	Cell Signaling Technology, SAD	FC
anti-BrdU	miš	Sigma Aldrich, SAD	ICH
α Tubulin	miš	Sigma Aldrich, SAD	WB
uPA	zec	RnD Systems, SAD	WB
MMP2 (MMP2/8B4)	miš	Pierce, SAD	WB
β -catenin (E-5)	miš	Santa Cruz Biotechnology, SAD	IF
E-Cadherin	pacov	Sigma Aldrich, SAD	IF, WB

Tabela 2. Podaci o korišćenim sekundarnim antitelima i izotipskim kontrolama. HRP-*Horse Raddish Peroxidase*, TRITC-*tetramethyl rhodamine isothiocyanate*.

Sekundarna antitela	Poreklo	Proizvođač	Primena
anti-zečje- HRP	koza	RnD Systems, SAD	WB
anti-pacovsko- HRP	koza	Sigma-Aldrich, SAD	WB
anti-mišje- HRP	koza	Sigma-Aldrich, SAD	WB, ICH
anti-mišje- TRITC	koza	Sigma-Aldrich, SAD	IF
anti-mišje FITC	koza	Sigma-Aldrich, SAD	IF
anti-zečje FITC	koza	Sigma-Aldrich, SAD	IF
Izotipska kontrola IgG1- PE	miš	RnD Systems, SAD	FC
Izotipska kontrola IgG2B- PE	pacov	RnD Systems, SAD	FC
Izotipska kontrola IgG1- FITC	miš	RnD Systems, SAD	FC

Tabela 3. Podaci o korišćenim reagensima.

Naziv	Proizvođač	Dejstvo
humani rekombinantni IFN- γ	RnD Systems, SAD	citokin
humani rekombinantni TNF- α	RnD Systems, SAD	citokin
BrdU	Sigma-Aldrich, SAD	nukleozid
Mitomycin C	Applchem, Nemačka	citostatik
PHA	INEP, Srbija	mitogen
SB505124	Sigma-Aldrich, SAD	inhibitor

3.3 HUMANI MATERIJAL

Uzorci masnog tkiva odraslih osoba dobijeni su sa Klinike za hirurgiju Instituta za onkologiju i radiologiju Srbije u Beogradu. Od ukupno 6 dobijenih uzoraka, 3 uzorka su bila masno tkivo zdravih osoba, a ostala 3 su poreklom od pacijenata sa različitim malignitetima i iz različitih regiona (region vrata, dojke i abdomena). Svi uzorci su prikupljeni kao materijal koji se odbacuje tokom redovne hirurške intervencije u saglasnosti sa pravilima Etičkog odbora Instituta za Onkologiju i radiologiju Srbije i uz pismenu saglasnost svakog pacijenta.

3.3.1. Mezenhimske matične ćelije (MMC) iz masnog tkiva

Komadići masnog tkiva (zapremine približno 20-30 ml) su neposredno po prikupljanju čuvani u standardnom medijumu za kultivaciju ćelija (SM), na 4°C ne duže od 24 h. Intenzivnim ispiranjem sa 1x PBS prethodno mehanički usitnjenog tkiva eliminisan je veliki broj eritrocita i nečistoća. Fragmentisano tkivo je zatim izlagano digestiji uz pomoć rastvora enzima kolagenaze tipa II (1g/l) (PAA Laboratories) uz dodatak 2% albumina iz govećeg seruma (BSA, *Bovine Serum Albumine*, Sigma-Aldrich), 0,5mM CaCl₂, 1% Penicilin/Streptomycin, 0,25mg/ml Amfotericina B (PAA Laboratories). Digestija je trajala 2 h na 37°C, a izdvojene ćelije su potom resuspendovane u puferu za lizu eritrocita (154mM NH₄Cl) i inkubirane na sobnoj temperaturi 10 min. Nakon više ispiranja, određivan je broj ćelija, koje su potom zasejavane u flaskove za kulturu tkiva u koncentraciji od 1x10⁴ ćelija/cm² u SM. Ova primarna ćelijska suspenzija inkubirana je na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i relativnom vlažnošću 100%, a medijum je menjan svaka 2-3 dana. Prilikom promene medijuma uklanjanje su neadherentne ćelije, a mezenhimske matične ćelije su izdvajane na osnovu sposobnosti adhezije za plastiku. Ove adherentne ćelije su označene kao nulta pasaža (P0). Kada su nakon 14 dana ćelije dostizale 80% konfluentnosti, ispirane su sa PBS i odlepljivane pomoću 0,25% tripsina u 1mM EDTA (PAA Laboratories) na 37°C u toku 10 min.

Vijabilitet ćelija je određivan korišćenjem 0,4% rastvora tripan plavog (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD), nakon čega su ćelije ponovo zasejavane u

koncentraciji 1×10^4 ćelija/cm² u flaskove za kulturu tkiva za sledeću pasažu. Iz svih 6 uzoraka uspešno su izolovane i umnožene MMC, koje su na osnovu porekla masnog tkiva podeljene na tri tipa ćelija: ćelije iz masnog tkiva zdravog donora (**nAT-MMC**, *normalne AT-MMC*), iz tkiva neposrednog okruženja tumora (**tAT-MMC**, *tumor AT-MMC*) i iz masnog tkiva pridruženog tumorskom tkivu dojke (**tdAT-MMC**, *tumor dojke AT-MMC*). Za sve eksperimente, korišćene su ćelije od 2. do 6. pasaže i svi eksperimenti su ponovljeni najmanje 3 puta.

3.3.1.1. Priprema kondicioniranog medijuma (KM) AT-MMC

Ćelije su zasejavane u flaskovima za kulturu tkiva u koncentraciji 1×10^4 /cm² i inkubirane na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i relativnom vlažnošću 100% do postizanja 80% konfluentnosti, kada je dodat svež SM. Nakon dodatnih 48h inkubacije, kondicionirani medijumi kultura ćelija (KM) su sakupljeni, centrifugirani 10 min na 500 xg, filtrirani kroz filter veličine pore 0,2 µm (Sartorius, Nemačka) i čuvani na -70° C do upotrebe. Ovaj KM je korišćen u eksperimentima ispitivanja efekata na proliferaciju MNC, tumorskih ćelija i drugih ćelijskih linija.

U dodatnim eksperimentima, AT-MMC kultivisane u HM u standardnim uslovima, su nakon dostizanja 80% konfluentnosti, inkubirane sledećih 24 h sa IFN-γ (50 ng/ml) i/ili TNF-α (20 ng/ml). Posle tretmana, HM sa citokinima je zamenjen svežim HM, te su nakon dodatnih 24 h inkubacije, sakupljeni kondicionirani medijumi (KM₀, KM_{IFN/TNF}, KM_{IFN}, KM_{TNF}) AT-MMC, koji su centrifugirani 10 min, na 500 xg, filtrirani kroz filter veličine pore 0,2 µm (Sartorius, Nemačka) i korišćeni u odgovarajućim eksperimentima.

3.3.2. Mononuklearne ćelije periferne krvi (MNC)

Ukupne mononuklearne ćelije periferne krvi su izolovane iz periferne krvi dobrovoljnih zdravih davalaca, izdvajanjem na gradijentu za izolovanje mononuklearnih ćelija gustine 1,077 g/ml (*Lymphocyte Separation Medium 1077*, PAA Laboratories). Nakon ispiranja ćelije su resuspendovane u standardnom medijumu za kultivaciju ćelija (SM), a njihova koncentracija je određena brojanjem u Türk rastvoru (NRK, Srbija).

3.4. ĆELIJSKE LINIJE

Za istraživanja su korišćene komercijalno dostupne tumorske ćelijske linije adenokarcinoma dojke MCF-7 (ATCC/HTB-22), kancera prostate PC3 (ATCC/CRL-1435), i adenokarcinoma debelog creva SW-480 (ATCC/CCL-228) koje su kultivisane SM ili HM na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i relativnom vlažnošću 100%. Pored tumorskih ćelijskih linija, korišćena je i humana endotelska ćelijska linija EA.hy 926 (ATCC/CRL-2922). U pojedinim eksperimentima korišćene su i primarne humane MMĆ izolavane iz zubne pulpe (ZP-MMĆ). Ove MMĆ su okarakterisane kao MMĆ na osnovu multipotentnog potencijala diferencijacije i prisustva markera mezenhimskih ćelija (CD90, CD44, CD105, STRO-1, vimentin i α -SMA) kao što je prethodno opisano (Nikolić i sar., 2011).

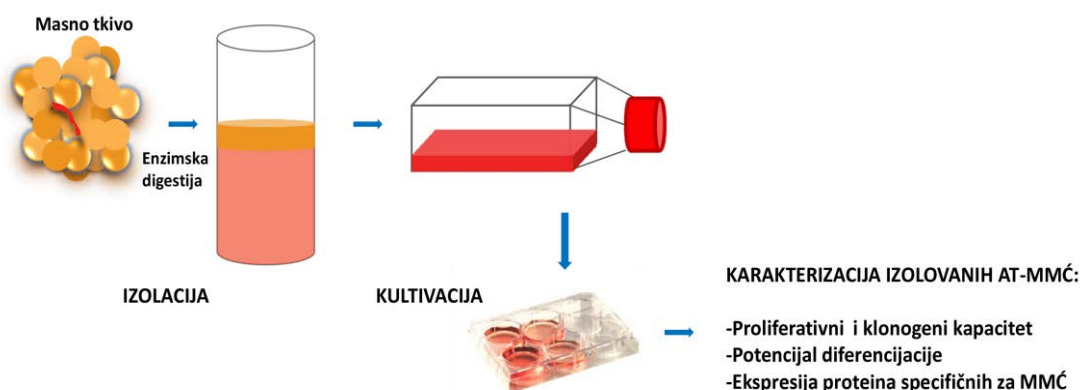
3.5. EKSPERIMENTALNI DIZAJN

3.5.1. Karakterizacija mezenhimskih matičnih ćelija iz masnog tkiva (AT-MMĆ)

Izolovane MMĆ iz masnog tkiva zdravih donora (nAT-MMĆ), ali i pacijenata koji su bolovali od karcinoma (tAT-MMĆ i tdAT-MMĆ) okarakterisane su na osnovu njihovih morfoloških karakteristika, klonogenog i proliferativnog kapaciteta, imunofenotipa i potencijala diferencijacije (**Slika 1.**).

Proliferativni kapacitet AT-MMĆ praćen je u kratkoročnom (2, 4, 7 dana) i dugoročnom vremenskom periodu (24 dana) i određivano je vreme dupliranja ćelijske populacije, a klonogeni potencijal određivan je pomoću CFU-F testa. Ispitivanje multipotentnog potencijala diferencijacije AT-MMĆ, vršeno je indukcijom osteogene, adipogene, hondrogene i miogene diferencijacije. Da bi se potvrdio mezenhimski karakter AT-MMĆ, izvršeno je imunofluorescentno bojenje proteina tipičnih za mezenhimske ćelije stromalnog porekla, Vimentin, STRO-1 i α -SMA. Takođe, metodom protočne citometrije praćen je nivo ekspresije markera na površini ćelija koji su nepohodni prema kriterijumima Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju: CD105, CD90, CD44H i CD73, kao i nivo ekspresije hematopoetskih površinskih markera kao

što su CD45, CD34, CD11b, CD235a, CD33 i HLA-DR. Ovom metodom analiziran je i nivo ekspresije markera embrionalnih matičnih ćelija, transkripcionih faktora Nanog, Sox-2 kao i membranskog antigena specifičnog za embrionalne ćelije (SSEA4, *Stage Specific Embryonic Antigen 4*).

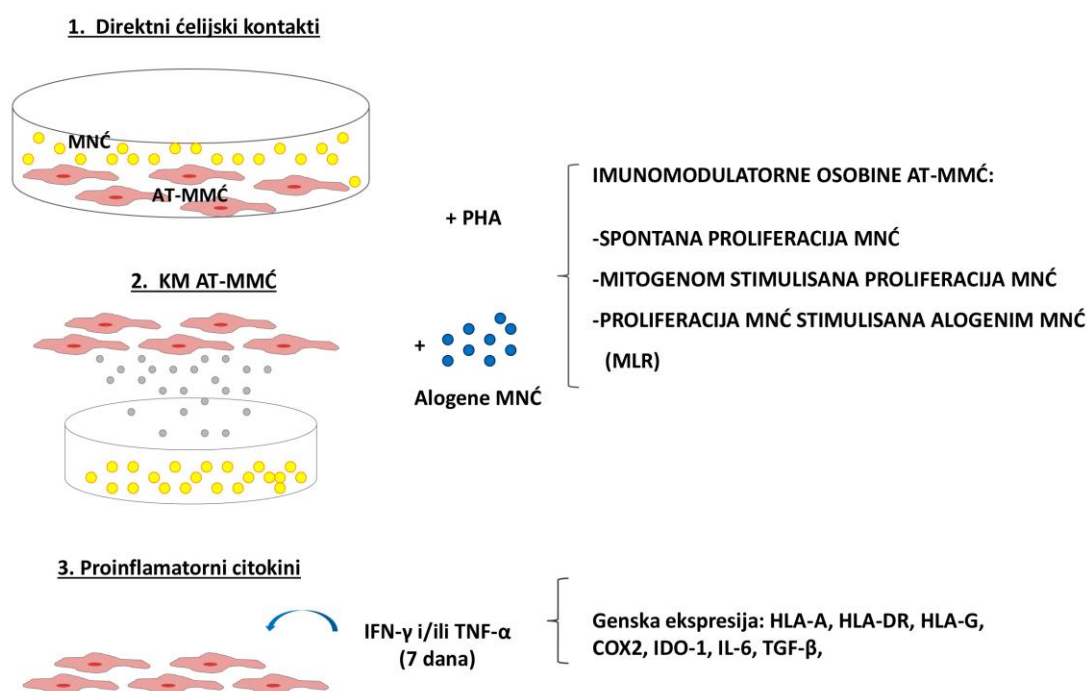


Slika 1 . Shematski prikaz protokola za izolaciju i karakterizaciju mezenhimskih matičnih ćelija masnog tkiva

3.5.2. Ispitivanje imunomodulatornog potencijala AT-MMĆ

U cilju praćenja imunomodulatornih svojstava AT-MMĆ, ispitivano je dejstvo ovih matičnih ćelija na spontanu, kao i na mitogenom i aloantigenom stimulisanu proliferaciju mononuklearnih ćelija periferne krvi (MNC) zdravih donora (**Slika 2.**). Uticaj na proliferaciju MNC odreĎivan je na nivou direktnih ćelijskih kontakata AT-MMĆ i MNC, kao i na nivou delovanja solubilnih molekula produkovanih od strane AT-MMĆ, posebnom pripremom kondicioniranog medijuma (KM). Za stimulisanje proliferacije korišćen je mitogen fitohemaglutinin (PHA, *phytohemagglutinin*) ili je primenjena reakcija mešanih limfocita (MLR, *Mixed Lymphocytes Reaction*) dva

donora. U slučaju praćenja direktnih ćelijskih kontakata, nivo proliferacije MNĆ je meren metodom ugradnje BrdU u ćelije. Efekat KM AT-MMĆ na proliferaciju MNĆ meren je MTT testom. Metodom RT-PCR, analizirana je konstitutivna ekspresija (na nivou iRNK) gena uključenih u imunomodulatorne funkcije i regulaciju ćelijskih interakcija tri tipa AT-MMĆ: HLA-A, HLA-DR, HLA-G, IL-6, TGF- β , IDO-1 i COX2. Genska ekspresija ovih molekula analizirana je i nakon tretiranja AT-MMĆ proinflamatornim citokinima IFN- γ (50 ng/ml) i TNF- α (20 ng/ml) u toku 7 dana, kako bi se ispitaio uticaj inflamatorne sredine na gensku ekspresiju molekula važnih za imunski status AT-MMĆ.



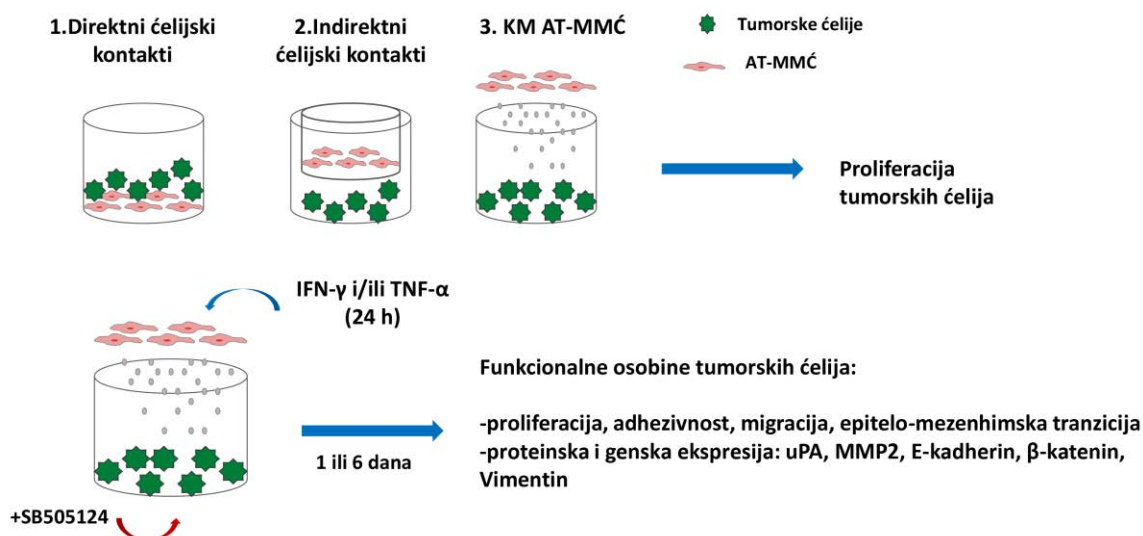
Slika 2 . Shematski prikaz eksperimentalnog protokola za ispitivanje imunomodulatornih svojstava AT-MMĆ.

3.5.3. Uloga AT-MMĆ u tumorskoj mikrosredini

U cilju ispitivanja uticaja MMĆ na tumorske ćelije, poređen je uticaj tri tipa AT-MMĆ (nAT-MMĆ, tAT-MMĆ, tdAT-MMĆ) na proliferaciju i klonogeni potencijal MCF-7 tumorskih ćelija. Efekti su određivani na nivou direktnih i indirektnih ćelijskih kontakata, kada su ćelije gajene u *transwell* sistemu, a određivanje i uticaj solubilnih molekula, odnosno kondicioniranog medijuma (KM) tri tipa AT-MMĆ na proliferaciju MCF-7 ćelija.

Drugi deo ovih istraživanja obuhvatao je praćenje efekta AT-MMĆ, kao i njihovih KM na funkcionalne osobine MCF-7 ćelija (**Slika 3.**). U cilju boljeg sagledavanja uloge inflamacije u tumorskoj mikrosredini, AT-MMĆ su 24 h preinkubirane sa proinflamatornim citokinima IFN- γ (50 ng/ml) i TNF- α (20 ng/ml), a zatim je ispitivan efekat i na taj način dobijenih i prikupljenih KM.

Nakon inkubacija od 1 ili 6 dana, analizirana je proliferacija, adhezivnost i migracija MCF-7 ćelija. Takođe, ispitivan je i uticaj na proces epitelo-mezenhimske tranzicije MCF-7 ćelija, određivanjem ekspresije molekula E-kadherina, Vimentina i β -katenina na proteinskom i genskom nivou. Kod MCF-7 ćelija određivana je i enzimska aktivnost ćelijski-vezanih urokinaza (uPA) i matriks-metaloproteinaza (MMP) metodom zimografije, dok je ekspresija ovih proteina analizirana Western blot analizom, a ekspresija njihovih gena RT-PCR metodom. Da bi se ispitalo da li je TGF- β uključen u efekte posredovane kondicioniranim medijumom AT-MMĆ na proces migracije, ekspresiju urokinaza, kao i proces epitelo-mezenhimske tranzicije tumorskih ćelija, u pojedine eksperimente je uključen farmakološki inhibitor TGF- β I receptora (ALK5), SB505124.



Slika 3. Shematski prikaz eksperimentalnih protokola za analizu efekata AT-MMĆ i njihovih KM na funkcionalne osobine tumorskih ćelija.

3.6. ISPITIVANJE FUNKCIONALNIH SVOJSTAVA ĆELIJA

3.6.1. Proliferativni kapacitet AT-MMĆ

Proliferativni kapacitet AT-MMĆ u kratkoročnim kulturama odreĎivan je zasejavanjem AT-MMĆ iz pasaža P2-P6 u ploče za kulturu tkiva sa 6 otvora u koncentraciji 4×10^4 ćelija/otvoru i inkubacijom na 37°C u atmosferi sa 5% CO_2 i relativnom vlažnošću 100%. Nakon 2, 4 i 7 dana, ćelije su odlepljivane sa tripsin-EDTA, a njihov broj i vijabilitet odreĎivani su bojenjem sa 0,4% rastvorom tripana.

Za odreĎivanje proliferativnog kapaciteta u dugoročnim kulturama, AT-MMĆ iz pasaža P2-P6 su zasejavane u ploče za kulturu tkiva u tri različite koncentracije 5×10^4 , 1×10^5 i $2,5 \times 10^5$ ćelija/otvoru i inkubirane na 37°C u atmosferi sa 5% CO_2 i relativnom vlažnošću 100%. Po dostizanju konfluentnosti, ćelije su odlepljivane sa tripsin-EDTA, izbrojane i ponovo zasejavane u istim koncentracijama. Ovakav postupak je ponavljjan pri svakoj pasaži tokom 24 dana. Iz dobijenih podataka izraĎunavano je vreme potrebno za udvostručenje ćelijske populacije (PDT, *Population Doubling Time*) po formuli

$PDT = (T - T_0) \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$, gde je T_0 početno vreme kultivisanja, a T završno vreme kultivacije. N_0 i N_t predstavljaju broj ćelija na početku i kraju kultivacije.

3.6.2. Klonogeni kapacitet ćelija

Klonogeni kapacitet AT-MMĆ ispitivan je u testu formiranja CFU-F kolonija u kome su AT-MMĆ zasejavane u ploče za kulturu tkiva sa 6 otvora u koncentracijama 50, 100 i 200 ćelija/otvoru u SM. Ćelije su kultivisane u duplikatu, 14 dana na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i relativnom vlažnošću 100%.

Da bi se ispitao uticaj AT-MMĆ na rast tumorske ćelijske linije, postavljan je esej stvaranja CFU kolonija od strane MCF-7 ćelija koje su zasejavane u ploče sa 24 mesta, u koncentraciji 200 ćelija/otvoru u HM. Nakon toga, ćelijama su dodavane AT-MMĆ kako netretirane, tako i tretirane sa citokinima IFN- γ (50 ng/ml) i/ili TNF- α (20 ng/ml) u toku 24 h, u koncentraciji 20 ćelija/otvoru. Bunarčići u kojima su bile samo MCF-7 ili AT-MMĆ predstavljale su kontrolu. Na osnovu prethodnih analiza, utvrđeno je da odnos 10:1 (MCF-7:AT-MMĆ) omogućava formiranje kolonija koje su predominantno sastavljene od MCF-7 ćelija. Takođe da bi se ispitao efekat KM AT-MMĆ na CFU potencijal tumorskih ćelija, MCF-7 ćelije su kultivisane i sa AT-MMĆ-kondicioniranim medijumima ili samo sa HM kao kontrolom. Medijumi (HM ili KM) su menjani na svaka 2-3 dana, a ćelije su inkubirane 10 dana na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i relativnom vlažnošću 100%.

Nakon odgovarajućih inkubacija, ćelije su ispirane sa PBS-om, zatim fiksirane 5 min sa hladnim metanolom i bojene 0,3% kristal-violet bojom 15 min. Broj formiranih kolonija određivan je brojanjem pod inverznim mikroskopom na uveličanju 40 puta, pri čemu je kao jedna kolonija podrazumevana grupacija ćelija koja sadrži više od 50 ćelija.

3.6.3. Diferencijacija AT-MMĆ

U cilju određivanja kapaciteta diferencijacije, AT-MMĆ su zasejavane u ploče za kulturu tkiva sa 24 otvora u koncentraciji 4×10^3 ćelija/otvoru i kultivisane u SM na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i relativnom vlažnošću 100% do dostizanja konfluentnosti od 80%. Zatim je SM zamenjivan specifičnim medijumima za diferencijaciju koji

usmeravaju diferentovanje AT-MMĆ ka stvaranju odgovarajućih ćelija različitih mezenhimalnih tkiva. Kulture ćelija kultivisane samo u SM, predstavljale su kontrole.

3.6.3.1. Osteogena diferencijacija AT-MMĆ

Za indukovanje osteogene diferencijacije, SM je obogaćen sa 10 nM deksametazona (Applichem), 200 µM fosfatom askorbinske kiseline (Galenika, Srbija) i 10 mM β-glicerofosfatom (Sigma-Aldrich). Ćelije su inkubirane na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i relativnom vlažnošću 100% 7 dana, a medijum je menjan svaki 3. dan. Nakon 7 dana, osteogena diferencijacija je detektovana praćenjem aktivnosti alkalne fosfataze (ALP) bojenjem 5-bromo-4-hloro-3-indolil fosfat/nitro plavi tetrazolijum BCIP/NBT (Sigma-Aldrich). Ćelije su potom analizirane i fotografisane svetlosnim mikroskopom.

3.6.3.2. Adipogena diferencijacija AT-MMĆ

Da bi se indukovala adipogena diferencijacija, u SM je dodavano 100 µg/ml izobutil-metilksantina (IBMX, Sigma-Aldrich), 1 µM deksametazon i 10 µg/ml insulina (Actrapid, Novonordisc, Bagsvaerd, Danska). AT-MMĆ su inkubirane u adipogenom medijumu 2 nedelje na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i relativnom vlažnošću 100%. Medijum je zamenjivan na svaka 3 dana. Adipogena diferencijacija je potvrđivana prisustvom unutarćelijskih lipidnih kapljica nakon bojenja ćelija Oil Red O bojom (Merck).

3.6.3.3. Hondrogena diferencijacija AT-MMĆ

Da bi se indukovala hondrogena diferencijacija, u SM je dodavano 5 ng/ml TGF-β (RnD), 200 µM fosfata askorbinske kiseline i 10 nM deksametazona. AT-MMĆ su kultivisane sa ovim medijumom 21 dan na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i relativnom vlažnošću 100%, a medijum je menjan 3 puta nedeljno. Hondrogena diferencijacija je potvrđena na osnovu stepena obojenosti glikozaminoglikana *Safranin O* bojom (Merck, Darmstadt, Nemačka).

3.6.3.4. Miogena diferencijacija AT-MMĆ

U cilju indukcije miogene diferencijacije, AT-MMĆ su inkubirane u diferencijacionim medijumu koji se sastojao iz SM, u koji je dodavano 5% konjskog seruma (PAA), 50 μ M hidrokortizona (Galenika), 0,1 μ M deksametazona i 2% FCS. Ćelije su inkubirane na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i relativnom vlažnošću 100% u toku 16 dana, uz zamenu medijuma svaka dva do tri dana. Miogena diferencijacija je dokazivana prisustvom miotuba, pojedinačnih ćelija sa tri ili više jedara, nakon fiksiranja ćelija u hladnom metanolu i bojenja 0,3% kristal-violet bojom i ispitivanja na svetlosnom mikroskopu.

3.6.4. Ispitivanje modulatornog uticaja AT-MMĆ na spontanu, fitohemaglutininom (PHA) i alogenima stimulisanu proliferaciju MNĆ

3.6.4.1. Uticaj AT-MMĆ i njihovih KM na spontanu proliferaciju MNĆ

U cilju ispitivanja uticaja direktnih ćelijskih kontakata na spontanu proliferaciju MNĆ, AT-MMĆ su zasejavane u koncentraciji 1×10^3 i 1×10^4 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 96 otvora u SM i ostavljane da adheriraju na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i relativnom vlažnošću 100% preko noći. Po završenoj inkubaciji adherirane ćelije su inaktivisane Mitomicinom C u finalnoj koncentraciji 25 μ g/ml kako bi se zaustavila proliferacija AT-MMĆ. Na adherirane AT-MMĆ su dodavane alogene MNĆ u koncentraciji 1×10^5 ćelija/otvoru ploče, a zatim su ćelije kultivisane 3 dana.

Dodatno, kao bi se ispitao uticaj KM AT-MMĆ na spontanu proliferaciju, MNĆ su zasejavane u koncentraciji 1×10^5 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 96 otvora u SM, i uz dodatak 20% KM AT-MMĆ inkubirane su 3 i 6 dana na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i relativnom vlažnošću 100%. Kontrolu su predstavljale MNĆ kultivisane samo u SM, bez prisustva AT-MMĆ ili KM-AT-MMĆ.

3.6.4.2. Uticaj AT-MMĆ i njihovog KM na proliferaciju MNĆ stimulisanu sa PHA

Kako bi se ispitao uticaj direktnih ćelijskih kontakata AT-MMĆ i MNĆ na mitogenom stimulisanu proliferaciju MNĆ, AT-MMĆ su zasejavane u koncentraciji 1×10^3 i 1×10^4 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 96 otvora u SM i ostavljane da adheriraju na 37°C u atmosferi sa 5% CO_2 i relativnom vlažnošću 100% preko noći. Po završenoj inkubaciji adherirane ćelije su inaktivisane Mitomicinom C u finalnoj koncentraciji 25 $\mu\text{g/ml}$ kako bi se zaustavila proliferacija AT-MMĆ. Izolovane i resuspendovane u SM, alogene MNĆ su dodavane u koncentraciji 1×10^5 /otvoru ploče za kulturu tkiva ćelija u otvore sa i bez AT-MMĆ, pri čemu je PHA je dodavan u finalnoj koncentraciji 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Ćelije su zajedno kultivisane 3 dana.

Dodatno, kako bi se ispitao uticaj KM AT-MMĆ na mitogenom stimulisanu proliferaciju, MNĆ su zasejavane u koncentraciji 1×10^5 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 96 otvora u SM u koji je dodavano 20% KM AT-MMĆ i PHA u finalnoj koncentraciji 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Ćelije su inkubirane 3 dana na 37°C u atmosferi sa 5% CO_2 i relativnom vlažnošću 100%. Kontrolu su predstavljale MNĆ kultivisane samo u SM, bez prisustva AT-MMĆ i KM AT-MMĆ.

3.6.4.3. Uticaj AT-MMĆ i njihovog KM na reakciju mešanih limfocita (MLR)

U cilju ispitivanja uticaja direktnih ćelijskih kontakata AT-MMĆ i MNĆ na alogenom stimulisanu proliferaciju MNĆ, AT-MMĆ su zasejavane u koncentraciji 1×10^3 i 1×10^4 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 96 otvora u SM i ostavljane da adheriraju na 37°C u atmosferi sa 5% CO_2 i relativnom vlažnošću 100% preko noći. Po završenoj inkubaciji adherirane ćelije su inaktivisane Mitomicinom C u finalnoj koncentraciji 25 $\mu\text{g/ml}$ kako bi se zaustavila proliferacija AT-MMĆ. Izolovane i resuspendovane u SM, MNĆ različitih donora su dodavane u koncentracijama po 1×10^5 /otvoru ploče za kulturu tkiva u otvore sa i bez AT-MMĆ, a zatim su kultivisane 6 dana.

Dodatno, kao bi se ispitao uticaj KM AT-MMĆ na alogenom stimulisanu proliferaciju, MNĆ iz različitih donora su zasejavane u koncentraciji po 1×10^5 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 96 otvora u SM u koji je dodavano 20% KM AT-

MMĆ. MNĆ su inkubirane 6 dana na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i relativnom vlažnošću 100%. Kontrolu su predstavljale ko-kulture MNĆ dva različita donora kultivisane samo u SM bez prisustva AT-MMĆ i KM-AT-MMĆ.

3.6.5. Analiza ćelijske proliferacije BrdU-testom

U ispitivane ćelijske kulture tokom poslednja 24 h kultivacije prema odgovarajućim protokolima dodavan je BrdU u finalnoj koncentraciji od 1×10^{-5} M. Po završenoj inkubaciji, medijum je aspiriran iz svih otvora, a ćelije su ispirane u PBS, osušene, fiksirane sa 100% etanolom, denaturisane sa 2N HCl, a potom i neutralisane sa 0,1 M Na-borat (Na₂B₄O₇). Nakon ispiranja, za blokiranje nespecifičnog vezivanje, dodavan je 1% BSA u PBS u toku 1h na sobnoj temperaturi, a zatim je dodavano mišje anti-BrdU i inkubirano 2h na sobnoj temperaturi. Nakon toga, dodavano je sekundarno anti-mišje antitelo konjugovano enzimom HRP, koje je inkubirano 1h na sobnoj temperaturi. Ćelije su ispirane sa PBS, u koji je dodavan Tween-20 (Sigma-Aldrich), a zatim je dodavan supstrat peroksidaze, 3,3',5,5' tetrametilbenzidin (TMB, Sigma-Aldrich), nakon čega je reakcija prekidana dodavanjem 2 M H₂SO₄. Na kraju testa, merene su apsorbance na 450 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (Labsystem Multiskan PLUS, Finska).

3.6.6. Analiza ćelijske proliferacije MTT testom

Stepen proliferacije ćelija analiziran je i MTT testom. Nakon odgovarajućih kokultivacija ili tretmana ćelija, u eksperimentalne uzorke je dodavan reagens MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid) (Sigma-Aldrich) u finalnoj koncentraciji 0,5 mg/ml. Nakon 2-3 h inkubacije na 37°C u atmosferi sa 5% CO₂ i relativnom vlažnošću 100%, formirani tamni kristali formazana su rastvarani u dimetilsulfoksidu (DMSO) ili alternativno, dodavanjem 10% SDS u 0,01 N HCl, nakon čega je očitavana apsorbanca na 540 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (Labsystem Multiskan PLUS).

3.6.7. Analiza ćelijske adhezije

Za određivanje ćelijske adhezije MCF-7 ćelije su zasejavane u HM ili KM u koncentraciji 3×10^4 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 24 otvora. Nakon inkubacije od 24 h na 37°C u atmosferi sa 5% CO_2 i relativnom vlažnošću 100%, pokupljen je supernatant sa ćelijama koje nisu adherirale. Adherentne ćelije su ispirane sa PBS, zatim fiksirane sa 4% paraformaldehidom 10 minuta i onda bojene sa 0,1% kristal-violet bojom 10 minuta. Boja je uklanjana ispiranjem destilovanom vodom, obojene ćelije su rastvarane sa 10% sirćetnom kiselinom, a apsorbanca je merena na 540 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče. Eksperimenti su ponovljeni 3 puta u triplikatu.

3.6.8. Analiza ćelijske migracije

Migratorni potencijal ćelija analiziran je *in vitro Scratch* testom. Ćelije su zasejavane u koncentraciji 3×10^4 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 24 otvora i inkubirane na 37°C , u atmosferi sa 5% CO_2 i relativnom vlažnošću 100%. Nakon dostizanja konfluentnosti, nastavkom pipete je povučena prava linija po sredini otvora, koja predstavlja bezćelijski prostor (ogrebotinu), nakon čega su ćelijske kulture inkubirane prema eksperimentalnom dizajnu u standardnim uslovima. Ćelijska migracija u polje ogrebotine dokumentovana je na svetlosnom mikroskopu i kvantifikovana korišćenjem Tscratch programa (Computational Science and Engineering Laboratory, Swiss Federal Institute of Technology, ETH Zürich, Švajcarska).

3.7. ANALIZE ĆELIJSKIH PROTEINA

3.7.1. Imunofluorescentno bojenje ćelija

Za imunofenotipsku analizu ekspresije markera potrebnih za karakterizaciju mezenhimalnih matičnih ćelija korišćeni su test direktne i test indirektna fluorescence, a rezultati su analizirani metodom protočne citometrijske analize ili su očitavani na mikroskopu.

3.7.1.1. Protočna citometrija

Ćelije su zasejavane u koncentraciji 3×10^4 ćelija/otvoru u ploču za kulturu tkiva sa 24 otvora. Nakon inkubacije na 37°C u atmosferi sa 5% CO_2 i relativnom vlažnošću 100% i dostizanja konfluentnosti, ćelije su odlepljivane sa 1mM EDTA, ispirane hladnim PBS kome je dodat 0,5% BSA i podeljene u epruvete u koncentraciji 2×10^5 ćelija/epruveti. Ćelije su obeležavane primarnim monoklonskim mišjim anti-humanim antitelima za: CD34, CD90, CD44H, CD73, CD105, Cd11b, CD33, CD45, Glikoforin-CD235a i HLA-DR, koja su bila konjugovana fluorescentnim markerima PE ili FITC (**Tabela 1.**), a inkubacija je trajala 30 min u mraku. Kao izotipske kontrole korišćena su antitela za koja su podaci dati u **Tabeli 2.**

Prisustvo specifičnih markera embrionalnih matičnih ćelija određivano je nakon što su ćelije odlepljivane, fiksirane formaldehidom i permeabilizovane u 90% metanolu u cilju obeležavanja endogenih markera. Nakon toga, ćelije su razdvojene u epruvete u koncentraciji 1×10^5 ćelija/epruveti i obeležavane primarnim antitelima za SOX2, SSEA4 i Nanog (**Tabela 1.**) u toku 1h, a zatim inkubirane sa odgovarajućim sekundarnim antitelom konjugovanim FITC-om (**Tabela 2.**) Izotipske kontrole su korišćene da bi se odredio nivo nespecifičnog vezivanja antitela. Ove analize izvršene su na protočnom citometru CytoFlow CL (Partec, Münster, Nemačka).

3.7.1.2. Indirektna imunofluorescenca

Ćelije su zasejavane na staklene ljušpice u koncentraciji 5×10^4 ćelija/ljušpici, kultivisane na 37°C u atmosferi sa 5% CO_2 i relativnom vlažnošću 100%, a nakon

dostizanja 70% konfluentnosti i odgovarajućih tretmana ćelije su ispirane sa PBS, fiksirane 4% paraformaldehidom i permeabilizovane sa 0,1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) u PBS. Blokiranje nespecifičnog vezivanja antitela vršeno je inkubiranjem eksperimentalnih uzoraka sa rastvorom 1% BSA u PBS. Potom su dodavana primarna antitela (1h na sobnoj temperaturi) (**Tabela 1.**), a zatim i sekundarna antitela (**Tabela 2.**) konjugovana odgovarajućim fluorescentnim bojama u odgovarajućim razblaženjima u 1% BSA u PBS (1h na sobnoj temperaturi u mraku). Bojenje ćelijskog jedra izvršeno je dodavanjem 4',6-diamidin-2-fenilindol (DAPI, Sigma Aldrich) boje u slučaju AT-MMC, odnosno propidijum jodidom (PI, Invitrogen) za MCF-7 ćelije.

Za bojenje ćelijskih nukleusa sa propidijum-jodidom, ćelije su nakon obeležavanja antitelima stabilizovane u rastvoru soli (0,3 M NaCl, 0,03 M Na-citrat, pH 7,0) i inkubirane sa RNazom (100 µg/ml) 20 min na 37° C, a PI je dodavan u koncentraciji 1 mg/ml.

Nakon bojenja ćelijskih nukleusa, ljspice su ispirane sa PBS i destilovanom vodom, zatim prenošene na predmetna stakla na koja je prethodno nanešen posebni medijum za ljspice za imunofluorescencu. Ćelije su analizirane i fotografisane pomoću konfokalnog (Leica TCS SP5 II Basic, Leica Microsystems, Mannheim, Nemačka) ili imunofluorescentnog mikroskopa (Olympus).

3.7.2. Western blot analiza

3.7.2.1. Izolacija membranskih i citosolnih proteina

Nakon odgovarajućih eksperimentalnih inkubacija, ćelijski proteini su izolovani primenom pufera za lizu citosolnih i membranski-vezanih proteina (RIPA pufer). Neposredno pre tretmana ćelija, puferu su dodavani inhibitori proteaza: Na-oroivanadat (200 mM), koktel inhibitora proteaza, PMSF (100 mM) i E-ACA (1 M), i tako pripremljenim puferom tretirane su ćelije zasejane u pločama sa 6 otvora. Nakon toga inkubacije od 30 min na ledu uz povremeno mešanje, ćelijski lizati su sakupljeni i centrifugirani na 10000xg na 4°C, 15-20 min. Koncentracija proteina u supernatanim (ćelijskim lizatima) određivana je upotrebom komercijalnog BCA test (Serva Electrophoresis, Nemačka). Lizati su čuvani na -70°C.

3.7.2.2. Elektroforeza i SDS PAGE

Jednake količine proteina (10 μ g) lizata su pomešane sa puferom za pripremu uzoraka (0,125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerola, 0,2 M DTT, 0,02% bromfenol plavo, pH 6,8), prokuvane 5 min u vodi. Ovako pripremljeni uzorci su nanošeni na gel koji sadrži 10% akrilamida i razdvajani SDS-PAGE elektroforezom u redukujućim uslovima, pri konstantnoj struji jačine 30 mA, tokom 1 h i 30 min. Nakon toga, tokom polusuvog elektrotransfera pri struji jačine 100 mA u toku 1 h i 30 min, gelovi sa razdvojenim proteinima su prenošeni na nitroceluloznu membranu čija je veličina pore 0,45 μ m (Applichem).

3.7.2.3. Immunoblot

Nakon transfera, nespecifično vezivanje proteina za membranu je blokirano potapanjem membrane u rastvor 3% BSA u TBS u toku 1 h na sobnoj temperaturi. Zatim, je membrana inkubirana sa odgovarajućim razblaženjem primarnog antitela u toku 12 h na 4°C, a nakon ispiranja sa rastvorom TBS u koji je dodavan Tween-20 (Sigma-Aldrich) (TBS-Tween), inkubirana i sa sekundarnim antitelom konjugovanom enzimom HRP u toku 2 h. Membrana je ponovo ispirana sa rastvorom TBS-Tween, a potom i samo sa TBS.

3.7.2.4. Detekcija proteinskih traka

Proteini obeleženi antitelima su detektovani uz pomoć reagensa za hemiluminescenciju koji sadrži supstrat enzima peroksidaze luminol (Serva Electrophoresis, GmbH). Proteinske trake vizuelizovane su na autoradiografskom filmu (Santa Cruz Biotechnology), a njihov intenzitet analiziran je na osnovu proteinskog markera (*Page Ruler plus Prestained Protein Ladder*, Pierce) i denzitometrije primenom programa Total Lab v1.11 software (Amersham, Pharmacia Biotech, Uppsala, Švedska).

3.7.3. Analiza enzimske aktivnosti metodom zimografije

Da bi se ispitalo prisustvo aktivnih, ćelijski-vezanih enzima korišćena je ranije opisana metoda zimografije (*Alfano i sar., 2008*). Ćelije su zasejavane u ploče sa 6 otvora u koncentraciji 10^5 ćelija/otvoru i kultivisane do 80% konfluentnosti, nakon čega su ćelijske kulture inkubirane prema specifičnom eksperimentalnom dizajnu. Nakon odgovarajuće inkubacije, ćelije su ispirane sa PBS, a zatim lizirane na ledu 10 min sa 300 μ l pufera za lizu. Ćelijski lizati su nakon toga centrifugirani na 10000 x g 15 min. Lizati su alikvotirani i čuvani na -70° C. Sadržaj proteina je odreĎivan BCA esejom uz pomoć komercijalno dostupnog testa.

Jednake količine proteina ćelijskih lizata su mešane sa neredukujućim puferom za uzorkovanje (0,125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, 0.02% bromfenol plavo, pH 6,8) i razdvajani elektroforezom na 10% SDS-akrilamidnom gelu u neredukujućim uslovima. U slučaju analiza MMPs, u gel je dodavan želatin u koncentraciji 1 mg/ml. Za analizu urokinaza gelovi su zatim ispirani sa destilovanom vodom i nanošeni na podlogu sastavljenu od 1% agaroze, 0,5% kazeina, 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8, 1,0 M Tris-HCl, pH 6,8, 10 mM CaCl_2 i 2 μ g/ml plazminogena. Gelovi su inkubirani preko noći na temperaturi od 37°C , u vlažnoj atmosferi. Providne trake na beličastom gelu bile su znak aktivnosti urokinaza.

Radi analize aktivnosti matriks-metaloproteinaza nakon elektroforeze, gelovi su ispirani sa 2,0% Triton X-100, a zatim inkubirani sa puferom za razvijanje (50 mM Tris pH 7,5, 10 mM CaCl_2 u destilovanoj vodi) preko noći u standardnim uslovima. Nakon toga, gelovi su bojeni rastvorom (0,25% Coomassie Blue R, 50% metanol, 10% sirćetna kiselina), a zatim su odbojavani sa 20% metanola i 10% sirćetne kiseline. Providne trake na plavim gelovima bile su znak aktivnosti matriksnih metaloproteinaza.

Intenzitet identifikovanih traka urokinaza i matriksnih metaloproteinaza je analiziran na osnovu specifičnog proteinskog markera. Kvantifikacija dobijenih traka izvršena je denzitometrijskom analizom uz pomoć programa Total Lab v1.11 software (Amersham).

3.8. ANALIZA GENSKE EKSPRESIJE

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

3.8.1. Izolacija RNK

Nakon inkubacije ćelija prema specifičnom eksperimentalnom dizajnu, ćelijama je dodavan Trizol (Invitrogen) reagens u toku 5 min, u cilju njihovog liziranja. Ćelijski lizat je prenošen u tubicu zapremine 1,5 ml (Eppendorf, Nemačka), a potom je dodavano 200 µl hloroforma. Sadržaj u tubicama je snažno mućkan, te onda centrifugiran 15 min na 2-8°C na 12000 x g. Vodena faza je prenošena u novu tubicu u koju je zatim dodavano 500 µl izopropanola, te je sve zajedno centrifugirano 20 min, na 2-8°C na 12000 x g. Supernatanti su odlivani, a talog resuspendovan u 75% etanolu i centrifugiran 5 min, na 2-8°C na 7500 x g. Nakon toga, dobro osušen talog je resuspendovan u 10-15 µl vode tretirane sa dietilpirokarbonatom bez prisutnih nukleaza. Ovako dobijena iRNK je čuvana na -70°C.

3.8.2. Reverzna transkripcija

Ukupna iRNK je procesom reverzne transkripcije prevođena u formu komplementarne (kDNK) korišćenjem komercijalnog kita za reverznu transkripciju *RevertAid™ Hminus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas, Life Science) za RT-PCR sa oligo (dT) kao prajmerima. Prema uputstvu proizvođača, 2 µg iRNK, 1 µl oligo dT (sekvence od nekoliko deoksi-timin nukleotida) prajmera i 6,5 µl H₂O tretirane dietilpirokarbonatom su inkubirani na 65°C 5min, nakon čega je temperatura spuštana na 25°C, i dodavano je: 4 µl pufera za reakciju (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 0,5 µl inhibitora RN-aza (20 jedinica/µl), 2 µl deoksiribonukleotid trifosfata (dNTP) mix (10 mM), i 1µl reverzne transkriptaze (200 U/µl). Ova pripremljena smeša inkubirana je na 42°C 60 min radi sintetisanja komplementarne DNK, a potom 10 min na 72°C.

3.8.3. Reakcija lančanog umnožavanja

Na osnovu dobijene kDNK, uz pomoć komercijalno dostupnih prajmera za željeni gen (**Tabela 4.**), vršena je amplifikacija PCR metodom. Program po kome se vrši umnožavanje obuhvata sledeće faze:

1. Faza inicijacije koja traje 5 min, na 94°C
2. Faza denaturacije koja traje 45 s, na 94°C
3. Faza topljenja koja traje 30 s, na 52°C
4. Faza elongacije koja traje 90 s, 72°C
5. Faza finalne elongacije koja traje 10 min, na 72°C

Temperatura topljenja, kao i broj ciklusa lančanih reakcija je korigovan u zavisnosti od prajmera koji je korišćen i nivoa ekspresije gena. Za svaki uzorak inkubirano je 2 µl kDNK, 12 µl vode bez nukleaza, 10 µl glavne smeše koja sadrži DNK polimerazu, dezoksiribonukleotide, pufer za reakciju i MgCl₂, kao i 1 µl specifičnog prajmera (Invitrogen). Prikazani su ciklusi za odgovarajući program za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) koji je amplifikovan kao kontrola količine kDNK u svakom uzorku.

3.8.4. Elektroforeza i vizuelizacija produkata PCR

Uzorci dobijeni nakon PCR su razdvajani elektroforezom na gelu koji je pripreman sa 1.5% agaroze (Lonza) u Tris acetatnom-EDTA puferu (TAE, Tris Acetat-EDTA Pufer, Serva) na 100 V i 400 mA (Biorad). Uzorci su mešani sa bojom koja se vezuje za DNK (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% bromfenol plavo, 0,03% ksilen cijanol FF, 60% glicerol i 60 mM EDTA. Nakon razdvajanja, gel je izlagan ultraljubičastom svetlu i vizuelizovan u programu (BioDoc Analyze). Na osnovu markera koji u sebi sadrži boju i fragmente u veličini od 100-1000 baznih parova, određivana je pozicija i broj baznih parova dobijenog produkta. Jačina vizuelizovanog signala određivana je denzitometrijskom analizom pomoću programa TotalLab v1.11 software (Amersham).

Tabela 4. Prajmeri korišćeni u RT-PCR-u. F- *forward*, R- *reverse*.

Gen	5'-3' sekvenca	Veličina produkta (bp)	Temperatura topljenja (C°)
GAPDH	F: ACCACAGTCCATGCCATCAC R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA	452	52
HLA-A	F: GACGACACGCAGTTCGTGC R: CATGTCCGCCGCGGTCCAA	331	49
HLA-G	F: GGAAGAGGAGACACGGAACA R: CCTTTTCAATCTGAGCTCTTCTTT	771	47
HLA-DR	F: CGAGTTCTCTATCTGAATCCTG R: GTTCTGCTGCATTGCTTTTGC	644	52
IL-6	F: ATGAACTCCTTCTCCACAAG R: AGAGCCCTCAGGCTGGACTG	626	53
TGF-β	F: GGGACTATCCACCTGCAAGA R: CCTCCTGGCGTAGTAGTCG	203	59
COX2	F: CCTTCCTCCTGTGCCTGATG R: CTGGCCCTCGCTTATGATCT	390	51
IDO-1	F: ATCACCATGGCATATGTGTGGG R: GTGAAACACTTGAAGGGCTTTCTC	239	50
HIF-1	F: CAGAGCAGGAAAAGGAGTCA R: CAGAGCAGGAAAAGGAGTCA	234	52
uPA	F: GCAGGAACCCAGACAACCG R: GACCCAGGTAGACGATGTAG	357	52
MMP2	F: GGCCCTGTCACTCCTGAGAT R: GGCATCCAGGTTATCGGGGA	474	52
E-kadherin	F: GGAAGTCAGTTCAGACTCCAGCC R: AGGCCTTTTGACTGTAATCACACC	290	49
Vimentin	F: AGATGGCCCTTGACATTGAG R: TCTTGCGCTCCTGAAAACT	345	55

3.9. STATISTIČKA ANALIZA REZULTATA

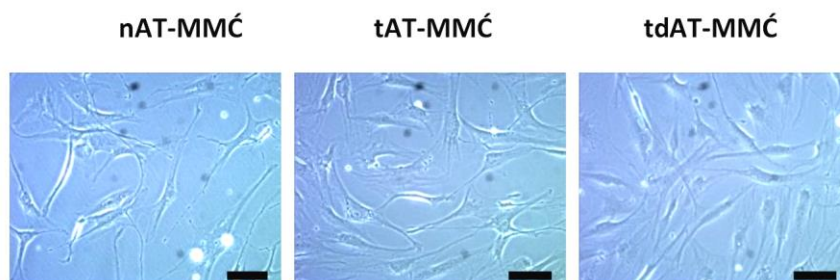
Statistička obrada podataka rađena je u programu GraphPad Prism 5. Korišćen je ANOVA i Studentov test za izračunavanje verovatnoće značajnih razlika između grupa i uzoraka, u kojima su vrednosti za $p < 0,05$ smatrane značajnim.

4. REZULTATI

4.1. MEZENHIMSKE MATIČNE ĆELIJE IZOLOVANE IZ MASNOG TKIVA (AT-MMĆ)

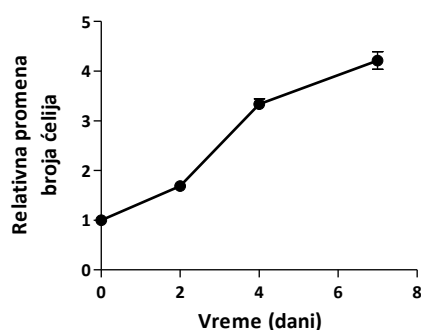
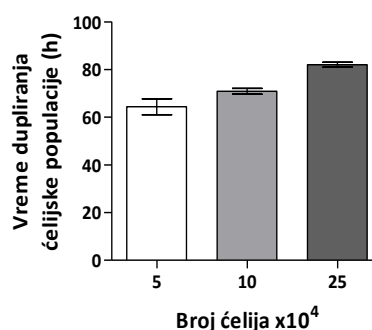
4.1.1. Izolacija i kultivacija mezenhimskih matičnih ćelija masnog tkiva

Mezenhimske matične ćelije uspešno su izolovane iz masnog tkiva kako zdravih osoba, tako i pacijenata koji su bolovali od neke vrste tumora. Približno ista količina masnog tkiva (zapremine 20-30 ml) prikupljana je od svakog donora i svi uzorci na isti način su podvrgnuti tkivnoj digestiji u cilju izolacije MMĆ. U primarnim pasažama, MMĆ su izdvojene od ostalih ćelija na osnovu adherentnosti za plastične posude za kulturu tkiva. Nakon 5 dana kultivacije adherentne ćelije nalik fibroblastima uočene su kod svih uzoraka (**Slika 1.**). Adherentne ćelije su formirale pojedinačne kolonije, da bi se nakon prosečno 14. dana kolonije spajale dostižući 80-90% pokrivenosti površine flaska, dovoljnu za prvu pasažu ćelija. Karakterističnu morfologiju i svojstvo adhezije za plastiku, bez pojave spontane diferencijacije, ćelije su zadržavale i u narednim pasažama.



Slika 1. Morfologija izolovanih AT-MMĆ. Na slici su predstavljene AT-MMĆ izolovane iz masnog tkiva zdravog donora (nAT-MMĆ, *normalne AT-MMĆ*), donora sa oblikom tumora koji nije tumor dojke (tAT-MMĆ, *tumor AT-MMĆ*) i donora koji je imao tumor dojke (tdAT-MMĆ, *tumor dojke AT-MMĆ*). Prikazane su reprezentativne slike. Vrednost razmera je 20 μ m.

Početni eksperimenti obuhvatali su određivanje proliferativnog kapaciteta izolovanih AT-MMĆ. Na osnovu rezultata dobijenih u kratkotrajnim kulturama (**Grafikon 1A.**) utvrđeno je da se broj ćelija prosečno povećavao do četiri puta sedmog dana od zasejavanja ćelija.

A.**B.**

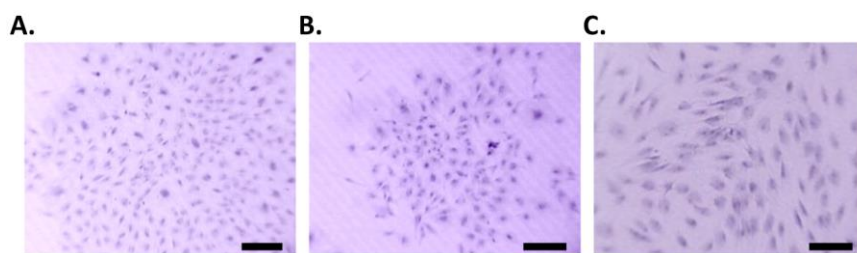
Grafikon 1. A. Kratkotrajna proliferacija AT-MMC. Ćelije su zasejavane u koncentraciji 4×10^4 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 6 otvora u standardnom medijumu (SM) za kultivaciju. Ćelije su brojane nakon 2, 4 i 7 dana inkubacije. Predstavljena je relativna promena broja ćelija u odnosu na početni broj ćelija koji je zasejan, kome je dodeljena vrednost 1. **B. Vreme dupliranja ćelijske populacije.** Ćelije su zasejavane u koncentracijama 5×10^4 , 10×10^4 i 25×10^4 ćelija /otvoru ploče za kulturu tkiva sa 6 otvora u SM za kultivaciju. U toku 24 dana, svaki put nakon dostizanja konfluentnosti, ćelije su brojane. PDT izražen u satima (h), je računato po formuli datoj u Materijalu i metodama. Predstavljenje su srednje vrednosti $\pm$ SEM dobijene nakon tri nezavisna eksperimenta raĉena u duplikatu.

U dodatnim eksperimentima u dugotrajnim kulturama do 24 dana potvrĉen je kapacitet za ekspanziju AT-MMC i odreĉeno vreme dupliranja ćelijske populacije (PDT) za tri različite početne koncentracije ćelija (5×10^4 , 10×10^4 i 25×10^4 ćelija/otvoru). Dobijeni rezultati (**Grafikon 1 B.**) su pokazali da PDT zavisi od početne koncentracije ćelija u kulturi, jer je vreme potrebno za dupliranje populacije bilo oko 80 h kada su ćelije zasejane u većoj koncentraciji, dok su ćelije zasejane pri manjoj koncentraciji proliferisale nešto brže i njihovo PDT je bilo oko 68 h.

4.1.2. Karakterizacija mezenhimskih matičnih ćelija masnog tkiva

4.1.2.1. Klonogeni kapacitet AT-MMĆ

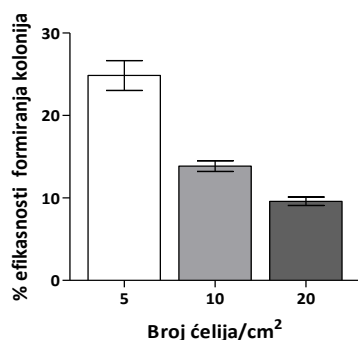
U cilju određivanja klonogenog potencijala izolovanih ćelija MMĆ, korišćenjem CFU-F testa potvrđena je sposobnost formiranja kolonija sa tipičnom morfologijom nalik fibroblastima kod AT-MMĆ iz svih uzoraka (**Slika 2.**), pri čemu je broj kolonija bio obrnuto srazmeran broju zasaćenih ćelija (**Grafikon 2 A.**)



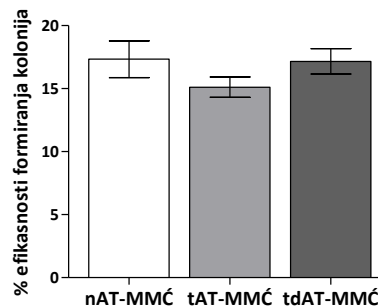
Slika 2. Izgled formiranih CFU-F kolonija kod A. nAT-MMĆ; B. tAT-MMĆ i C. tdAT-MMĆ. Prikazane su reprezentativne slike. Vrednost razmera je 40 μm .

Kapacitet formiranja CFU-F kolonija bio je sličan za sve ispitivane populacije AT-MMĆ bez obzira na različite izvore početnog masnog tkiva (**Grafikon 2 B.**).

A.



B.

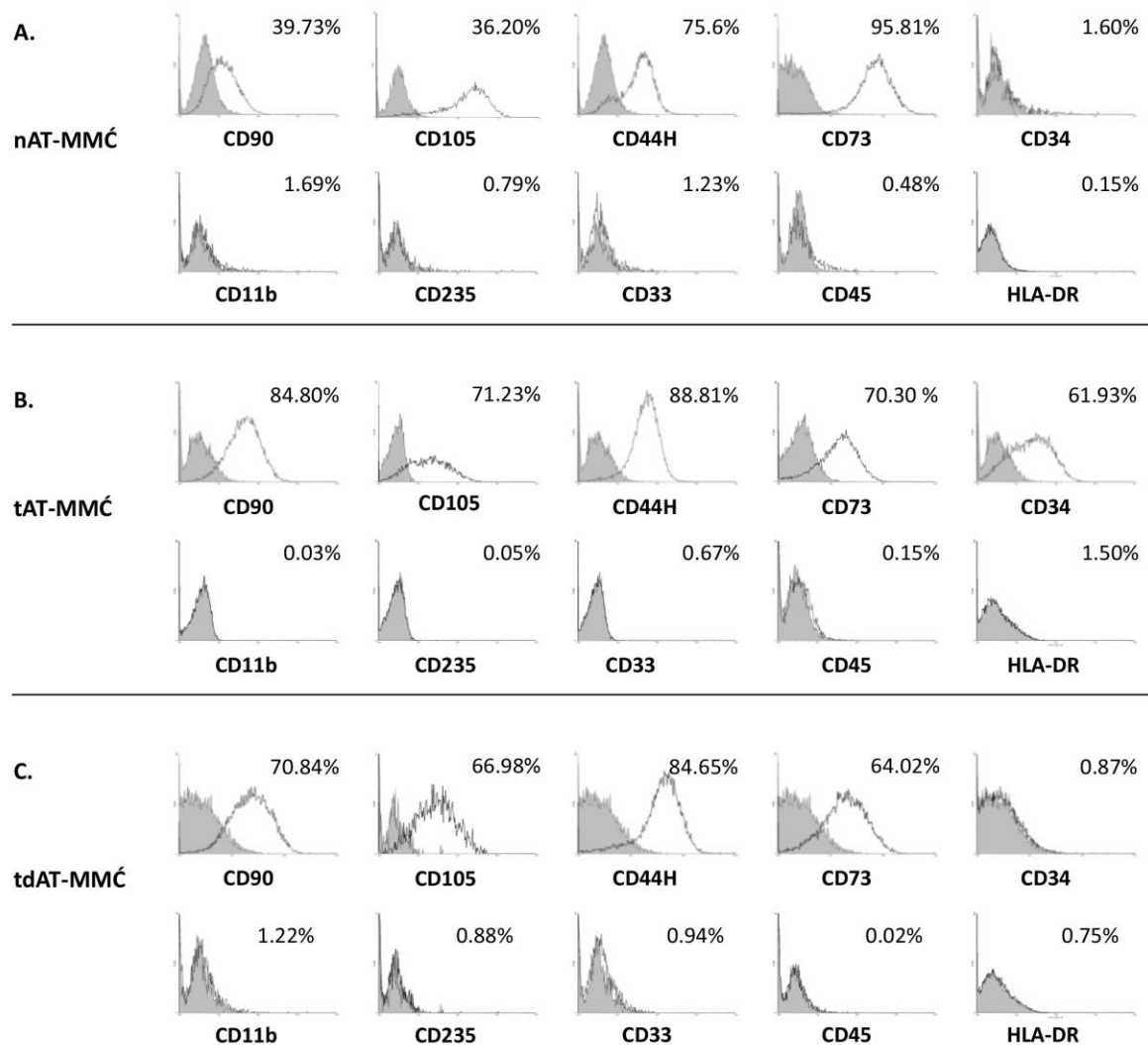


Grafikon 2. Efikasnost formiranja kolonija AT-MMČ. AT-MMČ su zasejavane u **A.** gustini (5, 10 ili 20 ćelija/cm²) i **B.** 10 ćelija/cm² u standardnom medijumu (SM) u trajanju od 14 dana, nakon čega su CFU-F obojene Crystal violet bojom. Efikasnost formiranja CFU-F kolonija definisana je kao odnos broja kolonija i broja zasejanih ćelija. Predstavljenje su srednje vrednosti $\pm$ SEM dobijene nakon tri nezavisna eksperimenta računa u duplikatu.

4.1.2.2. Imunofenotip AT-MMČ

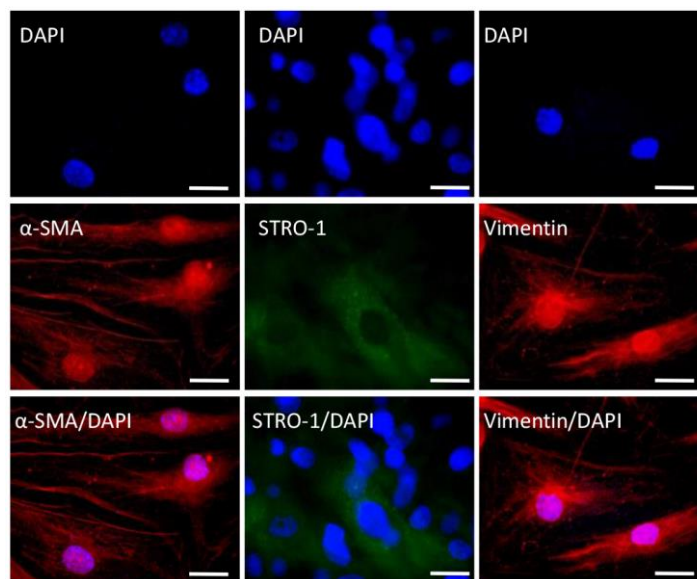
Imunofenotipska karakterizacija mezenhimalnih matičnih ćelija je jedan od tri minimalna kriterijuma predložena od strane Društva za ćelijsku terapiju u cilju definisanja ovih ćelija izolovanih iz različitih izvora u različitim laboratorijama.

Protočnom citometrijom ispitivan je imunofenotip svih izolovanih AT-MMČ i potvrđena je pozitivna ekspresija CD90, CD105, CD44H i CD73 površinskih markera karakterističnih za mezenhimske matične ćelije. U isto vreme ćelije nisu ispoljavale CD markere karakteristične za imunske i hematopoetske ćelije: CD33, CD45, CD11b, CD235, kao i HLA-DR. Uočeno je da među različitim AT-MMČ postoji velika varijabilnost u ekspresiji hematopoetskog markera CD34. Na **Slici 3.** je prikazano da AT-MMČ izolovane iz različitih izvora imaju sličan imunofenotip.



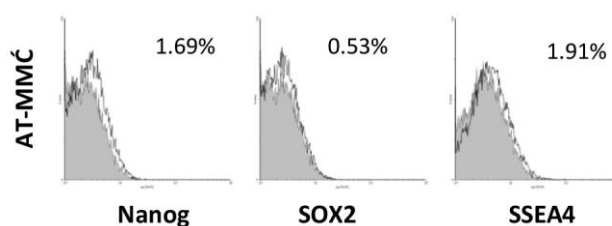
Slika 3. Imunofenotip određen protočnom citometrijom kod A. nAT-MMĆ; B. tAT-MMĆ i C. tdAT-MMĆ. Predstavljene su reprezentativni histogrami ekspresije molekula (neobojeni deo) za tri tipa AT-MMĆ u poređenju sa odgovarajućom izotipskom kontrolom (sivo obojeno).

Pored ekspresije površinskih markera, kao dodatna potvrda mezenhimskog karaktera izolovanih AT-MMĆ vršena su i imunocitohemijska bojenja unutarćelijskih proteina karakterističnih za mezenhimске matične ćelije, a rezultati su pokazali pozitivnu ekspresiju mezenhimskih ćelijskih markera α -SMA, STRO-1 i Vimentin od strane svih ispitivanih AT-MMĆ (**Slika 4.**).



Slika 4. Ekspresija α -SMA, STRO-1 i Vimentin kod AT-MMĆ. Indirektno imunofluorescentno bojenje sa mišji anti- α -SMA, anti-STRO-1 i anti-Vimentin antitelima, uz odgovarajuća sekundarna antitela anti-mišje- TRITC (crveno) i anti-mišje-FITC (zeleno). Nukleusi su obojeni plavo (DAPI). Prikazane su reprezentativne fotografije sa epifluorescentnog mikroskopa za tAT-MMĆ. Vrednost razmera je 40 μ m.

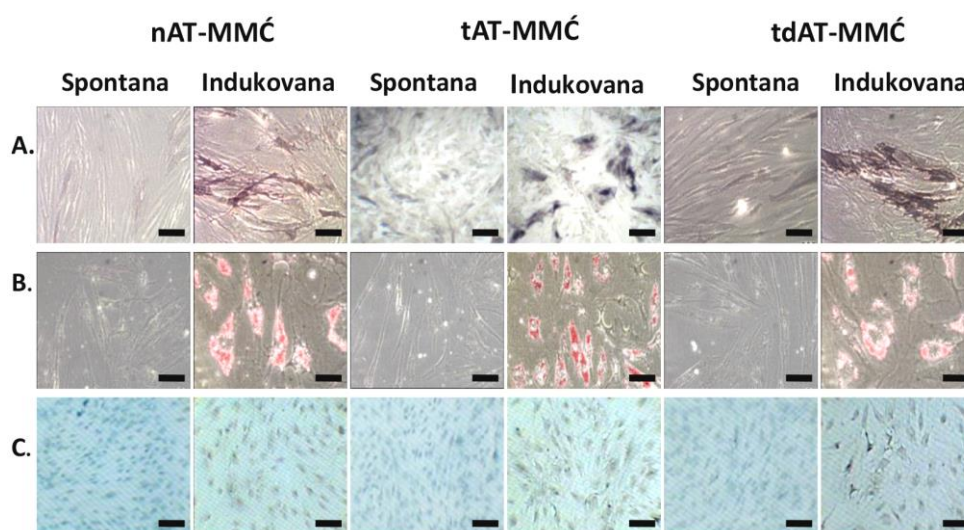
Takođe, protočnom citometrijom određen je i nivo ekspresije embrionalnih markera, unutarćelijskih, Nanog i SOX2, i membranskog SSEA4, a rezultati su pokazali da sve izolovane populacije AT-MMĆ nisu ekspimirale ove markere (**Slika 5.**).



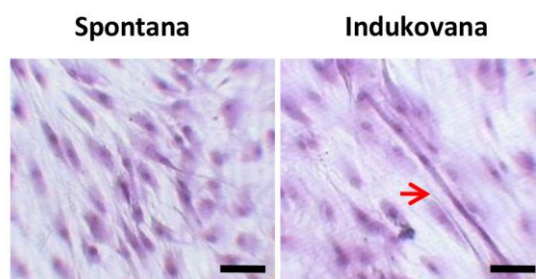
Slika 5. Ekspresija markera embrionalnih matičnih ćelija kod tAT-MMĆ. Prikazani su reprezentativni histogrami ekspresije molekula (neobojeni deo) u poređenju sa odgovarajućom izotipskom kontrolom (sivo obojeno) za tAT-MMĆ.

4.1.2.3. Sposobnost diferencijacije AT-MMĆ

Kao funkcionalni test potvrde identiteta mezenhimskih matičnih ćelija analiziran je multipotenti potencijal diferencijacije ćelija izolovanih iz masnog tkiva. Kultivacijom AT-MMĆ u specifičnim medijumima, i kasnijim bojenjem odgovarajućim bojama za detekciju aktivnosti alkalne fosfataze, deponovanih lipidnih kapi i glikozaminoglikana, potvrđeno je da AT-MMĆ izolovane iz svih uzoraka masnog tkiva poseduju potencijal osteogene, adipogene, hondrogene diferencijacije (**Slika 6.**), a pokazana je i sposobnost miogene diferencijacije formiranjem izduženih višejedarnih ćelija, miotuba (**Slika 7.**).



Slika 6. Diferencijacija nAT-MMĆ, tAT-MMĆ i tdAT-MMĆ u tri mezodermalna tkiva: **A.** Osteogena diferencijacija potvrđena je bojenjem enzima alkalne fosfataze; **B.** Masne kapljice prisutne unutar ćelija bojene su Oil Red O bojom, **C.** Proteoglikani koji nastaju usled hondrogeneze bojani sa Safraninom. Prikazane su reprezentativne slike. Vrednost razmera je 20 μ m.

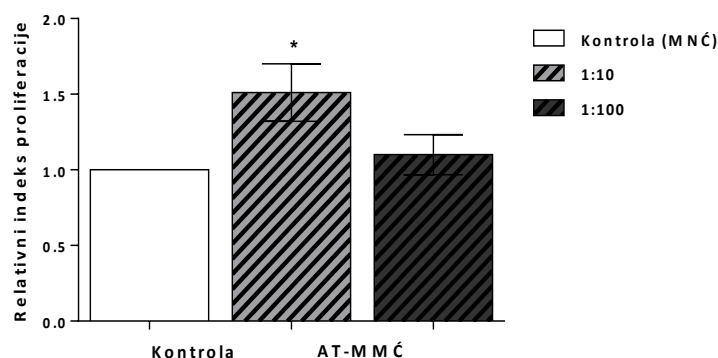


Slika 7. Miogena diferencijacija tAT-MMĆ. Nakon bojenja kristal-violetom fotografisane su višejedarne ćelije (obeleženo crvenom strelicom). Prikazane su reprezentativne slike. Vrednost razmera je 20 μ m.

4.2. IMUNOMODULATORNE OSOBINE AT-MMĆ

4.2.1. Uticaj AT-MMĆ na spontanu, mitogenom- i aloantigenom-stimulisanu proliferaciju MNĆ

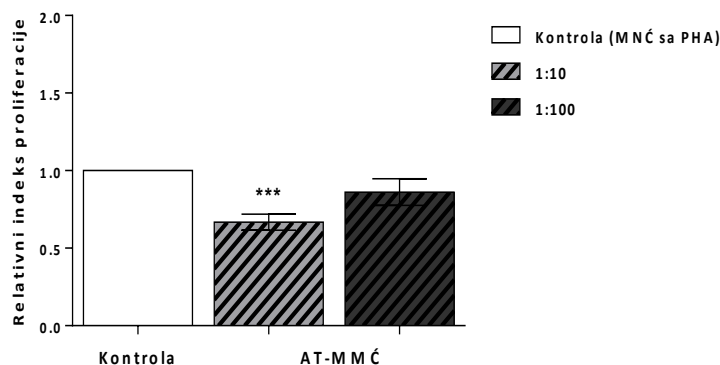
U cilju analize imunomodulatorne sposobnosti AT-MMĆ određivan je uticaj ovih ćelija na spontanu, kao i mitogenom i aloantigenom stimulisanu proliferaciju MNĆ. U početnim eksperimentima ispitivano je da li AT-MMĆ mogu delovati kao antigen-prezentujuće ćelije. Kao što je pokazano u **Grafikonu 3.**, efekat AT-MMĆ u ovom sistemu bio je dvojak u zavisnosti od ćelijske koncentracije primenjene u testu, s obzirom da su primenjene u višoj koncentraciji AT-MMĆ (odnos 1:10 AT-MMĆ:MNĆ), stimulisale proliferaciju MNĆ, dok u nižoj koncentraciji (u odnosu 1:100 AT-MMĆ:MNĆ) nisu dovele do promene u spontanoj proliferaciji MNĆ.



Grafikon 3. Uticaj AT-MMĆ na spontanu proliferaciju MNĆ. Prethodno kultivisane u SM, AT-MMĆ su zasejavane u koncentracijama 10^3 i 10^4 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 96 otvora i tretirane sa Mitomicinom u toku 30 min. Nakon toga su dodavani alogene MNĆ u koncentraciji 10^5 ćelija/otvoru i ćelije su inkubirane 3 dana. Proliferacija MNĆ je merena metodom ugradnje BrdU i predstavljena kao relativni indeks proliferacije (odnos vrednosti proliferacija eksperimentalnog uzorka i proliferacije nestimulisanih MNĆ čija je vrednost izražena kao 1 (kontrola). Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za tri nezavisna eksperimenta uračena u triplicatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$.

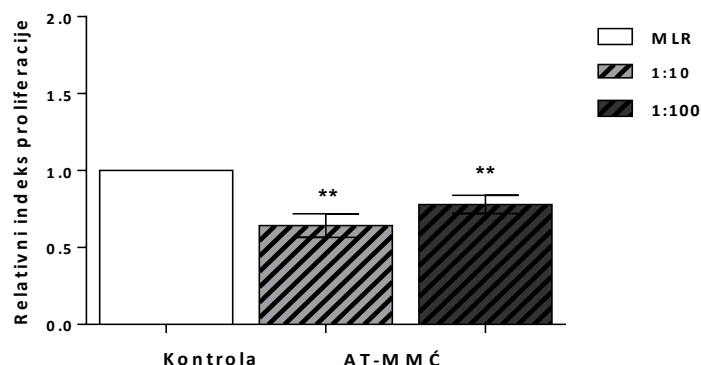
Ispitivanje uticaja AT-MMĆ na mitogenom stimulisanu proliferaciju MNĆ je pokazalo da AT-MMĆ inhibiraju proliferaciju MNĆ u odgovoru na PHA, na dozno-zavisan način, pri čemu su AT-MMĆ primenjene u višoj koncentraciji (odnos 1:10 AT-

MMĆ:MNC) dovele do statistički značajnog smanjenja mitogenom-stimulisanu proliferaciju MNC (**Grafikon 4.**).



Grafikon 4. Uticaj AT-MMĆ na mitogenom stimulisanu proliferaciju MNC. Prethodno kultivisane u SM, AT-MMĆ su zasejavane u koncentracijama 10^3 i 10^4 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 96 otvora i tretirane sa Mitomicinom u toku 30 min. Nakon toga su dodavani alogeni MNC u koncentraciji 10^5 ćelija/otvoru, stimulisani sa 2,5 $\mu\text{g/ml}$ PHA i ćelije su inkubirane 3 dana. Proliferacija MNC je merena metodom ugradnje BrdU i predstavljena kao relativni indeks proliferacije (odnos vrednosti proliferacija eksperimentalnog uzorka i proliferacije PHA-stimulisanih MNC čija je vrednost izražena kao 1 (kontrola). Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 6 nezavisnih eksperimenata uračenih u triplikatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: *** $p < 0,001$.

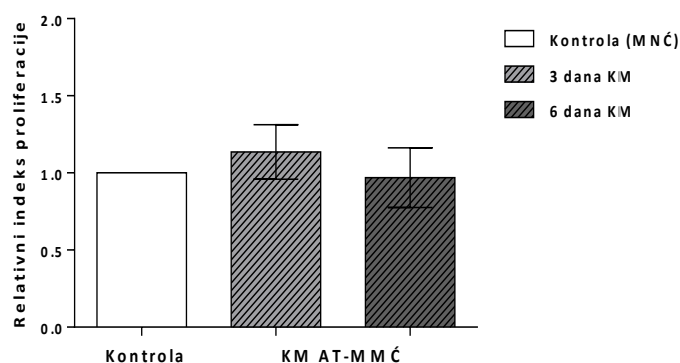
Određivanje efekta AT-MMĆ u dvosmernoj MLR proliferaciji ukazalo je na izraženu sposobnost ispitivanih AT-MMĆ da inhibiraju aloantigenom-stimulisanu proliferaciju MNC (**Grafikon 5.**), s obzirom da su AT-MMĆ u obe testirane koncentracije, uzrokovala značajno smanjenje proliferacije humanih MNC.



Grafikon 5. Uticaj AT-MMĆ na aloantigenom stimulisanu proliferaciju MNĆ. Prethodno kultivisane u SM, AT-MMĆ su zasejavane u koncentracijama 10^3 i 10^4 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 96 otvora i tretirane sa Mitomicinom u toku 30 min. Nakon toga su dodavani alogeni MNĆ dva donora u koncentraciji po 10^5 ćelija/otvoru, i ćelije su inkubirane 6 dana. Proliferacija MNĆ je merena metodom ugradnje BrdU i predstavljena kao relativni indeks proliferacije (odnos vrednosti proliferacije eksperimentalnog uzorka i proliferacije aloantigenom-stimulisanih MNĆ čija je vrednost izražena kao 1 (kontrola). Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 6 nezavisnih eksperimenata uračenih u triplikatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: ** $p < 0,01$.

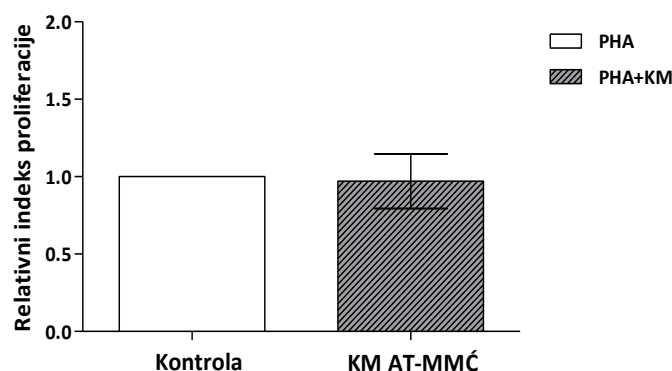
4.2.2. Uticaj kondicioniranog medijuma AT-MMĆ na spontanu, mitogenom- i aloantigenom-stimulisanu proliferaciju MNĆ

U cilju određivanja da li su imunomodulatorne sposobnosti AT-MMĆ posredovane direktnim ćelijskim kontaktima ili se ostvaruju preko delovanja bioaktivnih molekula koje AT-MMĆ proizvode, u sledećim eksperimentima određivan je uticaj kondicioniranog medijuma (KM) AT-MMĆ na spontanu, mitogenom- i aloantigenom-stimulisanu proliferaciju MNĆ. Određivanje uticaja KM AT-MMĆ na spontanu proliferaciju MNĆ pokazalo je da KM AT-MMĆ ne dovodi do značajnih promena u spontanoj proliferaciji MNĆ kako posle 3, tako ni posle 6 dana kultivacije ćelija (**Grafikon 6.**).

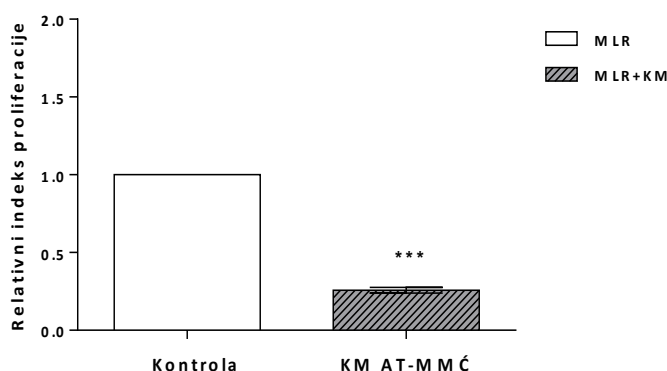


Grafikon 6. Uticaj kondicioniranog medijuma AT-MMČ na spontanu proliferaciju MNC. Mononuklearne ćelije periferne krvi su zasejavane u koncentraciju 10^5 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 96 otvora i inkubirane u SM u koji je dodato 20% KM u toku 3, odnosno 6 dana. Proliferacija je merena MTT testom i predstavljena predstavljena kao relativni indeks proliferacije (odnos vrednosti proliferacija eksperimentalnog uzorka i proliferacije nestimulisanih MNC čija je vrednost izražena kao 1 (kontrola). Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta uračena u triplikatu.

U daljim eksperimentima pokazan je sličan efekat KM AT-MMČ i na mitogenom (PHA)-stimulisanu proliferaciju MNC (**Grafikon 7.**). S druge strane, u dvosmernoj MLR, KM AT-MMČ je značajno inhibirao aloantigenom-stimulisanu proliferaciju MNC (**Grafikon 8.**).



Grafikon 7. Uticaj kondicioniranog medijuma AT-MMĆ na mitogenom stimulisanu proliferaciju MNC. Mononuklearne ćelije periferne krvi su zasejavane u koncentraciju 10^5 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 96 otvora i inkubirane u SM u koji je dodato 20% KM, u toku 3 dana u prisustvu 2,5 μ g/ml PHA. Proliferacija je merena MTT testom i predstavljena kao relativni indeks proliferacije (odnos vrednosti proliferacija eksperimentalnog uzorka i proliferacije mitogenom-stimulisanih MNC čija je vrednost izražena kao 1 (kontrola). Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta uračena u triplikatu.

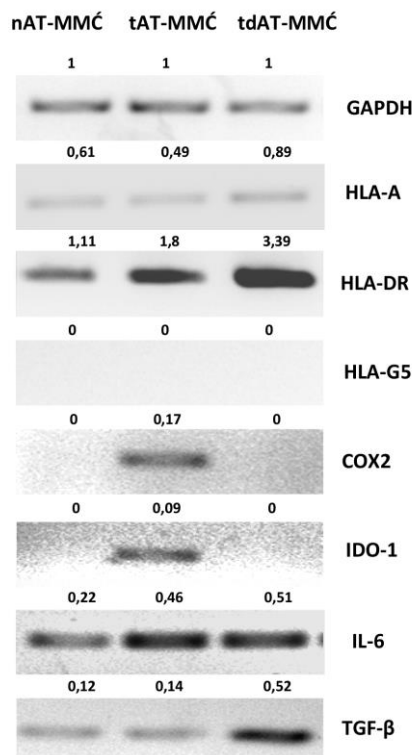


Grafikon 8. Uticaj kondicioniranog medijuma AT-MMĆ na proliferaciju MNC stimulanu alogenom. Mononuklearne ćelije periferne krvi dva donora su zasejavane u koncentraciji po 10^5 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 96 otvora i inkubirane u SM u koji je dodato 20% KM, u toku 6 dana. Proliferacija je merena MTT testom i predstavljena kao relativni indeks proliferacije (odnos vrednosti proliferacija eksperimentalnog uzorka i proliferacije aloantigenom-stimulisanih MNC čija je vrednost izražena kao 1 (kontrola). Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta uračena u triplikatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: *** $p < 0,001$.

4.2.3. Analiza genske ekspresije molekula uključenih u modulatorni potencijal AT-MMĆ

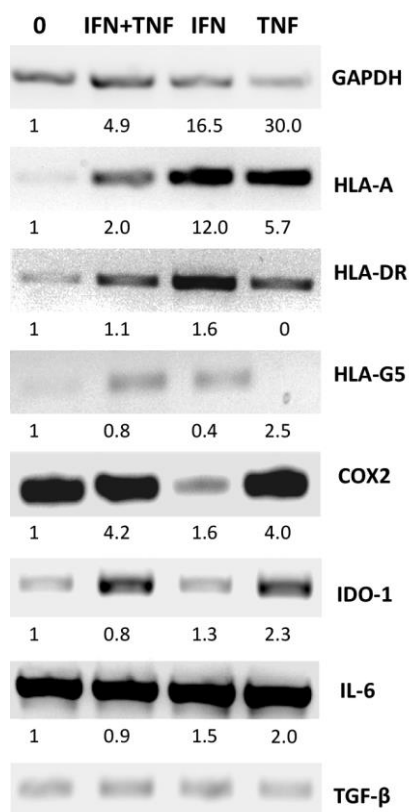
S obzirom na ispoljena imunomodulatorna svojstva AT-MMĆ, sledeći cilj je bio određivanje genske ekspresije molekula relevantnih za specifične funkcije mezenhimskih matičnih ćelija, poput molekula glavnog histokompatibilnog kompleksa, transkripcionih faktora ili različitih parakrinih medijatora potencijalno uključenih u modulatorni potencijal AT-MMĆ.

Nivo konstitutivne ekspresije iRNK molekula koji imaju važnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora (HLA-A, HLA-DR, HLA-G5, COX2, IDO-1, IL-6, TGF- β) utvrđen je RT-PCR analizom. Denzitometrijskom analizom dobijenih rezultata pokazano je da AT-MMĆ, bez obzira na poreklo, imaju sličnu konstitutivnu gensku ekspresiju HLA-A, HLA-DR, IL-6, TGF- β . Takođe, utvrđeno je i da ispitivane populacije AT-MMĆ konstitutivno ne eksprimiraju iRNK za HLA-G5, dok je transkript za iRNK COX2 i IDO-1 molekula detektovan samo kod tAT-MMĆ (**Slika 8.**).



Slika 8. Konstitutivna genska ekspresija molekula uključenih u modulatorni potencijal u nAT-MMĆ, tAT-MMĆ i tdAT-MMĆ. Čelije su zasejavane u SM i nakon dostizanja 100% konfluentnosti, izolovana je iRNK. GAPDH predstavlja kontrolu za približno istu količinu komplementarne DNK u svim uzorcima. Dobijene vrednosti iznad traka su izražene kao odnos denzitometrijskih vrednosti eksperimentalnog uzorka i kontrole (GAPDH) čija je vrednost označena kao 1. Prikazan je reperezentativni gel za svaki gen od ukupno 2 eksperimenta.

Pored konstitutivne ekspresije, nivoi iRNK molekula HLA-A, HLA-DR, HLA-G5, COX2, IDO-1, IL-6, TGF-β, određivani su i nakon kultivisanja AT-MMĆ sa IFN-γ i/ili TNF-α, dva proinflamatorna citokina koji mogu značajno da utiču na imunski status AT-MMĆ upravo modulišući ekspresiju ovih molekula. Upoređivanje genske ekspresije molekula HLA-A, HLA-DR, kao i HLA-G5 nakon tretmana AT-MMĆ sa proinflamatornim citokinima IFN-γ i/ili TNF-α, pokazalo je da IFN-γ i/ili TNF-α povećavaju ekspresiju iRNK za sve ispitivane molekule glavnog histokompatibilnog kompleksa (**Slika 9.**). Pri tome, u uslovima kada su korišćeni pojedinačno u kulturama, IFN-γ je uzrokovao povećanja ekspresije iRNK za HLA-DR i HLA-G5, dok je uticaj TNF-α bio je najizraženiji na povećanje ekspresije HLA-A. U slučaju inkubacije ćelija sa kombinacijom ova dva citokina nije zapažena povećana ekspresija HLA molekula.



Slika 9. Konstitutivna i proinflammatorym citokinima indukovana genska ekspresija molekula uključenih u modulatorni potencijal tAT-MMĆ. AT-MMĆ su kultivisane u SM i tretirane sa 50 ng/ml IFN- γ i/ili 20 ng/ml TNF- α 7 dana. GAPDH predstavlja kontrolu za približno istu količinu komplementarne DNK u svim uzorcima. Dobijene vrednosti iznad traka su izražene kao odnos denzitometrijskih vrednosti eksperimentalnog uzorka i GAPDH, koje su su izražene u odnosu na kontrolu (0) čija je vrednost označena kao 1. Prikazan je reperezentativni gel za svaki gen od ukupno 2 eksperimenta.

Efekat delovanja IFN- γ i TNF- α , pojedinačno ili u kombinaciji, na AT-MMĆ je takođe uzrokovao i različitu gensku ekspresiju imunosupresorskih molekula COX2, IDO-1, IL-6 i TGF- β . Sam TNF- α je imao izraženiju ulogu u povećanju ekspresije iRNK za sva četiri ispitivana molekula, u odnosu na pojednačni efekat IFN- γ , koji je uzrokovao samo blagu stimulaciju ekspresije iRNK za IDO-1, IL-6 i TGF- β , dok je u isto vreme indukovao smanjenje ekspresije transkripta za COX2. Istovremeno prisustvo IFN- γ i TNF- α u kulturama uzrokovalo je povećanje ekspresije iRNK samo za IDO-1 molekul. (Slika 9.).

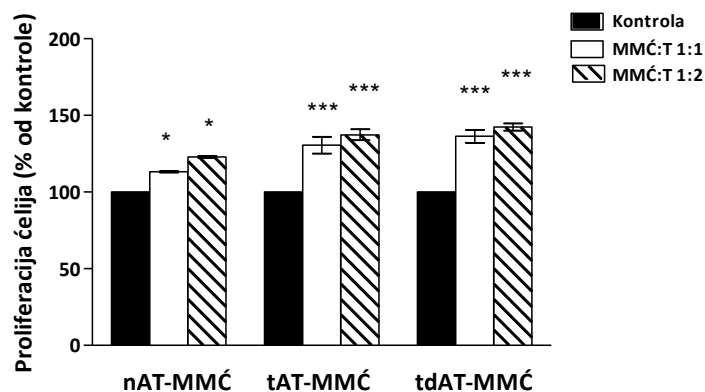
4.3. INTERAKCIJE AT-MMĆ SA TUMORSKIM ĆELIJAMA

U cilju izučavanja efekata i uloge AT-MMĆ u tumorskoj mikrosredini, ispitivani su uticaji AT-MMĆ, izolovanih iz masnog tkiva zdravih osoba i pacijenata sa malignitetima, na različite funkcije MCF-7 ćelija, tumorske linije humanog adenokarcinoma dojke, kao i na ekspresiju proteina i gena relevantnih za rast i invazivnost tumorskih ćelija. Ispitivane su interakcije AT-MMĆ sa MCF-7 ćelijama ostvarene meĉuĉelijskim kontaktima, ili preko produkcije solubilnih molekula, i to kako u normalnim uslovima, tako i u uslovima proinflamatorne mikrosredine, odnosno u prisustvu visokog nivoa proinflamatornih citokina, poput IFN- γ i TNF- α .

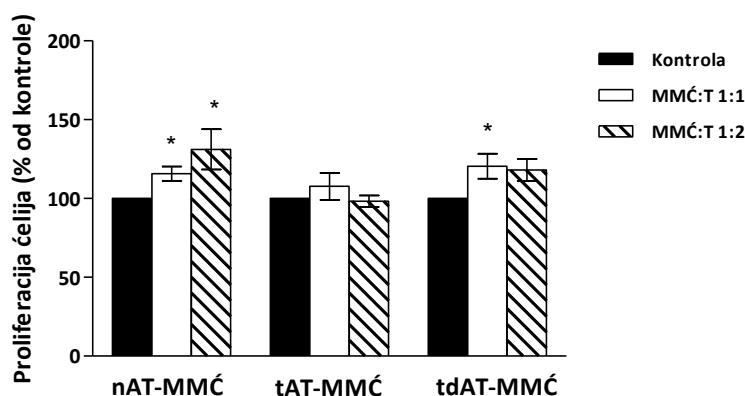
4.3.1. Uticaj AT-MMĆ i njihovih kondicioniranih medijuma na proliferaciju MCF-7 tumorskih ćelija

Da bi se utvrdio uticaj AT-MMĆ na proliferaciju tumorskih ćelija, AT-MMĆ (nAT-MMĆ, tAT-MMĆ i tdAT-MMĆ) su ko-kultivisane sa MCF-7 ćelijama u odnosima 1:1 i 1:2. Nakon 24 h inkubacije, pokazano je da u uslovima direktnih ćelijskih kontakata, sva tri tipa AT-MMĆ uzrokuju statistiĉki znaĉajno povećanje proliferacije MCF-7 ćelija (**Grafikon 9A.**). Nakon 48h inkubacije, ovo povećanje proliferacije tumorskih ćelija nije bilo tako izraĉeno, s obzirom da su statistiĉki znaĉajne razlike uoĉene samo u pojedinim ko-kulturama nAT-MMĆ i tdAT-MMĆ sa MCF-7 ćelijama (**Grafikon 9B.**).

A.



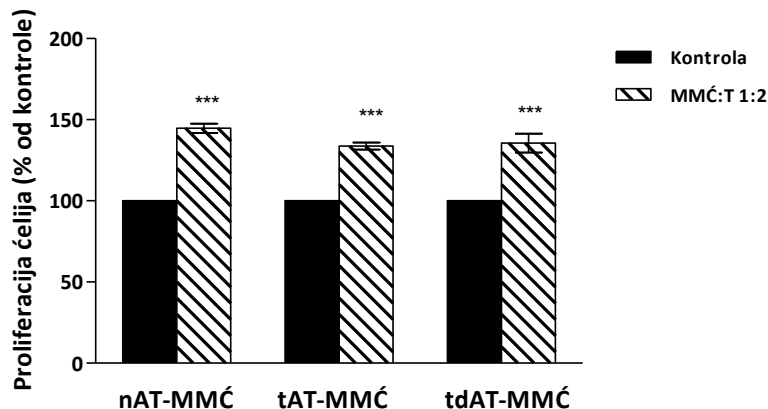
B.



Grafikon 9. Uticaj AT-MMĆ na proliferaciju MCF-7 ćelija u uslovima direktnih ćelijskih kontakata. AT-MMĆ su zasejavane u koncentraciji 5×10^3 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 96 otvora u SM. Nakon 24h, ćelije su inaktivisane sa Mitomicinom C, a zatim su dodavane MCF-7 ćelije u koncentraciji 5×10^3 i 10^4 ćelija po otvoru. Ćelije su inkubirane **A.** 24h i **B.** 48h. Proliferacija je merena MTT testom i predstavljena odnosom vrednosti proliferacija eksperimentalnog uzorka i vrednosti proliferacije samostalno kultivisanih MCF-7 ćelija čija je proliferacija izražena kao 100% (kontrola). Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta uračena u triplikatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

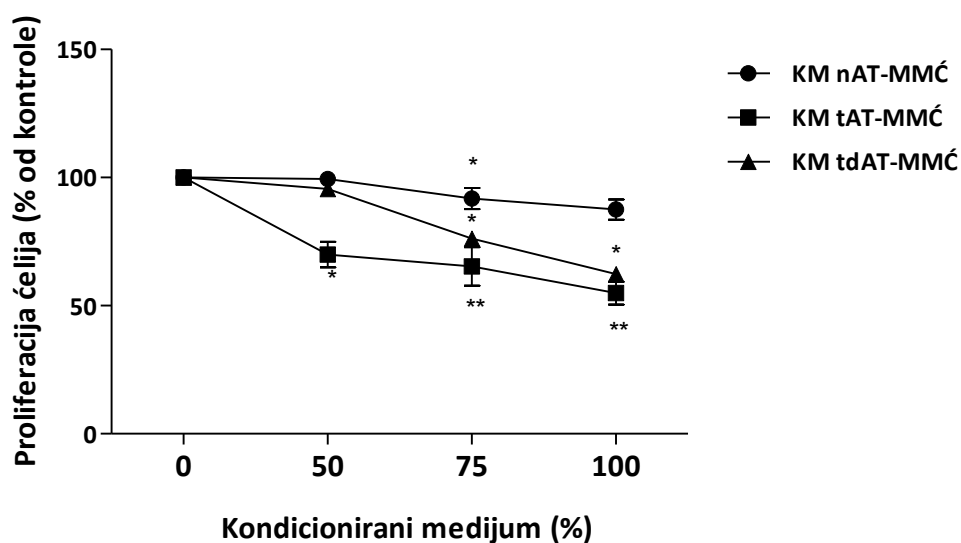
Kako bi se ispitao efekat AT-MMĆ na proliferaciju tumorskih ćelija, u uslovima kada dve ćelijske populacije nisu u direktnom mećućelijskom kontaktu, ćelije su prvo

kultivisane fizički razdvojene u „*transwell*“ sistemu. Nakon 48h inkubacije, pokazano je da, i u ovim uslovima kultivacije, dolazi do statistički značajnog povećanja proliferacije tumorskih ćelija (**Grafikon 10.**).



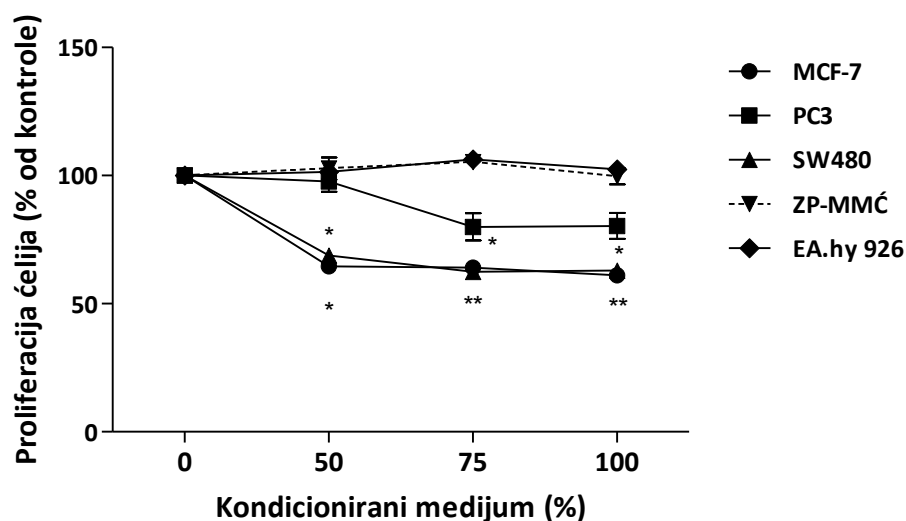
Grafikon 10. Uticaj AT-MMČ na proliferaciju MCF-7 ćelija u “*transwell*” sistemu. MCF-7 ćelije su zasejavane u koncentraciji 1×10^4 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 24 otvora u SM, nakon čega su na otvore postavljani inserti veličine pore 0,45 μm (Milipore, Švajcarska) i na njega su zasejavane AT-MMČ u koncentraciji 5×10^3 ćelija/insertu. Ćelije su inkubirane u SM u standardnim uslovima u toku 48h. Proliferacija je merena MTT testom i predstavljena odnosom vrednosti proliferacija eksperimentalnog uzorka i vrednosti proliferacije samostalno kultivisanih MCF-7 ćelija čija je proliferacija izražena kao 100% (kontrola). Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 2 nezavisna eksperimenta uračena u triplikatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: *** $p < 0,001$.

S druge strane, kondicionirani medijumi dobijeni prikupljanjem supernatanta konfluentnih ćelija AT-MMČ (nakon 48h inkubacije) izolovanih iz različitih donora ispoljili su dozno zavistan antiproliferativni efekat primenjeni u različitim koncentracijama (50, 75 i 100%), pri čemu je najveći efekat ostvaren kad su tumorske ćelije gajene u prisustvu 100% KM. Najizraženiji antiproliferativni efekat detektovan je sa KM dobijenim od tAT-MMČ, dok je najmanji efekat imao KM od zdravog donora nAT-MMČ (**Grafik 11**).



Grafikon 11. Uticaj kondicioniranog medijuma (48 h) AT-MMĆ na proliferaciju MCF-7 ćelija. Tumorske ćelije su zasejane u koncentraciji 5×10^3 ćelija/otvoru ploče sa 96 otvora u SM i inkubirane su 24h da bi adherirale. Nakon toga, MCF-7 ćelijama je dodavan KM AT-MMĆ u koncentracijama 50, 75 i 100% i ćelije su kultivisane naredna 24 h. Proliferacija je merena MTT testom i predstavljena odnosom vrednosti proliferacija eksperimentalnog uzorka i vrednosti proliferacije MCF-7 ćelija inkubiranih samo u SM čija je proliferacija izražena kao 100% (kontrola=0). Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta uračuna u triplikatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

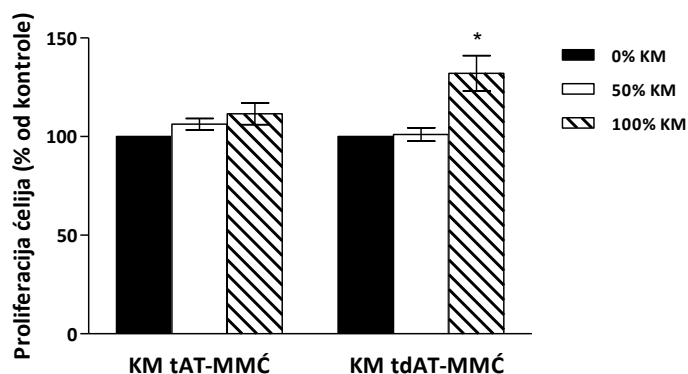
Kako bismo potvrdili antiproliferativni efekat KM tAT-MMĆ i razgraničili ga od potencijalno citotoksičnog efekta na same ćelije, ispitivali smo uticaj ovog KM-48h i na proliferaciju drugih tipova tumorskih ćelijskih linija (PC3 i SW480), kao i na proliferaciju normalne endotelske ćelijske linije EA.hy 926 i primarnih humanih mezenhimskih matičnih ćelija izolovanih iz zubne pulpe (ZP-MMĆ) (**Grafikon 12.**). Rezultati su pokazali da je KM tAT-MMĆ ispoljio značajan antiproliferativni efekat na svim testiranim tumorskim ćelijskim linijama (MCF-7, PC3 i SW480), iako je ovaj efekat bio nešto manje izražen kod PC3 ćelijske linije kancera prostate. S druge strane, KM tAT-MMĆ nije značajno menjao proliferaciju kako EA.hy 926, tako i ZP-MMĆ ćelija, što ukazuje da ispitivani kondicionirani medijum nije ispoljio nespecifično citotoksično dejstvo, već je njegov efekat zavisio od tipa ćelija na koje deluje.



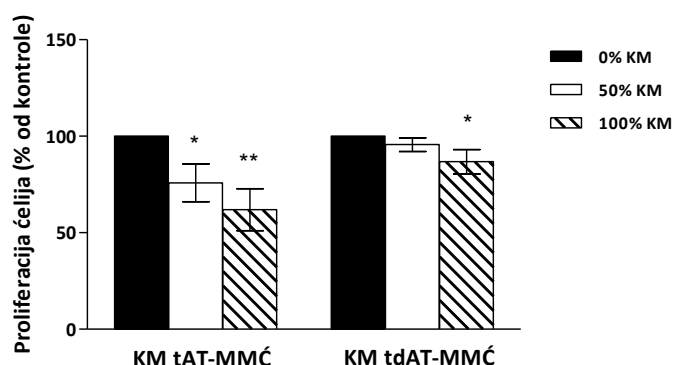
Grafikon 12. Uticaj kondicioniranog medijuma (48 h) tAT-MMČ na proliferaciju MCF-7, PC3, SW480, ZP-MMČ i E.A.hy 926 ćelija. Ispitivane ćelije su zasejavane u koncentraciji 5×10^3 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 96 otvora u SM i inkubirane 24h da bi adherirale. Nakon toga im je dodavan KM tAT-MMČ u koncentracijama 50, 75 i 100% i ćelije su kultivisane naredna 24h. Proliferacija je merena MTT testom i predstavljena odnosom vrednosti proliferacija eksperimentalnog uzorka i vrednosti proliferacije odgovarajućih ćelija inkubiranih samo u SM čija je proliferacija izražena kao 100% (kontrola=0). Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta uračena u triplikatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Kako i prethodno opisani efekti direktnih ćelijskih kontakata AT-MMČ i MCF-7 ćelija na stepen proliferacije tumorskih ćelija (koji se razlikuje i zavisi od dužine vremena ko-kultivacije ćelija), mogu biti posledica delovanja solubilnih faktora produkovanih od strane AT-MMČ, u nastavku istraživanja upoređivali smo i efekte na proliferaciju MCF-7 ćelija kondicioniranih medijuma AT-MMČ prikupljenih nakon 24h, odnosno 48h kultivacije. Rezultati su pokazali da KM u zavisnosti kada su prikupljeni, odnosno od dužine vremena kultivacije AT-MMČ, ostvaruju različite efekte na proliferaciju MCF-7 ćelija. Naime, KM tAT-MMČ i tdAT-MMČ prikupljeni nakon 24h nisu značajno menjali ili su čak stimulisali proliferaciju MCF-7 ćelija, dok su KM pripremljeni nakon 48h kultivacije AT-MMČ, u skladu sa prethodnim nalazima, u svim uzorcima inhibirali proliferaciju MCF-7 ćelija (**Grafikon 13.**).

A.



B.

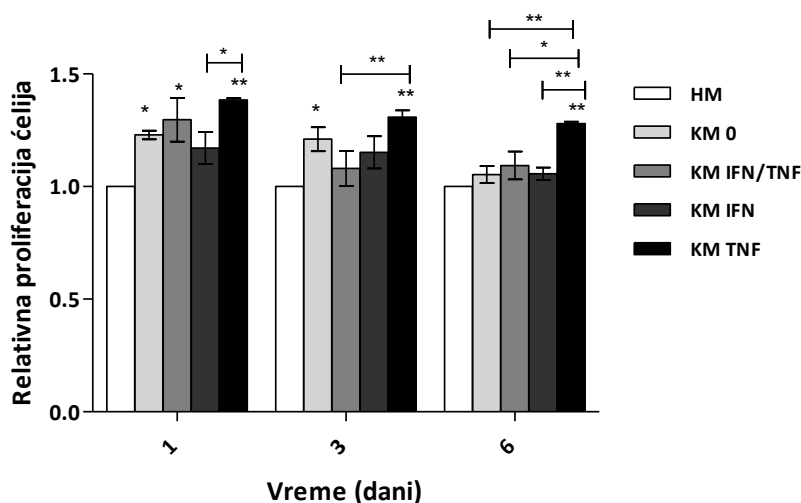


Grafikon 13. Uticaj kondicioniranih medijuma (KM) tAT-MMČ i tdAT-MMČ na proliferaciju MCF-7 ćelija. Tumorske ćelije su zasejavane u koncentraciji 5×10^3 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 96 otvora u SM u koje dodavan KM prikupljen od AT-MMČ nakon **A.** 24h ili **B.** 48h. u koncentracijama 0, 50 i 100%, u toku naredna 24h. Proliferacija je merena MTT testom i predstavljena odnosom vrednosti proliferacija eksperimentalnog uzorka i vrednosti proliferacije ćelija inkubiranih samo u SM čija je proliferacija izražena kao 100% (kontrola=0). Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta uračena u triplicatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

S obzirom da su prethodni rezultati pokazali da kondicionirani medijumi AT-MMČ prikupljeni nakon 24 i 48h ispoljavaju različite efekte na proliferaciju tumorskih ćelija, a u skladu sa značajnim povećanjem proliferacije tumorskih ćelija detektovanim kada su dve ćelijske populacije, AT-MMČ i MCF-7, kultivisane u uslovima direktnih i indirektnih mećućelijskih kontakata, u nastavku istraživanja detaljnije su ispitivani

tumor-stimulišući efekti KM tdAT-MMĆ prikupljenog nakon 24h , kako na proliferaciju MCF-7 ćelija, tako i na druga funkcionalna svojstva ovih tumorskih ćelija. Dodatno, prikupljeni su i kondicionirani medijumi tdAT-MMĆ koje su prethodno tretirane citokinima IFN- γ i TNF- α , a efekti KM tdAT-MMĆ, kako netretiranih, tako i pretretiranih sa IFN- γ i/ili TNF- α , na proliferaciju MCF-7 ćelija praćeni su nakon 1, 3 i 6 dana.

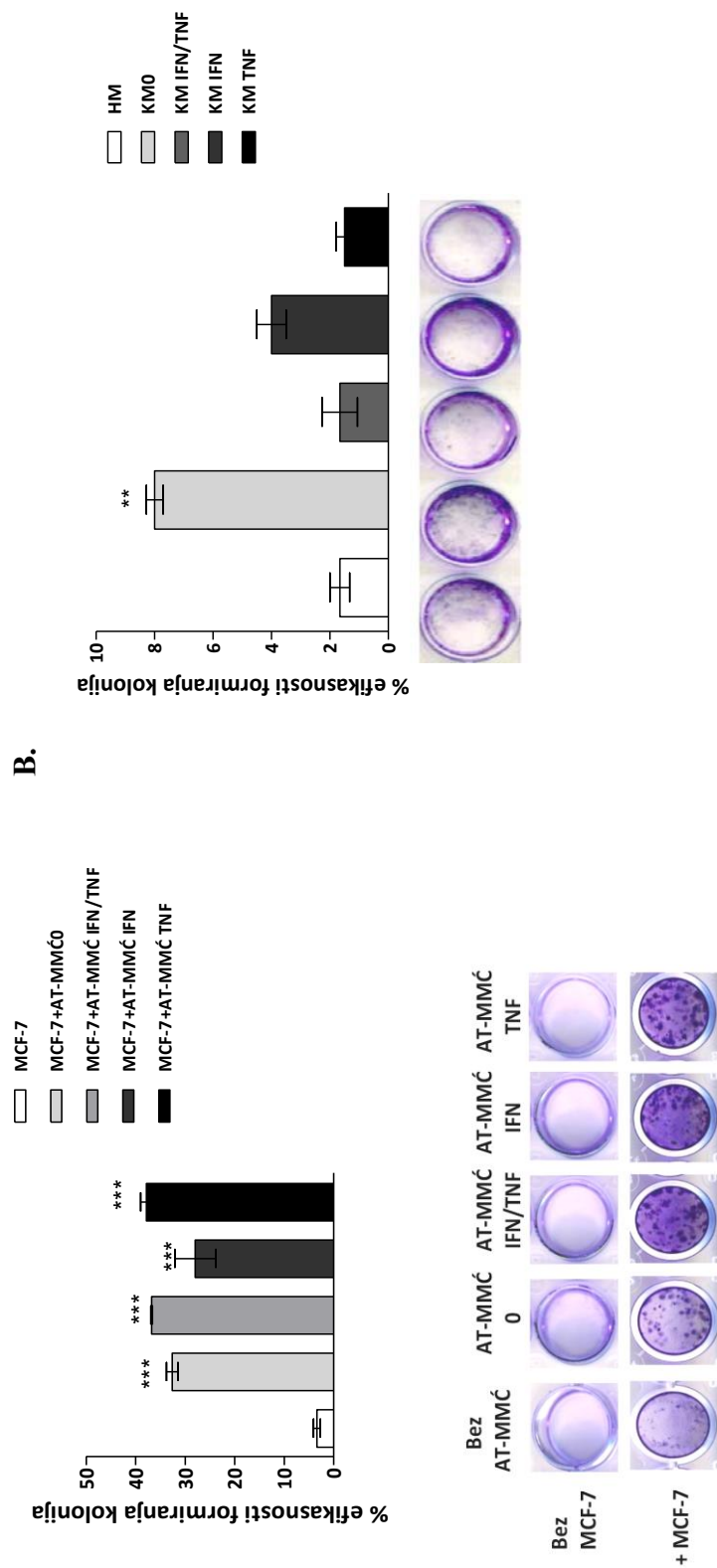
Rezultati ovih ispitivanja su pokazali da gotovo svi uzorci ovako prikupljenih KM uzrokuju povećanje proliferacije tumorskih ćelija, pri čemu je KM_{TNF} najviše stimulisao proliferaciju tumorskih ćelija u toku svih ispitivanih termina, za razliku od KM_{IFN} čiji se efekti na proliferaciju MCF-7 ćelija nisu značajno razlikovali od kontrolnih vrednosti. Stimulišući efekti KM₀ i KM_{IFN/TNF} su bili izraženiji u prvim danima tretmana tumorskih ćelija. (**Grafikon 14.**)



Grafikon 14. Uticaj kondicioniranih medijuma (KM) tdAT-MMĆ na proliferaciju MCF-7 ćelija. Tumorske ćelije MCF-7 su prethodno zasejavane u koncentraciji 5×10^3 ćelija/otvoru ploče sa 96 otvora u hranljivom medijumu (HM) i inkubirane 24h da bi adherirale, nakon čega su inkubirane sa KM u toku 1, 3 i 6 dana. Proliferacija je merena MTT testom i predstavljena odnosom vrednosti proliferacija eksperimentalnog uzorka i vrednosti proliferacije ćelija inkubiranih u HM čija je proliferacija izražena kao 1 (kontrola=0). Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta uračunanih u triplikatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.3.2. Uticaj tdAT-MMĆ i njihovih kondicioniranih medijuma na sposobnost formiranja CFU kolonija MCF-7 ćelija

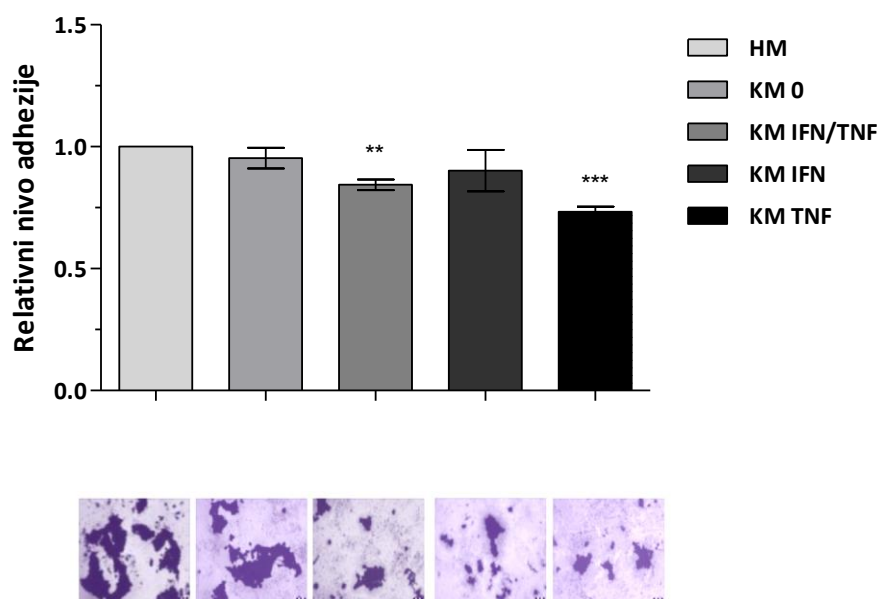
U sklopu istraživanja uticaja tdAT-MMĆ na rast tumorskih ćelija, praćen je i efekat MMĆ na sposobnost formiranja CFU kolonija od strane MCF-7 ćelija. Pored direktnih ćelijskih kontakata, ispitivan je i uticaj KM tdAT-MMĆ, i to kako onih dobijenih u HM, tako i onih nakon kultivisanja tdAT-MMĆ u prisustvu visokog nivoa proinflammatoryh citokina, IFN- γ i TNF- α . Rezultati su pokazali da direktni ćelijski kontakti koje tdAT-MMĆ ostvaruju sa tumorskim ćelijama značajno utiču na sposobnost formiranja kolonija od strane MCF-7 ćelija, s obzirom da su tdAT-MMĆ, kako pretretirane proinflammatoryh citokinima, tako i netretirane citokinima, uzrokovale statistički značajno povećanje efikasnosti formiranja CFU kolonija tumorskih ćelija u odnosu na MCF-7 ćelije koje su kultivisane pojedinačno (**Grafikon 15 A.**). Kada je ispitivan uticaj kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ, pokazano je da jedino KM netretiranih tdAT-MMĆ uzrokuju statistički značajno povećanje učestalosti stvaranja CFU kolonija MCF-7 ćelija, s obzirom da KM tdAT-MMĆ pretretiranih citokinima nisu uzrokovali značajnu promenu u broju MCF-7 kolonija (**Grafikon 15 B.**).



Grafikon 15. Uticaj tdAT-MMC na sposobnost formiranja kolonija MCF-7 ćelija. A. tdAT-MMC su pretretirane sa citokinima IFN- γ (50 ng/ml) i/ili TNF- α (20ng/ml) u toku 24 h, zatim su zasejane u ploče za kulturu tkiva sa 24 otvora u koncentraciji 20 ćelija/otvoru u HM. Nakon toga, dodavane su MCF-7 ćelije u koncentraciji 200 ćelija/otvoru i inkubirane u toku 10 dana. B. MCF-7 ćelija su zasejane u koncentraciji 200 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 24 otvora i inkubirane sa HM ili KM u toku 10 dana. Nakon inkubacije u odgovarajućim uslovima CFU kolonije su bojene kristal violet bojom, brojane i fotografisane na svetlosnom mikroskopu. Efikasnost formiranja CFU-F kolonija definisana je kao odnos broja kolonija i broja zasejanih MCF-7 ćelija. Prikazane su reprezentativne fotografije. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta uračena u triplicatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu, MCF-7 ćelije kultivisane samostalno u HM: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.3. Uticaj kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ na adhezivnost MCF-7 ćelija

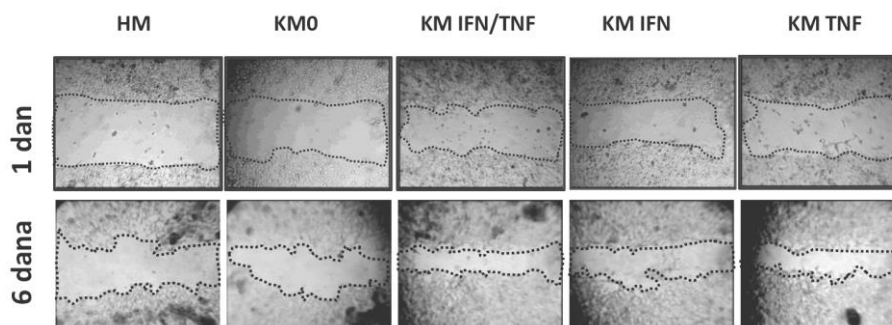
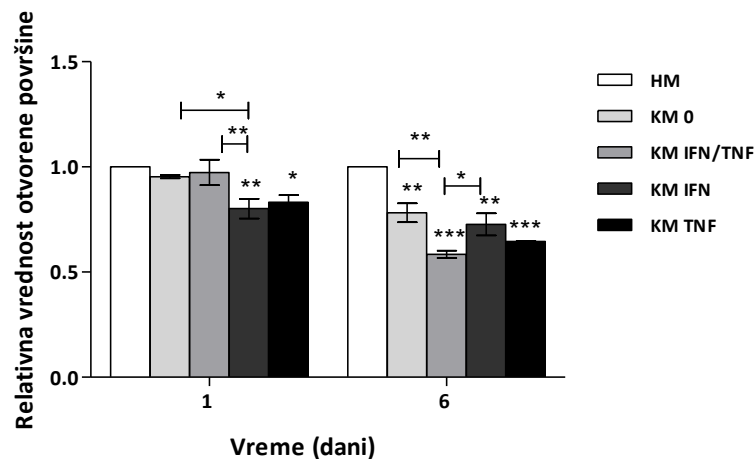
U daljim istraživanjima određivan je i uticaj solubilnih faktora produkovanih od strane tdAT-MMĆ na adhezivnost tumorskih ćelija. Kako je prikazano na **Grafikonu 16.**, jedino KM produkovani od strane tdAT-MMĆ pretretiranih sa TNF- α , kako pojedinačno, tako i u kombinaciji sa IFN- γ , uzrokovali su statistički značajno smanjenje adhezivnosti MCF-7 ćelija.



Grafikon 16. Uticaj kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ na adhezivnost MCF-7 ćelija. Tumorske ćelije su zasejavane u koncentraciji 3×10^4 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 24 otvora u HM ili KM i kultivisane 24h, nakon čega je odlivan supernatant i neadherentne ćelije. Ćelije koje su adherirale su bojene kristal-violet bojom, fotografisane na svetlosnom mikroskopu, vrednost apsorbance je očitana na 540 nm. Vrednosti nivoa adhezije predstavljene su kao odnos vrednosti apsorbance eksperimentalnog uzorka sa vrednostima dobijenim za MCF-7 ćelije kultivisane u HM čija je vrednost izražena kao 1 (kontrola). Prikazane su reprezentativne fotografije, vrednost skale je 20 μ m. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta uračena u triplikatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.4. Uticaj kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ na migraciju MCF-7 ćelija

Korišćenjem *Scratch* eseja ispitivani su efekti solubilnih molekula tdAT-MMĆ na migraciju MCF-7 ćelija. Migracija tumorskih ćelija praćena je nakon jednog i šest dana kultivacije MCF-7 ćelija sa KM kako netretiranih, tako i IFN- γ i/ili TNF- α pretretiranih tdAT-MMĆ. Rezultati su pokazali da su samo KM_{IFN} i KM_{TNF} statistički značajno povećali migraciju MCF-7 ćelija nakon prvog dana inkubacije (**Grafikon 17.**). Takođe je utvrđeno da nakon 6. dana svi testirani KM dovode do statistički značajnog povećanja migracije u poređenju sa kontrolom, MCF-7 ćelijama kultivisanim u HM, pri čemu su KM_{IFN/TNF} i KM_{TNF} uzrokovali statistički najveće povećanje migracije (**Grafikon 17.**).



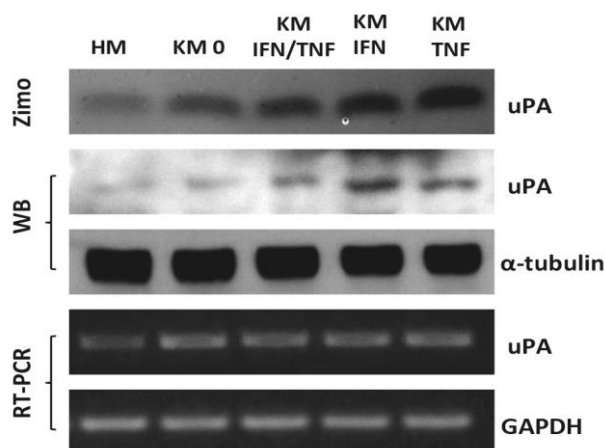
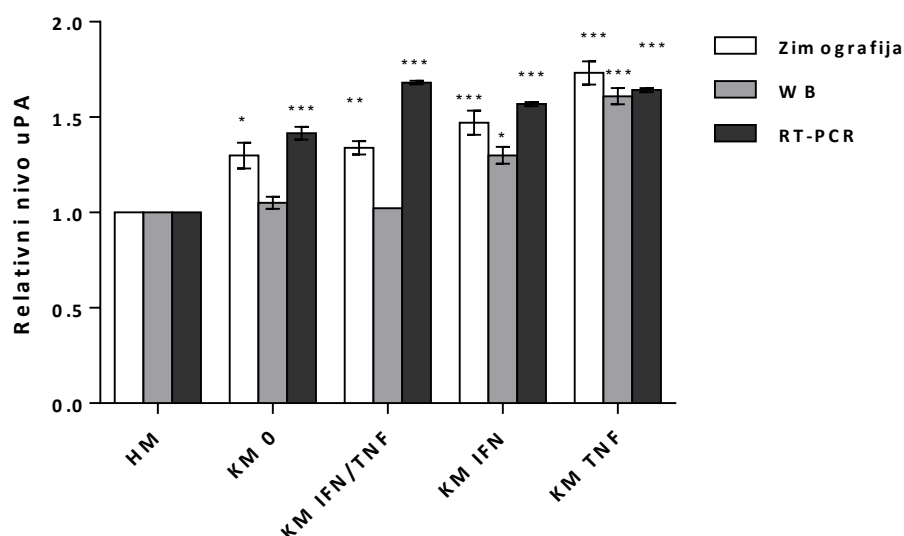
Grafikon 17. A. Uticaj kondicioniranog medijuma tdAT-MMĆ na migraciju MCF-7 ćelija. Migracija MCF-7 ćelija analizirana Scratch testom: nakon što je u konfluentnom jednosloju MCF-7 ćelija napravljena ogrebotina MCF-7 ćelije su inkubirane u HM ili različitim KM u toku 1 i 6 dana. Nivo migracije je izražen kao odnos veličine otvorene površine eksperimentalnog uzorka sa veličinom otvorene površine kod MCF-7 inkubiranih u HM čija vrednost je označena kao 1. Migracija je dokumentovana na svetlosnom mikroskopu, uvećanje je 40x. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta uračena u triplikatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

4.3.5. Uticaj kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ na ekspresiju urokinaza i matriks-metaloproteinaza u MCF-7 tumorskim ćelijama

Urokinaze sistema aktivator plazminogena urokinaznog tipa (uPA) i matriks-metaloproteinaze (MMP) su enzimi uključeni u ćelijsku migraciju, a takoĆe su i vaŹni primarni enzimi koji podstiĆu invazivnost tumorskih ćelija i formiranje njihovog metastatskog kapaciteta. S toga su ispitivani i efekti solubilnih faktora produkovanih od strane tdAT-MMĆ na produkciju i ekspresiju ovih proteina i njihovih gena u MCF-7 ćelijama.

4.3.5.1. Urokinaze uPA sistema

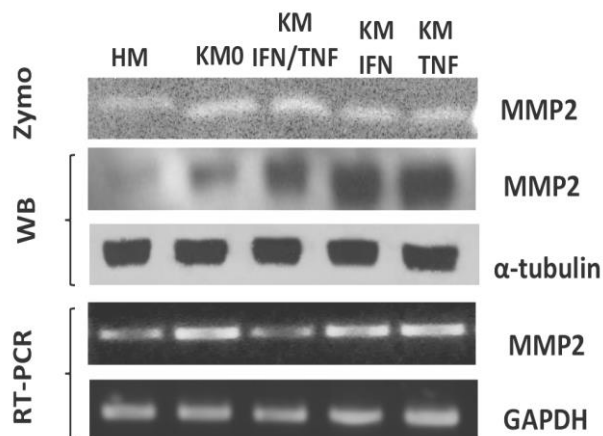
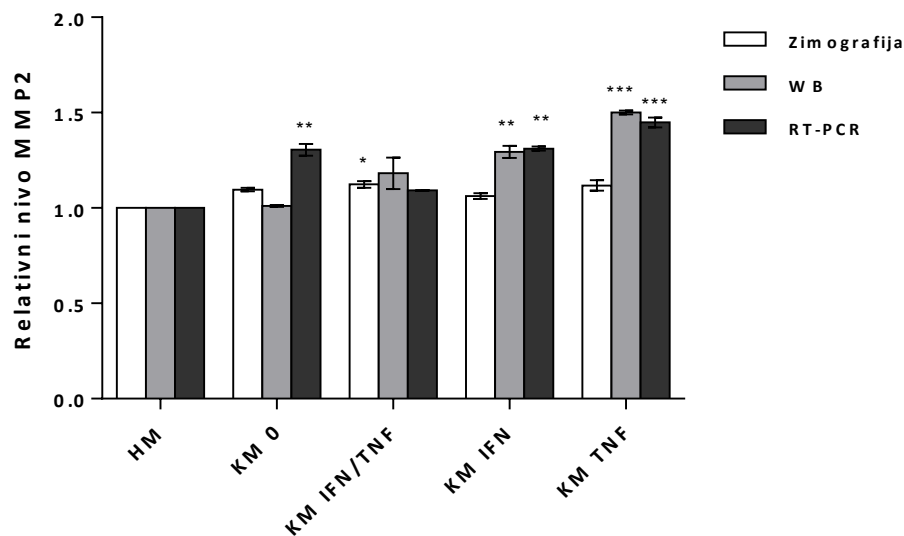
Da bi ispitali efekte solubilnih faktora tdAT-MMĆ na ekspresiju uPA, MCF-7 ćelije su tretirane sa KM mezenhimskih matićnih ćelija u toku 6 dana, nakon Ćega je aktivnost produkovanog uPA analizirana zimografijom. Rezultati su pokazali da dolazi do statistiĉki znaĉajnog poveĆanja aktivnosti ćelijski-vezanih urokinaza (uPA) u MCF-7 ćelijama nakon inkubacije sa svim testiranim KM tdAT-MMĆ, pri Ćemu su najizraŹeniji efekat imali KM_{IFN} i KM_{TFN}. Analiza uPA genske ekspresije potvrdila je ovaj nalaz, s obzirom da su svi uzorci KM tdAT-MMĆ stimulisali ekspresiju iRNK za uPA kod MCF-7 ćelija, dok je povišena proteinska ekspresija detektovana samo kod MCF-7 ćelija kultivisanih u prisustvu KM_{IFN} i KM_{TFN} (**Grafikon 18.**).



Grafikon 18. Uticaj kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ na ekspresiju uPA u MCF-7 ćelijama. Tumorske ćelije MCF-7 su zasejavane u koncentraciji 10^5 ćelija/otvoru ploče za kultivaciju tkiva sa 6 otvora i inkubirane sa HM ili KM u toku 6 dana. Aktivnost ćelijski-vezanih uPA analizirana je metodom zimografije (Zimo), ekspresija proteina Western blot (WB) analizom gde je α -tubulin korišćen kao kontrola za približno istu količinu proteina, a ekspresija gena RT-PCR metodom pri čemu je GAPDH primenjen kao kontrola za približno istu količinu komplementarne DNK u uzorcima. Vrednosti nivoa ekspresije predstavljene su kao odnos vrednosti eksperimentalnog uzorka sa vrednostima dobijenim za MCF-7 ćelije kultivisane u HM čija je vrednost izražena kao 1. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.5.2 Matriksne metaloproteinaze (MMP)

Analize aktivnosti ćelijski-vezanih enzima matriks-metaloproteinaza (MMP), su pokazale da se kod MCF-7 ćelija eksprimira samo MMP2, dok MMP9 nisu bile ekspimirane, kao i da nakon tretmana tumorskih ćelija sa svim ispitivanim KM tdAT-MMĆ ne dolazi do promene u aktivnosti sekretovane MMP2, određene metodom zimografije. Analiza proteinske ekspresije pokazala je da KM_{IFN} i KM_{TFN} značajno stimulišu ekspresiju proteina MMP2 u MCF-7 ćelijama, dok su povišeni nivoi iRNK za MMP2 bili prisutni u MCF-7 ćelijama nakon tretmana sa KM₀, KM_{IFN} i KM_{TFN}, ali ne i sa KM_{IFN/TNF} (**Grafikon 19.**).

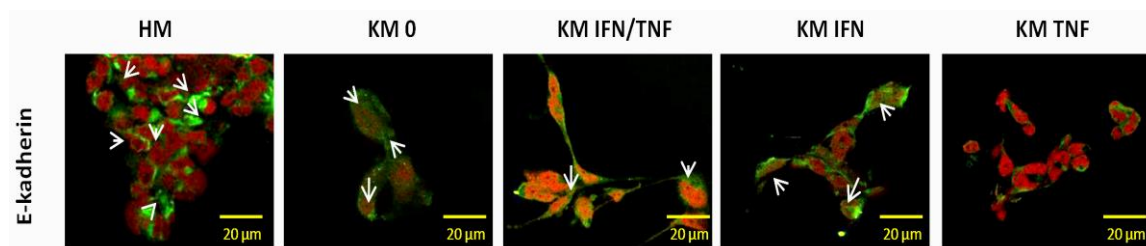


Grafikon 19. Uticaj kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ na ekspresiju MMP2 u MCF-7 ćelijama. Tumorske ćelije MCF-7 su zasejavane u koncentraciji 10^5 ćelija/otvoru ploče za kultivaciju tkiva sa 6 otvora i inkubirane sa HM ili KM u toku 6 dana. Aktivnost ćelijski-vezanih MMP2 analizirana je metodom zimografije (Zimo), ekspresija proteina Western blot (WB) analizom, gde je α -tubulin korišćen kao kontrola za približno istu količinu proteina, a ekspresija gena RT-PCR metodom, pri čemu je GAPDH primenjen kao kontrola za približno istu količinu komplementarne DNK u uzorcima. Vrednosti nivoa ekspresije predstavljene su kao odnos vrednosti eksperimentalnog uzorka sa vrednostima dobijenim za MCF-7 ćelije kultivisane u HM čija je vrednost izražena kao 1. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.6. Uticaj kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ na proces epitelo-mezenhimske tranzicije (EMT) tumorskih ćelija

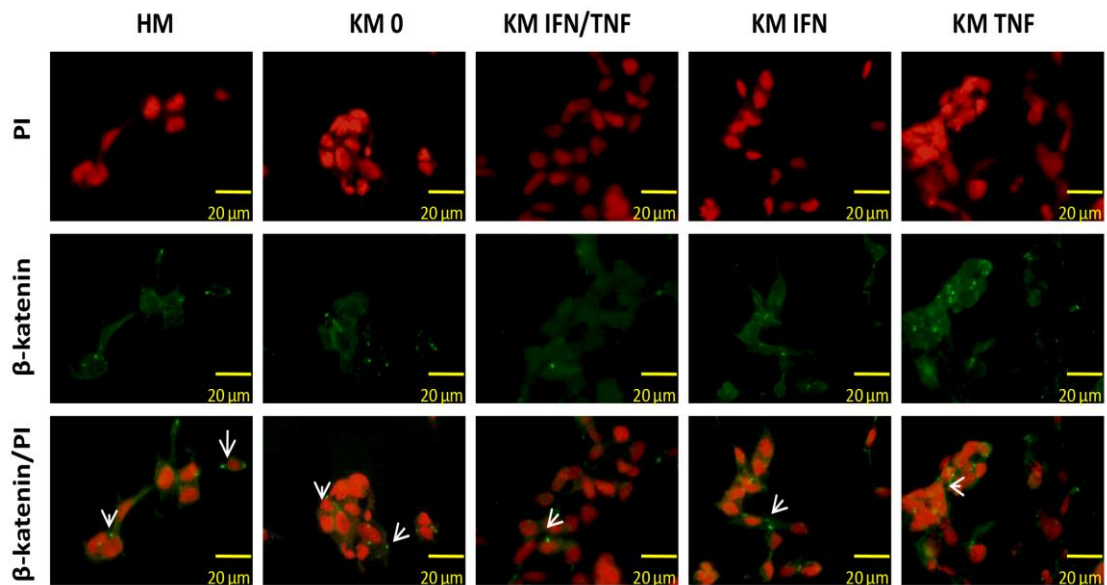
Jedan od procesa od posebne važnosti za progresiju tumora je proces epitelo-mezenhimske tranzicije (EMT), u toku kog kod tumorskih ćelija epitelnog tipa dolazi do raskidanja veza sa susednim ćelijama, povećanja njihove pokretljivosti i povećane ekspresije molekula karakterističnih za ćelije mezenhinskog porekla. U cilju odreĉivanja uticaja kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ na ekspresiju i ćelijsku lokalizaciju markera povezanih sa procesom EMT, u nastavku istraţivanja analizirana je ekspresija E-kadherina, β -katenina i Vimentina.

Metodom indirektno imunofluorescence je pokazano da tumorske ćelije nakon šestodnevnoĉ kultivisanja sa KM tdAT-MMĆ eksprimiraju manji nivo površinskog adhezivnog molekula E-kadherina (**Slika 10.**). Ovaj efekat je bio najizraţeniji kod tretmana sa KM_{TNF} u poreĉenju sa kontrolom (HM).



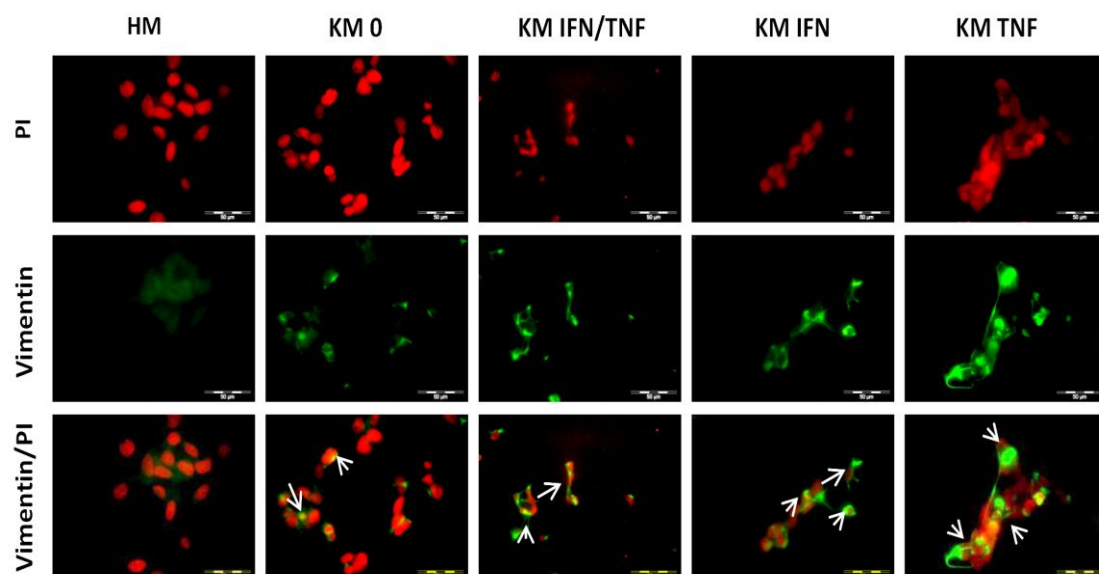
Slika 10. Ekspresija E-kadherina kod MCF-7 ćelija. Tumorske ćelije su tretirane sa HM ili KM u toku 6 dana. Crvenom bojom (PI) su obojena jedra, dok je zelenom (FITC) obojen E-kadherin (obeleţeno belim strelicama). Ćelije su analizirane konfokalnim mikroskopom. Prikazane su reprezentativne fotografije najmanje 3 nezavisna eksperimenta.

Ispitivan je i uticaj KM poreklom od tdAT-MMĆ na lokalizaciju, odnosno aktivaciju β -katenina. Ovaj molekul, nakon aktivacije iz citoplazmatskog dela ćelije uz unutrašnju stranu membrane gde je povezan sa E-kadherinom i ima ulogu u odrţavanju meĉućelijskih veza, prelazi u jedro gde aktivira Wnt signalni put. Rezultati su pokazali da kod MCF-7 ćelija tretiranih sa HM ili KM u toku 6 dana ne dolazi do promene u lokalizaciji β -katenina (**Slika 11.**).



Slika 11. Ekspresija β -katenina u MCF-7 ćelijama tretiranim sa HM ili KM u toku 6 dana. Crvenom bojom (PI) su obojena jedra, dok je zelenom (FITC) obojen β -katenin (obeleženo belim strelicama). Ćelije su slikane epi-fluorescentnim mikroskopom. Prikazane su reprezentativne fotografije.

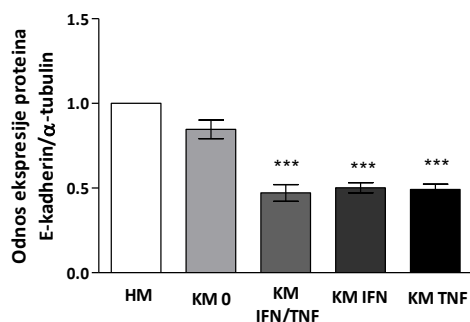
S druge strane, pokazano je da kondicionirani medijumi tdAT-MMĆ indukuju povećanu ekspresiju intracelularnog proteina Vimentina kod MCF-7 ćelija (**Slika 12.**). Naime, svi ispitivani KM su povećali ekspresiju Vimentina kod tumorskih ćelija u odnosu na kontrolu (HM), dok je KM_{TNF} imao najizraženiji efekat.



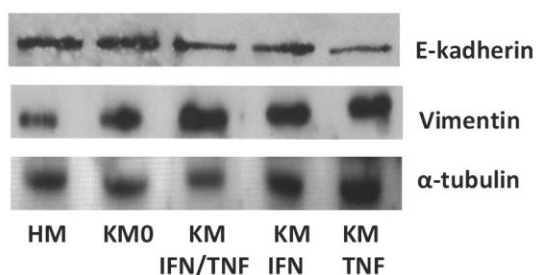
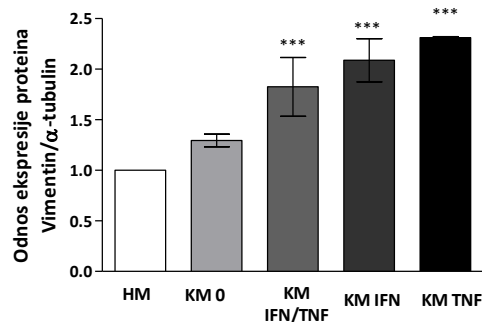
Slika 12. Ekspresija Vimentina u MCF-7 ćelijama tretiranim sa HM ili KM u toku 6 dana. Crvenom bojom (PI) su obojena jedra, dok je zelenom (FITC) obojen Vimentin (obeleženo belim strelicama). Ćelije su slikane epi-fluorescentnim mikroskopom. Prikazane su reprezentativne fotografije najmanje 3 nezavisna eksperimenta.

Analiza proteinske ekspresije E-kadherina i Vimentina metodom Western blota, je potvrdila rezultate dobijene imunofluorescentnim bojenjem, s obzirom da su KM_{IFN/TNF}, KM_{IFN} i KM_{TNF} značajno redukovali ekspresiju proteina E-kadherina, dok su suprotno tome povećali ekspresiju Vimentina (**Grafikon 24.**).

A.

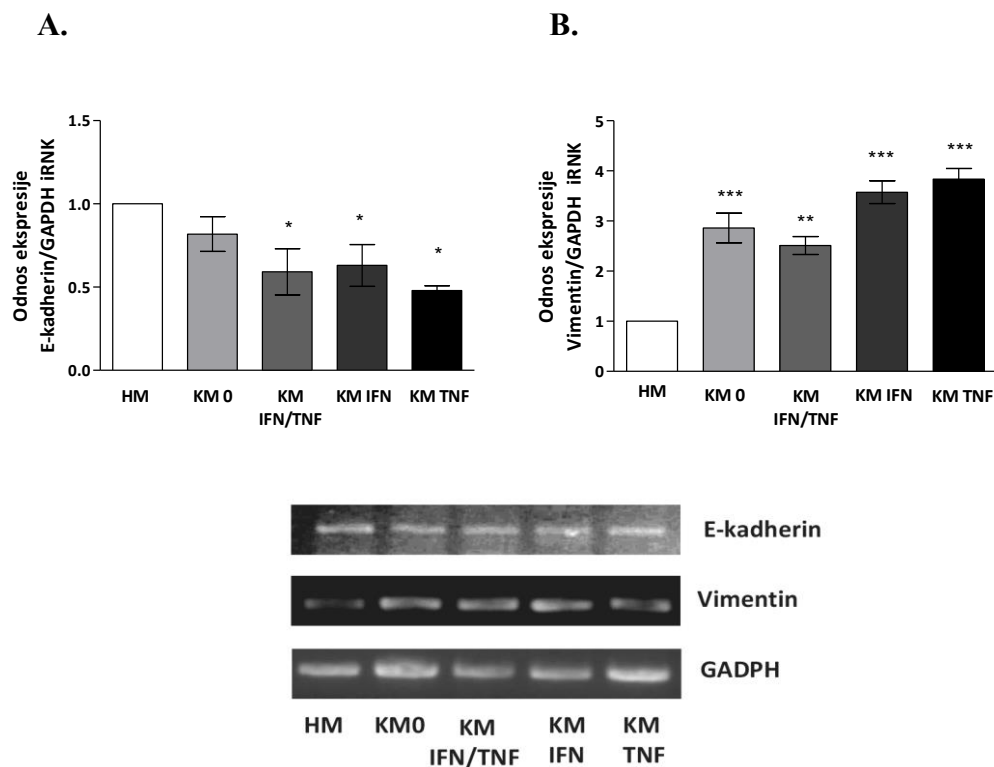


B.



Grafikon 24. Ekspresija proteina E-kadherina i Vimentina u MCF-7 ćelijama. MCF-7 ćelije su zasejavane u koncentraciji 10^5 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 6 otvora u HM. Nakon dostizanja 90 % konfluentnosti, MCF-7 ćelije su tretirane saHM ili KM u toku 6 dana. Ekspresija **A.** E-kadherina i **B.** Vimentina je analizirana metodom Western blota, pri čemu je α -tubulin primenjen kao kontrola za približno istu količinu proteina u uzorcima. Vrednosti nivoa ekspresije predstavljene su kao odnos vrednosti eksperimentalnog uzorka za E-kadherin i Vimentin i vrednostima dobijenim za ekspresiju E-kadherina i Vimentina u MCF-7 ćelijama kultivisanim u HM čija je vrednost označena kao 1. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: *** $p < 0,001$.

Pored analize ekspresije proteina, ispitivana je i genska ekspresija E-kadherina i Vimentina u MCF-7 ćelijama kada su tretirane sa različitim KM tdAT-MMC. Rezultati su pokazali da KM_{IFN/TNF}, KM_{IFN} i KM_{TNF} dovede do statistički značnog smanjenja iRNK za E-kadherin u MCF-7 ćelijama (**Grafikon 25 A.**), dok KM₀, KM_{IFN/TNF}, KM_{IFN} i KM_{TNF} uzrokuju statistički značajno povećanje genske ekspresije Vimentina u MCF-7 ćelijama (**Grafikon 25 B.**).

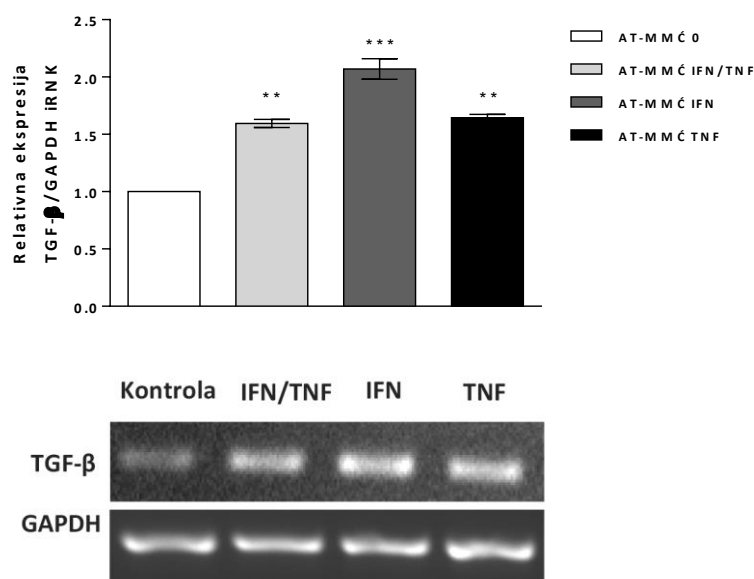


Grafikon 25. Genska ekspresija E-kadherina i Vimentina u MCF-7 ćelijama. MCF-7 ćelije su zasejavane u koncentraciji 10^5 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 6 otvora u HM. Nakon dostizanja 90% konfluentnosti, MCF-7 ćelije su tretirane sa HM ili KM u toku 6 dana. Ekspresija **A.** E-kadherina i **B.** Vimentina je analizirana metodom RT-PCR, pri čemu je GAPDH primenjen kao kontrola za približno istu količinu kDNK u uzorcima. Vrednosti nivoa ekspresije predstavljene su kao odnos vrednosti eksperimentalnog uzorka za E-kadherin i Vimentin i vrednostima dobijenim za ekspresiju E-kadherina i Vimentina u MCF-7 ćelijama kultivisanim u HM čija je vrednost označena kao 1. Prikazani su reprezentativni gelovi. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.3.7. Uloga TGF- β u interakcijama tdAT-MMĆ sa MCF-7 tumorskim ćelijama

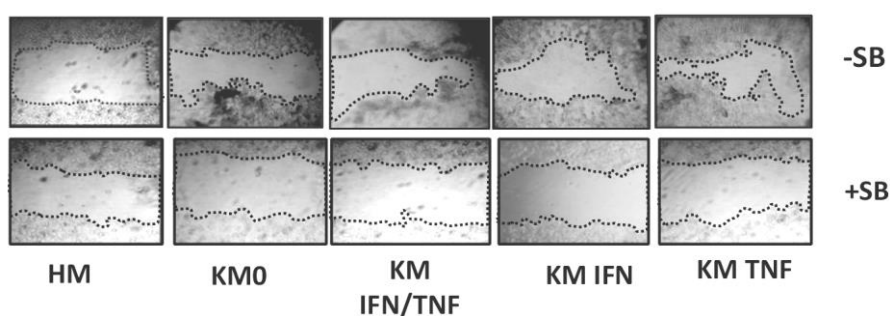
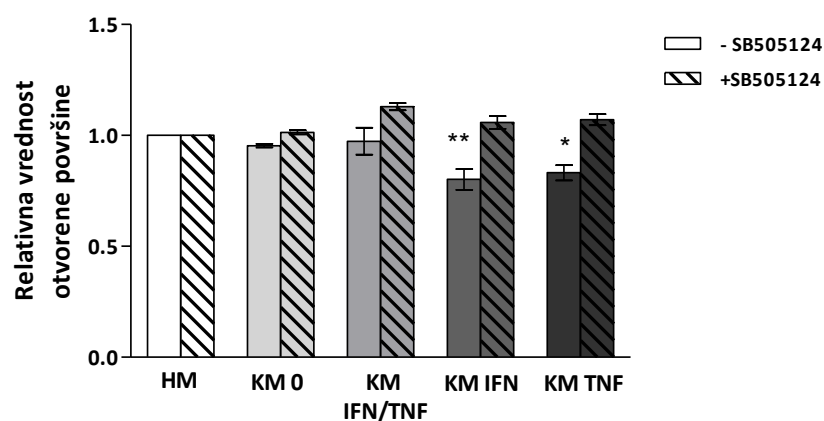
TGF- β kao plejotropni faktor rasta je jedan od molekula čija je uloga u nastanku i progresiji tumora od posebne važnosti. Stoga je sledeći cilj bio određivanje učešća ovog molekula u interakcijama AT-MMĆ sa tumorskim ćelijama. U tu svrhu prvo je određena ekspresija iRNA za TGF- β u tdAT-MMĆ kultivisanim kako u standardnim

uslovima kultivacije, tako i u uslovima proinflamatorne mikrosredine, odnosno u prisustvu proinflamatornih citokina, IFN- γ i/ili TNF- α . Rezultati su pokazali da tdAT-MMĆ konstitutivno eksprimiraju gen za TGF- β , kao i da kultivacija ovih ćelija u prisustvu IFN- γ i/ili TNF- α , dovodi do statistički značajnog povećanja ekspresije iRNK za TGF- β (**Grafikon 20.**).



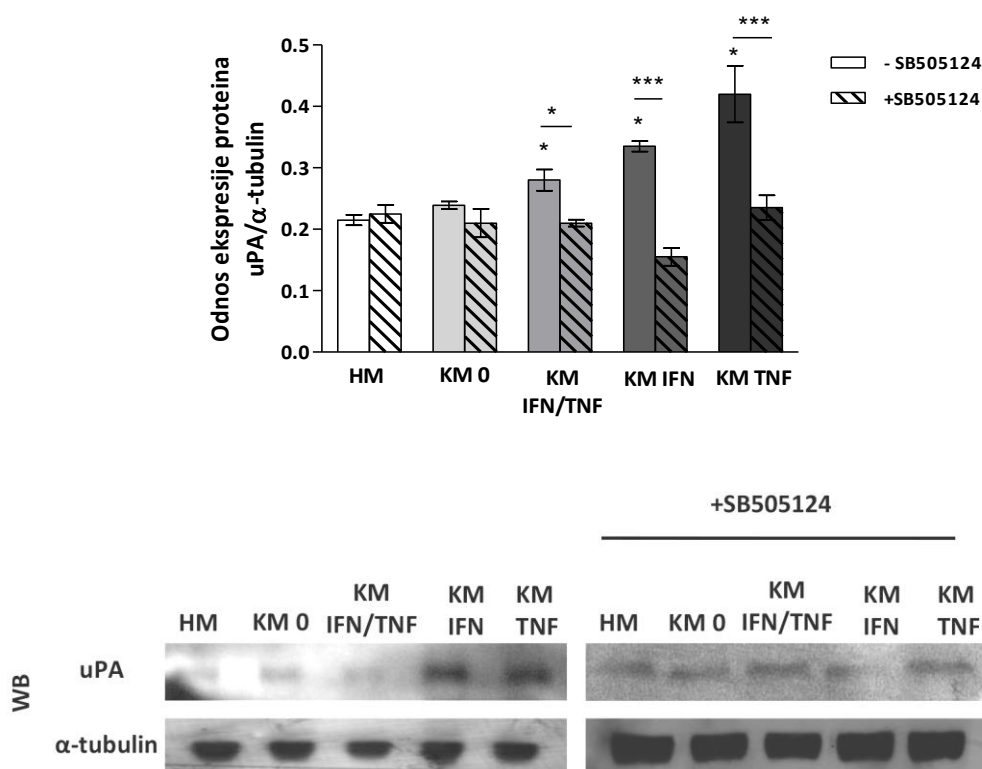
Grafikon 20. Ekspresija iRNK za TGF- β kod AT-MMĆ. AT-MMĆ su zasejavane u koncentraciji 10^5 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 6 otvora u SM. Nakon dostizanja 90% konfluentnosti, ćelije su tretirane sa IFN- γ (50 ng/ml) i TNF- α (20 ng/ml) naredna 24 h. Metodom RT-PCR je određena ekspresija iRNK za TGF- β pri čemu je GAPDH primenjen kao kontrola za približno istu količinu komplementarne DNK u uzorcima. Vrednosti ekspresije predstavljene su kao odnos denzitometrijskih vrednosti eksperimentalnog uzorka i netretiranih AT-MMĆ (kontrola) čija je vrednost izražena kao 1. Prikazani su reprezentativni gelovi. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

S obzirom na pokazanu ulogu TGF- β u razvoju tumorskih ćelija, posebno u modulaciji njihovog kapaciteta migracije i razvoju metastaza, u eksperimente je uključen farmakološki inhibitor TGF- β I receptora (ALK5), SB505124, kako bi se ispitalo da li je migracija MCF-7 stimulirana solubilnim faktorima produkovanim od strane tdAT-MMĆ, zapravo posredovana TGF- β molekulom. Dobijeni rezultati su pokazali da se inhibicijom TGF- β receptora poništava stimulatorni efekat KM tdAT-MMĆ na migraciju MCF-7 ćelija (**Grafikon 21.**).



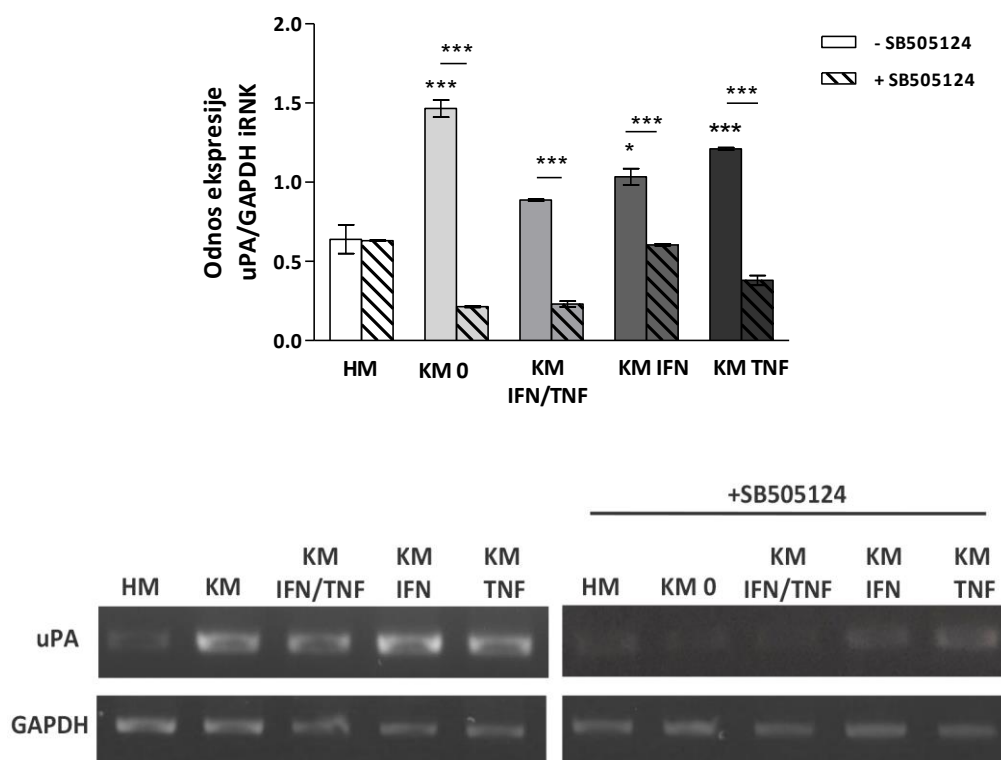
Grafikon 21. Uticaj SB505124 inhibitora (SB) na migraciju MCF-7 ćelija stimulisanu kondicioniranim medijumom tdAT-MMĆ. MCF-7 ćelije su inkubirane u HM ili KM u prisustvu ili bez SB505124 inhibitora u toku 1 dana. Nivo migracije je izražen kao odnos veličine otvorene površine eksperimentalnog uzorka sa veličinom otvorene površine kod MCF-7 inkubiranih u HM čija vrednost je označena kao 1. Migracija je dokumentovana na svetlosnom mikroskopu, a uvećanje je 40x. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta uračunanih u triplikatu. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Kako su u procesu tumorogeneze ekspresije TGF- β molekula i uPA kompleksa međusobno povezani, pri čemu TGF- β reguliše ekspresiju uPA, ispitivan je i nivo ekspresije uPA proteina u MCF-7 ćelijama nakon kultivacije sa KM tdAT-MMĆ u prisustvu ili odsustvu inhibitora SB505124 (**Grafikon 22.**). Pokazano je da prisustvo SB505124 inhibitora pri kultivaciji MCF-7 ćelija sa KM tdAT-MMĆ poništava blago stimulatorno dejstvo KM_{IFN/TNF}, KM_{IFN} i KM_{TNF} na proteinsku ekspresiju uPA molekula, ne dovodeći do smanjenja konstitutivne ekspresije uPA određene nakon kultivisanja MCF-7 ćelija u HM.



Grafikon 22. Uticaj inhibitora SB505124 (SB) na ekspresiju uPA proteina kod MCF-7 ćelija. MCF-7 ćelije su zasejavane u koncentraciji 10^5 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 6 otvora u HM. Nakon dostizanja 90% konfluentnosti, MCF-7 ćelije su tretirane sa HM ili KM, u prisustvu ili bez SB505124 inhibitora ($2 \mu\text{M}$) u toku 1 dana. Metodom Western blota (WB) je određena ekspresija uPA pri čemu je α -tubulin primenjen kao kontrola za približno istu količinu proteina u uzorcima. Vrednosti nivoa ekspresije predstavljene su kao odnos vrednosti eksperimentalnog uzorka za uPA sa vrednostima dobijenim za ekspresiju α -tubulina. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SE za 3 nezavisna eksperimenta. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

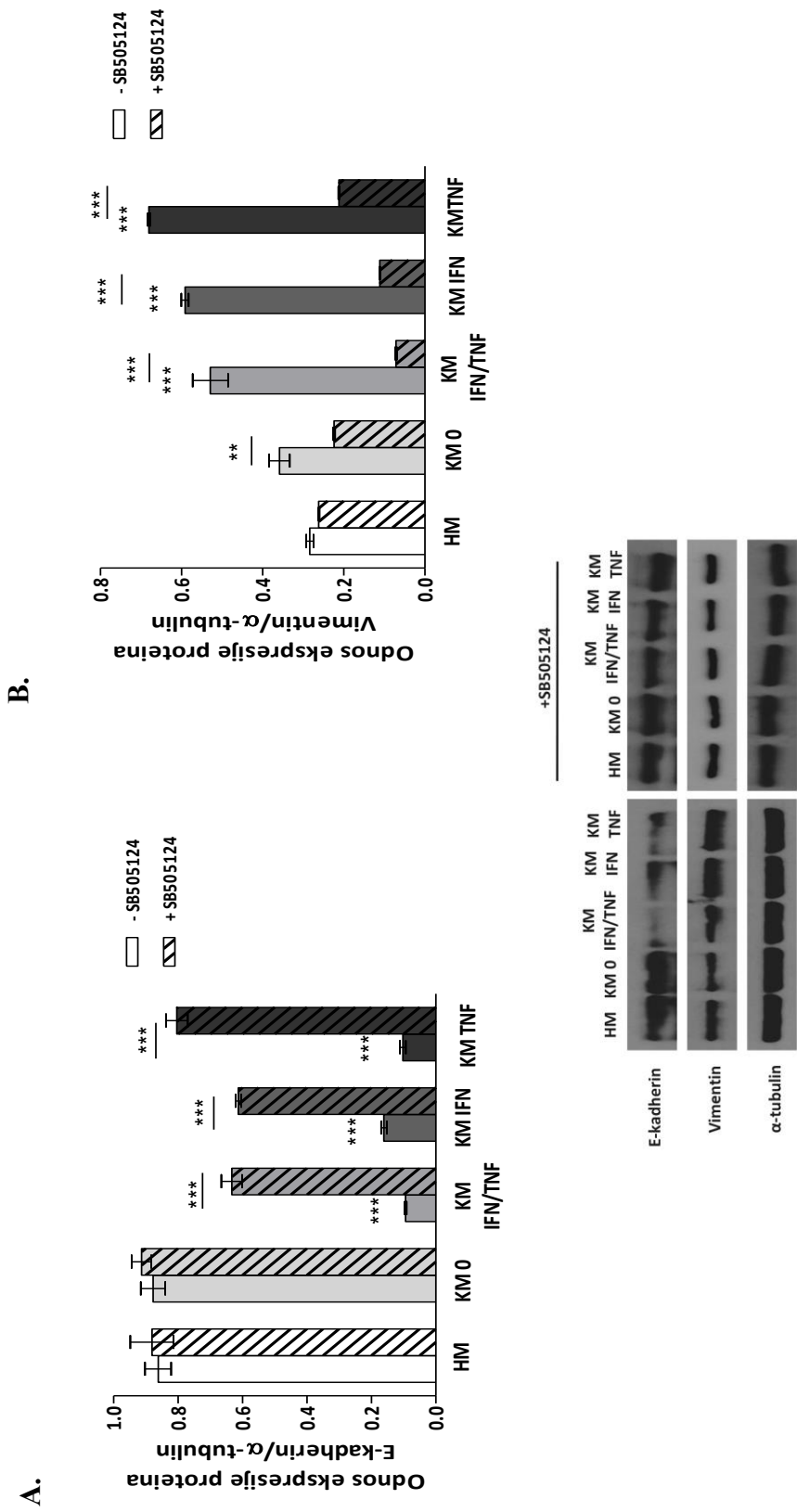
U sledećem koraku analizirani su efekti kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ na ekspresiju uPA iRNK u MCF-7 ćelijama, prisustvu bez ili odsustvu inhibitora SB505124. Rezultati su pokazali da inhibitor TGF- β I receptora značajno smanjuje gensku ekspresiju uPA u tumorskim ćelijama prilikom kultivacije sa svim testiranim KM AT-MMĆ (**Grafikon 23.**).



Grafikon 23. Uticaj inhibitora SB505124 (SB) na ekspresiju uPA iRNK kod MCF-7 ćelija. MCF-7 ćelije su zasejavane u koncentraciji 10^5 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 6 otvora u HM. Nakon dostizanja 90 % konfluentnosti, MCF-7 ćelije su tretirane sa HM ili KM, u prisustvu ili bez SB505124 inhibitora (2 μ M) u toku 1 dana. Metodom RT-PCR je određena ekspresija uPA iRNK pri čemu je GAPDH primenjen kao kontrola za približno istu količinu komplementarne kDNK u uzorcima. Vrednosti nivoa ekspresije predstavljene su kao odnos vrednosti eksperimentalnog uzorka za uPA sa vrednostima dobijenim za ekspresiju GAPDH. Prikazani su reprezentativni gelovi. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Kako bi se utvrdilo učešće TGF- β molekula u dobijenim efektima kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ na ekspresiju markera povezanih sa procesom EMT u MCF-7 ćelijama, dodatno je ispitivana ekspresija proteina E-kadherina i Vimentina metodom Western blot-a kod MCF-7 ćelija netretiranih ili tretiranih sa KM, u prisustvu SB505124 (**Grafikon 26.**). Analizom dobijenih rezultata utvrđeno je da su MCF-7 ćelije kultivisane istovremeno u prisustvu KM_{IFN/TNF}, KM_{IFN} i KM_{TNF} i SB505124 delimično obnovile ekspresiju proteina E-kadherina, eksprimirajući ovaj protein na približno na istom nivou kao i kontrolne ćelije kultivisane u kontrolu (HM) i KM₀ (**Grafikon 26 A.**). S druge strane, analiza ekspresije Vimentina pokazala je da kultivisanje MCF-7 ćelija u prisustvu svih testiranih KM tdAT-MMĆ i SB505124

inhibitora uzrokuje smanjenje ekspresije Vimentina u ovim tumorskim ćelijama, a u poređenju sa nivoom ovog proteina u ćelijama iz kultura bez inhibitora (**Grafikon 26 B.**).



Grafikon 26. Ekspresija proteina E-kadherina i Vimentina u MCF-7 ćelijama prisustvu SB505124 inhibitora (SB). MCF-7 ćelije su zasejane u koncentraciji 10^5 ćelija/otvoru ploče za kulturu tkiva sa 6 otvora u HM. Nakon dostizanja 90 % konfluentnosti, MCF-7 ćelije su tretirane sa HM ili KM, u prisustvu ili bez SB505124 inhibitora ($2 \mu\text{M}$) u toku 6 dana. Ekspresija **A.** E-kadherina i **B.** Vimentina je analizirana metodom Western blota, pri čemu je α -tubulin primenjen kao kontrola za približno istu količinu proteina u uzorcima. Vrednosti nivoa ekspresije predstavljene su kao odnos vrednosti eksperimentalnog uzorka za E-kadherin i Vimentin sa vrednostima dobijenim za ekspresiju α -tubulina. Prikazani su reprezentativni imunoblotovi. Vrednosti predstavljaju srednju vrednost $\pm$ SEM za 3 nezavisna eksperimenta. Značajnost razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolu: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5. DISKUSIJA

Istraživanja mezenhimskih matičnih ćelija (MMC) su doprinela velikom napretku u razumevanju njihovih osnovnih karakteristika, prvenstveno osobina samoobnove i multipotentnog potencijala diferencijacije, a sa ciljem njihove potencijalne primene u novim terapijskim pristupima u regenerativnoj medicini, ćelijskoj terapiji i otkriću novih lekova. Kako su prvootkrivene i do sada najbolje okarakterisane hematopoetske matične ćelije (HMC), prva istraživanja u oblasti matičnih ćelija su bila posvećena matičnim ćelijama kostne srži. Stoga su i MMC izolovane iz kostne srži dugo vremena predstavljale „zlatni standard“ u mnogim istraživanjima. Međutim, danas su izolovane i okarakterisane MMC iz mnogih adultnih i neonatalnih tkiva, čija je glavna prednost bezbedna ili minimalno invazivna metoda prikupljanja, jednostavnost procedura kultivacije i mogućnost autologe primene (Baer i Geiger, 2012, Zuk, 2013).

Masno tkivo je u literaturi predstavljeno kao potencijalno bogat izvor MMC (Zeve i sar., 2009, Bauer-Kreisel i sar., 2010, Cawthorn i sar., 2012). Nedostatak jedinstvenih kriterijuma i univerzalnih standarda za izolaciju i pripremu MMC umnogome su usporili napredak u ovoj oblasti i onemogućili poređenja rezultata različitih laboratorija. U prethodnim istraživanjima pokazano je da uspešnost izolacije, umnožavanja, održavanja sposobnosti samoobnove i multipotentnog potencijala diferencijacije MMC, zavisi od toga da li je masno tkivo prikupljeno kao aspirat ili u čvrstom stanju, kao i da razlike mogu da budu u vezi sa regionom tela iz koga masno tkivo potiče (potkožno ili visceralno), ali i starosti donora od koga je masno tkivo uzeto (Choudhery i sar., 2014, Russo i sar., 2014). Imajući u vidu sve potencijalne izvore razlika, kao i da u našoj sredini ne postoji druga mogućnost da se ove ćelije nabave, naša početna istraživanja su bila posvećena optimizaciji izolovanja MMC iz masnog tkiva zdravih donora i karakterizaciji ovih ćelija utvrđivanjem klonogenog, proliferativnog i potencijala diferencijacije. Pored zdravih ljudi, u narednim istraživanjima MMC su izolovane i iz masnog tkiva pacijenata koji su bolovali od malignih oboljenja, s obzirom da se u rekonstruktivnoj hirurgiji, koja je danas sastavni deo terapija posebno kod bolesnika sa tumorima dojke, inženjering masnog tkiva i korišćenje strukturnih nosača od masnog tkiva intenzivno ispituju kao novi pristupi regenerativne medicine. Na ovaj način smo pokušali da ispitamo da li i kako mikrosredina porekla AT-MMC utiče na njihove osobine u *in vitro* uslovima, imajući u vidu činjenicu da su kod malignih oboljenja

poremećeni brojni parametri na ćelijskom i molekularnom nivou, kao i da je uloga interakcija MMĆ sa tumorskim ćelijama u procesu tumorogeneze nedovoljno ispitana.

Poređenje populacija AT-MMĆ, izolovanih iz tkiva zdravih osoba i pacijenata koji su bolovali od malignih bolesti, pokazalo je da, uprkos različitom poreklu, sve izolovane AT-MMĆ poseduju karakterističnu morfologiju i svojstvo adhezije za plastiku, imaju sličan klonogeni i proliferativni potencijal, iskazuju tipičan imunofenotip MMĆ ćelija i ispoljavaju sličan potencijal diferencijacije. Parametri poput uspešnosti izolacije MMĆ iz masnog tkiva, učestalosti dobijenih AT-MMĆ, i njihov klonogeni i proliferativni potencijal su u skladu sa prethodno objavljenim istraživanja (*Dominici i sar., 2006, Gimble i sar., 2007*). Takođe, rezultati koji su pokazali da sve izolovane AT-MMĆ imaju sposobnost multipotentne diferencijacije u ćelije i tkiva mezodermalnog porekla, osteoblaste, adipocite, hondroblaste i višejedarne ćelije (miogena diferencijacija), su u skladu sa prethodno objavljenim studijama o potencijalu diferencijacije kako AT-MMĆ (*Zuk i sar., 2002, Rodriguez i sar., 2005*), tako i MMĆ izolovanih iz drugih izvora, posebno iz kostne srži (*Jin i sar., 2013, Barberini i sar., 2014*). Na osnovu ovih osobina, potvrđeno je da AT-MMĆ predstavljaju dobru potencijalnu zamenu za MMĆ kostne srži. Kako je pokazano da AT-MMĆ mogu da se diferenciraju i u ćelije endodermalnog (hepatociti, β -ćelije pankreasa) i ektodermalnog (neuroni) porekla, istraživanja uloge ovih MMĆ u regeneraciji tkiva su dodatno intenzivirana (*Cawthorn i sar., 2012, Zuk i sar., 2013*). S toga su danas aktuelna ispitivanja primene AT-MMĆ u ćelijskoj terapiji, regeneraciji mekog tkiva, popravci oštećenja hrskavice i kostiju, obnavljanju kardiomiocita i vaskularnih ćelija i lečenju neurodegenerativnih oboljenja (*Kim i Heo, 2014, Kokai i sar., 2014*). Međutim, potencijal diferencijacije AT-MMĆ je predominantno pokazan na životinjskim i humanim ćelijama *in vitro*, dok su ispitivanja potencijala diferencijacije AT-MMĆ *in vivo* uglavnom obuhvatala ksenogene modele (*Cawthorn i sar., 2012, Kokai i sar., 2014*), što je ukazalo da su za njihovu kliničku primenu nepohodna dodatna istraživanja.

U skladu sa kriterijumima za karakterizaciju MMĆ, naši rezultati određivanja imunofenotipa potvrdili su prisustvo površinskih CD markera karakterističnih za MMĆ: CD90, CD73, CD44H i CD105, kao i odsustvo markera ćelija hematopoetske linije: CD45, CD11b, CD33 i CD235, kao i molekula HLA-DR kod svih ispitivanih ćelijskih

populacija, bez obzira na poreklo. Takođe, pokazano je da među izolovanim populacijama AT-MMĆ postoji velika varijabilnost u ekspresiji CD34 markera, što je u saglasnosti sa prethodno objavljenim studijama u kojima je pokazano da AT-MMĆ za razliku od ostalih MMĆ, mogu u velikoj meri ispoljavati CD34 (*Lin i sar., 2010, Baer i Geiger, 2012*). Iako je u ovim studijama prisustvo CD34 markera bilo objašnjeno njegovom ekspresijom u ranim pasažama, a ne usled različitog porekla AT-MMĆ, naši rezultati su pokazali da iako je prisustvo markera CD34 ispitivano u ranim pasažama za sve donore, izražena ekspresija ovog markera je bila prisutna samo kod jedne populacije tAT-MMĆ, ćelija poreklom iz masnog tkiva iz neposrednog okruženja tumora koji nije tumor dojke. Sve ispitivane populacije AT-MMĆ eksprimirale su i intraćelijske proteine karakteristične za MMĆ, poput STRO-1 najprepoznatljivijeg markera MMĆ, (*Lin i sar., 2011*) i Vimentina, intermedijernog filameta tipa III, koji je glavna komponenta citoskeleta MMĆ (*Steward i sar., 2013*). Takođe, potvrđena je i ekspresija α -SMA, proteina karakterističnog za pericite, što je uz pozitivnu ekspresiju standardnih MMĆ markera CD44, CD73, CD90 i CD105, ali i CD34 proteina, po mnogim autorima potvrda o perivaskularnom poreklu AT-MMĆ (*Lin i sar., 2010, Zimmerlin i sar., 2010, Trktuev i sar., 2008, Baer i Geiger, 2012*). Deo istraživanja se odnosio na ekspresiju markera specifičnih za embrionalne matične ćelije, poput Nanog, SOX2 i SSEA4, ključnih markera pluripotentnosti. Analiza protočnom citometrijom pokazala je da izolovane AT-MMĆ nemaju prisutan površinski marker SSEA4, kao ni transkripcione faktore Nanog i SOX2. Obzirom da su druge studije pokazale da AT-MMĆ mogu da eksprimiraju ove molekule kako na proteinskom, tako i na genskom nivou, neophodno je da se dodatno ispita njihova ekspresija i drugim metodama (*Riekstina i sar., 2009, Sun i sar., 2009*).

Sledeći deo istraživanja odnosio se na ispitivanje uloge izolovanih AT-MMĆ u imunskom odgovoru. Imunosupresivna svojstva MMĆ opisana su u brojnim prethodnim studijama (*Krampera i sar., 2003, Aggarwal i sar., 2005*) i odnosila su se najvećim delom na MMĆ iz kostne srži. Međutim kako su MMĆ izolovane i iz brojnih drugih tkiva, ova istraživanja su proširena i pokazano je da su imunomodulatorna svojstva MMĆ posredovana kako humoralnim faktorima, tako i direktnim ćelijskim efektima (*Wang i sar., 2012, Elman i sar., 2014, Ma i sar., 2014*). Iako su imunosupresivna dejstva pokazana i za AT-MMĆ (*Puissant i sar., 2005, Yanez i sar. 2006, Ivanova-*

Todorova i sar., 2012, Leto Barone i sar., 2013), uticaj AT-MMĆ na imunski odgovor, kao i kompleksni molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi ovih efekata, su još uvek nedovoljno razjašnjeni. Najnovije studije, međutim, ukazuju da AT-MMĆ mogu imati dvojnu ulogu u regulaciji imunskog odgovora, s obzirom da kao i MMĆ poreklom iz kostne srži menjaju svoj imunski status u zavisnosti od solubilnih, ćelijskih i ostalih konstitutivnih činilaca mikrosredine u kojoj se nalaze (*McIntoch i sar., 2006, Bernardo i Fibbe, 2013, Leto Barone i sar., 2013*).

Naša istraživanja u ovoj oblasti su pokazala da AT-MMĆ imaju sposobnost inhibicije proliferacije MNC stimulisane mitogenom ili alogenom. S druge strane, pri ispitivanju uticaja AT-MMĆ na spontanu proliferaciju MNC pokazano je da AT-MMĆ mogu i stimulirati proliferaciju MNC u zavisnosti od ćelijskog odnosa primenjenog u *in vitro* testovima. Naime, stimulacija proliferacije alogernih MNC detektovana je samo kada su AT-MMĆ i MNC kultivisane u odnosu 1:10, ali ne i u odnosu 1:100. Potencijal MMĆ da indukuju aloreaktivne imunske odgovore kako u *in vitro*, tako i u *in vivo* uslovima opisana je i u drugim radovima (*Potian i sar., 2003, Nauta i sar., 2006*), pri čemu je alostimulatorna uloga MMĆ izolovanih iz kostne srži bila povezana sa ekspresijom membranskog molekula HLA-DR (*Potian i sar., 2003*). U skladu sa kriterijumima za karakterizaciju MMĆ, i u našim istraživanjima pokazano je da AT-MMĆ nisu ispoljavale HLA-DR molekul, bez obzira na poreklo. Poznato je da se ovaj molekul MHC II klase, nalazi na površini antigen-prezentujućih ćelija i da ima važnu ulogu imunskoj toleranci i transplantacijama (*Zuk i sar., 2013*). Stoga, odsustvo ovog proteina na površini AT-MMĆ može da omogućiti izbegavanje imunskog nadzora domaćina, kao i ispitivanje imunomodulatornih funkcija ovih ćelija u alogenim (životinjske AT-MMĆ) i ksenogenim modelima (miš, pacov, zec) (*Lin i sar., 2012*).

Kako bi se bolje razumeo uticaj AT-MMĆ na proliferaciju MNC, neophodna su nova dodatna istraživanja koja bi obuhvatala i ispitivanje da li je možda stimulirana proliferacija MNC od strane AT-MMĆ zapravo rezultat stimulirane proliferacije regulatorne subpopulacije T ćelija, odnosno Treg koji imaju imunosupresivnu funkciju, kao što je pokazala prethodna studija (*Crop i sar., 2010*).

U skladu sa nalazima opisanim u literaturi (*Puissant i sar., 2005*), i u našim eksperimentima inhibicioni efekat AT-MMĆ na proliferaciju MNC je pokazan kada su

MNĆ stimulisan mitogenom ili aloantigenom. Međutim, i stepen inhibicije proliferacije zavisio je od ćelijskog odnosa primenjenog u *in vitro* testovima. Naša istraživanja su se zasnivala na prethodnim nalazima (*Rasmusson i sar., 2007*) da relativno visoki odnosi MMĆ:MNĆ, 1:10 i 1:100, predstavljaju realniju fiziološku sliku odnosa ovih ćelijskih populacija, te shodno tome veći stepen inhibicije proliferacije je i detektovan pri odnosu MMĆ:MNĆ od 1:10. Da je upravo primenjeni odnos MMĆ i imunskih ćelija jedan od suštinskih problema u ispitivanju imunomodulatornog uticaja MMĆ ukazuju mnogobrojne studije u kojima su opisani stimulatorni ili inhibitorni efekti MMĆ bili zavisni od primenjenog međusobnog odnosa ćelijskih populacija (*Najar i sar., 2009, Crop i sar., 2010*). Koliko je ova problematika kompleksna, a rezultati nekonzistentni i teško uporedivi, ukazuju i podaci da su u različitim uslovima eksperimenata, korišćeni odnosi MMĆ i limfocita u rasponu od čak 1:1 do 1:100 (*Prasanna i sar., 2010, Wu i sar., 2011, Melief i sar., 2013*). Međutim, u cilju dobijanja preciznijih podataka o uticaju MMĆ na imunski odgovor, pored razmatranja samo brojčanog odnosa ćelija, neophodne su i analize koje bi definisale populacije limfocita prisutne u MNĆ, a time i uticaj MMĆ na različite subpopulacije limfocita, jer je pokazano da MMĆ mogu da utiču na aktivaciju, proliferaciju i efektorske funkcije i T, i B i NK ćelija (*Ribeiro i sar., 2013*). Dodatna poteškoća koja značajno utiče na rezultate i zaključke koje iz njih proizilaze je varijabilnost u primenjenim eksperimentalnim metodama kojima se izučavaju efekti MMĆ na imunski odgovor.

U okviru ispitivanja imunomodulatornih svojstava AT-MMĆ realizovani su i eksperimenti posvećeni istraživanju uticaja solubilnih faktora koje ove ćelije proizvode, odnosno njihovih kondicioniranih medijuma, na spontanu, mitogenom i alogenom stimulisanu proliferaciju MNĆ. Naime, mnogobrojne dosadašnje studije su pokazale da, pored direktnih ćelijskih kontakata, MMĆ mogu da moduliraju imunski odgovor i produkcijom brojnih bioaktivnih molekula (*Ghannam i sar, 2010, Bassi i sar., 2011, Chen i sar., 2011, Hass i sar., 2011*). U našim eksperimentima, pokazano je da kondicionirani medijumi AT-MMĆ nisu značajno menjali spontanu i mitogenom stimulisanu proliferaciju MNĆ. S druge strane, kondicionirani medijumi AT-MMĆ značajno su smanjili proliferaciju MNĆ u MLR nakon 3. i 6. dana kultivacije što je u skladu i sa ranije objavljenim nalazima (*Ivanova-Todorova i sar., 2012*). U do sada dostupnoj literaturi navode se rezultati da populacije MMĆ izolovane iz različitih tkiva

moгу da ispolje različite efekte na proliferaciju alogenih limfocita. Iako je pokazano da AT-MMĆ imaju slična imunosupresivna svojstva kao i MMĆ kostne srži (*Crop i sar., 2010*), njihov efekat se može razlikovati u smislu delovanja na imunske ćelije u različitim fazama njihovog razvoja i efektorskih aktivnosti. Tako je pokazano da AT-MMĆ, u odnosu na MMĆ kostne srži, povećavaju broj neaktiviranih i FoxP3⁺ T ćelija, kao i da indukuju veću inhibiciju sazrevanja B ćelija i produkcije imunoglobulina (*Puissant i sar., 2005, Hass i sar., 2011, Ribeira i sar., 2013, Purandare i sar., 2014*). Ovi svi nalazi potvrđuju da MMĆ izolovane iz različitih tkiva, ali i primenjeni eksperimentalni dizajn umnogome utiču na mehanizme i ispoljena imunomodulatorna dejstva MMĆ, što upućuje na izuzetnu važnost dodatnih istraživanja u cilju definisanja imunomodulatornog potencijala AT-MMĆ. S toga je u sledećem segmentu naših istraživanja porećena konstitutivna genska ekspresija molekula glavnog histokompatibilnog kompleksa i razlićitih parakrinih medijatora potencijalno ukljućenih u modulatorni potencijal AT-MMĆ, kod tri populacije AT-MMĆ razlićitog porekla. Rezultati su pokazali da AT-MMĆ izolovane iz zdravog donora, kao i AT-MMĆ poreklom od pacijenata koji su imali tumore ispoljavaju slićan nivo ekspresije molekula klase I i klase II glavnog histokompatibilnog kompleksa, HLA-A i HLA-DR, kao i citokina IL-6 i TGF-β.

Ekspresija iRNK za HLA-DR je bila donekle neoćekivana s obzirom da kod istih ćelija ovaj molekul nije bio ekspimiran kao površinski marker. Mećutim, ćesti navodi u literaturi pokazuju da ovaj imunogen nije konstitutivno ispoljen na MMĆ, ali da se detektuje na ćelijama kada su MMĆ stimulisane, odnosno kada se nalaze u inflamatornom miljeu (*Najar i sar., 2012*). Takoće, postoje i studije koje su pokazale da MMĆ mogu ekspimirati unutarćelijski HLA-DR, koji se ispoljava na površini ćelija samo ukoliko su ćelije izloćene inflamatornim citokinima (*Le Blanc i sar., 2003, Romieu-Mourez i sar., 2007*). S druge strane, AT-MMĆ na genskom nivou nisu konstitutivno ekspimirale HLA-G5, molekul poznat kao jedan od glavnih medijatora imunosupresije, koji je povezan i sa indukcijom Treg. I ovaj nalaz je bio delimićno neoćekivan, s obzirom na prethodna istraživanja u kojima je pokazano da MMĆ ekspimiraju ovaj gen (*Lee i sar., 2012*).

Slićan nivo konstitutivne genske ekspresije citokina IL-6 i TGF-β kod sve tri populacije AT-MMĆ ukazuje da bez obzira na poreklo, AT-MMĆ mogu da

ekspimiraju ove molekule, koje ispoljavaju brojne efekte od važnosti za regulaciju interakcija AT-MMĆ sa imunskim i tumorskim ćelijama, delujući na rast, razvoj, migraciju, invaziju, proliferaciju, apoptozu, diferencijaciju ćelija (Jones, 2005, Yagi i sar., 2010, Guo i sar., 2012). S druge strane, neujednačena genska ekspresija enzima IDO-1 i COX2 na ispitivanim populacijama AT-MMĆ ukazuje na neophodnost dodatnih ispitivanja učešća ovih molekula u interakcijama MMĆ sa drugim ćelijama, uključujući i imunske ćelije (Ryan i sar., 2005, Yagi i sar., 2010, Han i sar., 2012).

S obzirom na važnu ulogu inflamatorne mikrosredine na imunomodulatorni fenotip MMĆ, određivano je i dejstvo proinflamatornih citokina, IFN- γ i TNF- α , na gensku ekspresiju ispitivanih molekula potencijalno povezanih sa imunomodulatornim funkcijama AT-MMĆ. Rezultati su pokazali da je tretman AT-MMĆ sa citokinima IFN- γ i TNF- α , pojedinačno ili u kombinaciji, doveo do povećanja ekspresije iRNK gotovo za sve ispitivane molekule, što je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima (Crop i sar., 2010). Najizraženije povećanje uočeno je kod genske ekspresije molekula klase I i klase II glavnog histokompatibilnog kompleksa, odnosno kod HLA-A i HLA-DR. S obzirom da je ekspresija ovih molekula jedan od primarnih uslova za bezbednu i efikasnu alogenu primenu MMĆ u ćelijskoj terapiji, ekspresije HLA molekula i na proteinskom nivou, odnosno na površini samih ćelija moraju biti ispitani za svaku izolovanu populaciju AT-MMĆ, kao i za svaku konkretnu terapijsku primenu. Nalazi neujednačene konstitutivne genske ekspresije enzima IDO-1 i COX2 na ispitivanim populacijama AT-MMĆ, ponovili su se i nakon delovanja ispitivanih proinflamatornih citokina, što je potvrdilo važnost ispitivanja učešća ovih molekula u efektima MMĆ, s obzirom da su i IDO-1 (Hoogdujin i sar., 2010) i COX2 (Kim i sar., 2013, Manfredini i sar., 2013), uz IL-6 i TGF- β , među najvažnijim solubilnim faktorima koji oblikuju imunomodulatorni uticaj MMĆ.

Imajući sve ovo u vidu, dobijeni rezultati ukazuju na važnu činjenicu da u okviru izuzetnog imunomodulatornog potencijala AT-MMĆ, imunosupresivno delovanje nije konstitutivna osobina samih MMĆ, već da zavisi od niza faktora koji su najčešće uzrokovani specifičnom mikrosredinom u kojoj MMĆ ostvaruju svoje efekte, a počev od njihove relativne koncentracije i vremena i faze imunskog odgovora u kojoj se uključuju, preko citokinskog i hemokinskog miljea, do kombinacije pozitivnih i negativnih signala iz mikrosredine koji mogu da pospeše ili da onemoguće njihove

imunosupresivne mehanizme. S toga, prilikom odlučivanja o potencijalnoj primeni MMĆ u terapijske svrhe, i to ne samo AT-MMĆ već MMĆ uopšte, od posebne važnosti su detaljna ispitivanja mikrosredine ciljnog tkiva i karakterističnih citokinskih profila same bolesti i individualnih pacijenata.

Pored ključne uloge MMĆ u okviru regenerativnog sistema, specifično usmerenoj ka reparaciji oštećenog tkiva u hroničnoj inflamaciji ili nakon ozlede, novija istraživanja su ukazala da MMĆ imaju kapacitet da migriraju ka tumorima i učestvuju u formiranju tumorske mikrosredine/strome (*Hass i Otte, 2012*). Pokazano je da MMĆ u tumorskoj mikrosredini mogu da ispoljavaju svoju imunosupresivnu funkciju (*Han i sar., 2012*), kao i da imaju važnu ulogu u rezistenciji tumorskih ćelija na terapeutike (*Houthuijzen i sar., 2012*). Za AT-MMĆ je takođe pokazano da u patološkim stanjima mogu da migriraju u tumorska tkiva, utičući na progresiju tumora, kao i da mogu da budu izvor stromalnih ćelija u tumorskom tkivu koje podržavaju rast, invaziju i metastazu tumora (*Jotzu i sar., 2011*).

Tumor dojke je najčešći oblik malignog oboljenja kod žena danas. U okviru terapije ovog kompleksnog i heterogenog oboljenja, često je uključena i rekonstruktivna hirurgija, a kako je masno tkivo najzastupljenije tkivo dojke, strukturni nosači od masnog tkiva, kao i MMĆ izolovane iz masnog tkiva su jedan od najnovijih pristupa ovom vidu regenerativne medicine. Međutim, uloga interakcija AT-MMĆ i tumorskih ćelija dojke u razvoju tumorskog tkiva nije dovoljno razjašnjena, i iako postoje podaci o tome da MMĆ mogu da stimulišu razvoj tumora (*Houthuijzen i sar., 2012*), ne postoji dovoljno podataka o ćelijskim interakcijama AT-MMĆ i tumorskih ćelija. Takođe, većina prethodnih studija je izvođena sa MMĆ poreklom iz zdravih donora, što značajno ograničava razumevanje na koji način patološka mikrosredina može da utiče na fenotip ili reaktivnost MMĆ ukoliko su one poreklom iz tkiva pridruženog tumoru.

U našim istraživanjima analizirani su efekti AT-MMĆ na modelu MCF-7 tumorske ćelijske linije adenokarcinoma dojke, određivanjem *in vitro* uticaja MMĆ na funkcionalne osobine tumorskih ćelija. Početna istraživanja su obuhvatala ispitivanje efekata AT-MMĆ na proliferaciju MCF-7 ćelija, kako na nivou direktnih, tako i na nivou indirektnih ćelijskih kontakata. Rezultati su pokazali da sve ispitivane populacije AT-MMĆ, kako poreklom iz zdravog donora, nAT-MMĆ, tako i poreklom od

pacijenata koji su imali tumore, tAT-MMĆ i tdAT-MMĆ, u direktnom kontaktu sa tumorskim ćelijama značajno stimulišu proliferaciju MCF-7 ćelija nakon 24h ko-kultivacije, te da je ova stimulacija bila izraženija kod tAT-MMĆ i tdAT-MMĆ, mezenhimalnih ćelija poreklom iz tumora. Takođe je pokazano da pri ko-kultivaciji od 48h, stimulacija proliferacije tumorskih ćelija je bila i dalje prisutna, ali ne tako izražena kao nakon 24h inkubacije. Dodatno, kada su AT-MMĆ i MCF-7 bile kultivisane fizički razdvojene u „transwell“ sistemu, sve ispitivane AT-MMĆ su takođe značajno stimulisale proliferaciju MCF-7 ćelija. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim studijama koje su pokazale da MMĆ prisutne u tkivu tumora mogu da stimulišu razvoj tumora dojke (Kucerova i sar., 2010, Zimmerlin i sar., 2011, Hass i Otte, 2012). S obzirom da su sve testirane AT-MMĆ populacije, bez obzira na poreklo, stimulisale proliferaciju MCF-7 ćelija u direktnim ko-kulturama, prethodno pokazana sposobnost tumorskih ćelija da indukuju „reaktivne“ stromalne ćelije koje podržavaju razvoj tumora (Kidd i sar., 2012, Zhao i sar., 2012), ne može da bude isključena kao mehanizam pokazanog efekta. Takođe, alostimulatorna funkcija ispitivanih AT-MMĆ, zapažena u odnosu na MNĆ, može biti uključena i u ovaj efekat.

Kako je stimulacija proliferacije MCF-7 ćelija u našim eksperimentima bila prisutna i kada je izbegnut direktni ćelijski kontakt sa AT-MMĆ, sledeća ispitivanja su bila posvećena analizi uticaja solubilnih faktora produkovanih od strane MMĆ. U tu svrhu korišćeni kondicionirani medijumi sva tri tipa AT-MMĆ prikupljeni nakon 48h kultivacije MMĆ, inhibirali su proliferaciju tumorskih ćelija, pri čemu su kondicionirani medijumi prikupljeni od AT-MMĆ poreklom od pacijenata koji su imali tumore, tAT-MMĆ i tdAT-MMĆ, imali izraženiji antiproliferativni efekat u odnosu na kondicionirani medijum nAT-MMĆ izolovanih iz masnog tkiva zdravog donora.

Da bi ispitali da li je ovaj efekat posledica citotoksičnosti ispitivanih kondicioniranih medijuma, odnosno molekula koji se nalaze u njima, analizirali smo efekat kondicioniranog medijuma tAT-MMĆ i na drugim ćelijskim linijama, i to kako tumorskim (ćelijske linije kancera prostate PC3 i adenokarcinoma debelog creva SW-480), tako i na normalnoj liniji endotelskih ćelija (EA.hy 926) i primarnim mezenhimalnim matičnim ćelijama zubne pulpe (ZP-MMĆ). Rezultati su pokazali da je kondicionirani medijum ovih ćelija inhibirao proliferaciju i drugih tumorskih ćelija, dok u isto vreme nije značajno uticao na proliferaciju E.A.hy 926 ćelija i ZP-MMĆ. Ovakvi

rezultati su pokazali da su efekti kondicioniranog medijuma tAT-MMĆ zavisni od tipa ćelija na koje deluju i još jednom ukazali da se efekti AT-MMĆ moraju ispitivati u kontekstu specifične mikrosredine. Poput prethodno opisanih rezultata da MMĆ mogu da stimulišu rast tumora, i ovi rezultati su u skladu sa prethodno opisanim istraživanjima u kojima su MMĆ inhibirale proliferaciju tumorskih ćelija *in vitro* i *in vivo* (Mishra i Merlino, 2008, Qiao i sar., 2008, Fonseka i sar., 2012), što tumačenje kontraverznih rezultata studija o interakcijama MMĆ i tumorskih ćelija dodatno čini još složenijim. Inhibitorni efekti kondicioniranih medijuma AT-MMĆ kao posledica sekretornog potencijala MMĆ mogu se pripisati brojnim regulatornim molekulima osobočenim prilikom kultivacije ćelija (Casiraghi i sar, 2013), za koje je poznato da mogu da moduliraju proliferaciju tumorskih ćelija ili njihov ćelijski ciklus, poput IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-2 i IL-12 (Nakamura i sar., 2004, Ramasamy i sar., 2007, Seo i sar., 2011, Ahn i sar., 2013, Ryu i sar., 2014, Yang i sar., 2014). S toga je u cilju razumevanja ovih efekata neophodna identifikacija pojedinačnih solubilnih faktora produkovanih od strane MMĆ i detaljnija analiza njihovog delovanja.

Saglasno sa prethodno opisanim efektima direktnih ćelijskih kontakata AT-MMĆ i tumorskih ćelija koji su se razlikovali i zavisili od dužine vremena ko-kultivacije ćelija, pored kondicioniranih medijuma prikupljenih nakon 48h kultivacije MMĆ, u našim istraživanjima pratili smo i efekte kondicioniranih medijuma, prvenstveno AT-MMĆ poreklom od pacijenata koji su imali tumore, tAT-MMĆ i tdAT-MMĆ, prikupljenih nakon 24h kultivacije ćelija. Rezultati su pokazali da i kondicionirani medijumi prikupljeni u različitim terminima kultivacije MMĆ ispoljavaju različite efekte na proliferaciju MCF-7 ćelija, s obzirom da su kondicionirani medijumi prikupljeni nakon 24h blago stimulisali proliferaciju MCF-7 ćelija, za razliku od kondicioniranih medijuma prikupljenih nakon 48h koji su uzrokovali inhibiciju proliferacije MCF-7 ćelija. U nemogućnosti direktnog merenja prisustva i koncentracije izlučenih aktivnih molekula u kondicioniranim medijumima, o uzrocima različitog delovanja 24h- i 48h-kondicioniranih medijuma AT-MMĆ se može samo spekulisati. Međutim, kao i u slučaju direktnih ćelijskih kontakata, i rezultati mnogobrojnih savremenih istraživanja su pokazali da kondicionirani medijumi, odnosno sekretorni faktori poreklom od MMĆ mogu da stimulišu proliferaciju tumorskih ćelija *in vitro* i *in vivo* (Heo i sar., 2011, Liu i sar., 2011, Mognetti i sar., 2013), ali i da efekat može da bude i inhibitoran na

proliferaciju tumorskih ćelija (*Li i sar., 2011, Yang i sar., 2014*), pri čemu su razlike u rezultatima pripisivane različitim ćelijama korišćenim u studijama, kako MMC (*Kucerova i sar., 2010, Mognetti i sar., 2013*), tako i tumorskim ćelijama dojke, (*Liu i sar., 2011*), prostate (*Zhang i sar., 2013*), glioma (*Yang i sar., 2014*). Pored uticaja na rast/proliferaciju ćelija tumora, posebno se u literaturi ističe i heterogenost uticaja MMC na različite faze tumorskog razvoja, jer je pokazano da MMC mogu da inhibiraju ili da nemaju uticaj na proliferaciju tumorskih ćelija, ali da mogu da stimulišu angiogenezu, proces epitelo-mezenhimske tranzicije, migraciju i metastazu tumorskih ćelija (*Devarajan i sar., 2012, Keramidas i sar., 2013, Rowan i sar., 2014*). Takođe, brojna istraživanja pokazala su da su mehanizmi kojima MMC promovišu razvoj tumora zavisni i od komunikacije između MMC i ciljnih ćelija i da ova mećućelijska komunikacija uključuje kako bioaktivne molekule produkovane od strane MMC, tako i povratni uticaj tumorskih ćelija na MMC (*Mishra i Merlino, 2008, Jotzu i sar., 2011*), koje produkcijom brojnih solubilnih faktora mogu da utiču na osobine i funkcije MMC (*Al-toub i sar., 2013, Sun i sar., 2014*). S obzirom da je poznato da lokalno tkivo determiniše i usmerava funkcionalnu heterogenost MMC, i efekti MMC na tumorske ćelije su najverovatnije povezani sa specifičnom ćelijskom mikrosredinom (*Hass i Otte, 2012*) u kojoj ćelijske interakcije i signali mikrosredine predstavljaju faktore održavanja i MMC i tumorskih ćelija. Stoga su u našem istraživanju paralelno ispitivani i efekti kondicioniranih medijuma tdAT-MMC prikupljenih nakon 24h tretmana ćelija sa proinflamatornim citokinima (IFN- γ i TNF- α), kako bi se utvrdilo da li i na koji način inflamatorna sredina utiče na efekte AT-MMC na tumorske ćelije, s obzirom da je u prethodnim studijama pokazano da inflamatorni citokini mogu značajno da moduliraju efekte solubilnih faktora MMC na proliferaciju tumorskih ćelija (*Jing i sar., 2012, Liu i sar., 2011*). Pored modulatornog uticaja na MMC, pokazano je da inflamatorni citokini sami, IFN- γ i TNF- α , utiču na razvoj tumora. Tako je pokazano da IFN- γ , koji se koristi u kliničkim terapijama malignih oboljenja (*Haabeth i sar., 2011, Lüth i sar., 2011*) može i da stimuliše razvoj tumora (*Zaidi i sar., 2011*). Takođe, TNF- α može imati antiproliferativni uticaj na tumorske ćelije (*Vaughan i sar., 2013*), ali može i da stimuliše razvoj tumora (*Storci i sar., 2010, Soria i sar., 2011*). U našim eksperimentalnim uslovima, kondicionirani medijumi AT-MMC pretretiranih sa proinflamatornim citokinima su različito delovali na proliferaciju MCF-7 ćelija, pri

čemu je kondicionirani medijum prikupljen od strane AT-MMĆ pretretiranih sa TNF- α imao izraženije stimulatorno dejstvo od onih pretretiranih samo sa INF- γ ili sa njihovom kombinacijom. I u prethodnim istraživanjima je pokazano da IFN- γ i TNF- α povećavaju stimulišući efekat MMĆ kostne srži na tumorske ćelije hepatocelularnog tumora (*Jing i sar., 2012*) i tumora debelog creva (*Liu i sar., 2011*). Pored proliferacije MCF-7 ćelija, praćen je i uticaj direktnih ćelijskih kontakata tdAT-MMĆ, kao i kondicioniranih medijuma na sposobnost formiranja kolonija tumorskih ćelija. Rezultati su pokazali da su za formiranje kolonija MCF-7 ćelija neophodni direktni ćelijski kontakti sa AT-MMĆ, s obzirom da solubilni faktori AT-MMĆ nisu indukovali značajno formiranje kolonija MCF-7 ćelija. Slični rezultati su pokazani na MMĆ kostne srži, pri čemu su inflamatorni faktori indukovali stvaranje imunosupresivnog fenotipa MMĆ koji je stimulisao stvaranje CFU kolonija i sferoida tumorskih ćelija dojke (MDA-MB-231), pankreasa (PANC-1) i jajnika (SKOV3, MOSEC OVCAR) (*Waterman i sar., 2012*).

Kako uprkos opsežnim istraživanjima poslednjih godina, uticaj MMĆ na progresiju tumora nije jasno definisan, u nastavku istraživanja posebna pažnja je posvećena ispitivanju efekata kondicioniranih medijuma tdAT-MMĆ, odn. MMĆ izolovanih iz masnog tkiva pridruženog tumorskom tkivu dojke, na različite funkcije MCF-7 tumorskih ćelija. Pored uticaja na proliferaciju tumorskih ćelija, ispitivani su i efekti 24h-kondicioniranih medijuma na adheziju, migraciju i epitelo-mezenimsku tranziciju, procese koji su zasnovani na povećanju pokretljivosti i promeni fenotipa tumorskih ćelija, a koji za posledicu imaju metastazu tumorskih ćelija. Sposobnost adhezije za podlogu je važna osobina tumorskih ćelija, koja je direktno povezana sa sposobnošću ćelija da formiraju kolonije, migracijom i invazivnošću (*Chekhun i sar., 2013*). U našim istraživanjima, pokazano je da solubilni faktori prisutni u AT-MMĆ dovode do značajnog opadanja nivoa adhezije MCF-7 ćelija. Obzirom da je ćelijska adhezija regulisana i brojnim adhezivnim molekulima (*Chekhun i sar., 2013*), u narednim istraživanjima je neophodno ispitati ekspresiju različitih adhezivnih molekula poput molekula E-kadherina kod MCF-7 ćelija kao i uticaj MMĆ na njihovu ekspresiju.

U sledećem delu istraživanja, ispitivan je migratorni potencijal MCF-7 ćelija i uticaj. U prethodnim studijama je pokazano da MCF-7 tumorske ćelije nemaju veliku spontanu sposobnost migracije i invazivnosti (*Cos i sar., 1998*), te smo ovim eksperimentima ispitivali da li solubilni faktori AT-MMĆ koji se nalaze u njihovom

KM, utiču na migraciju MCF-7 ćelija. Pokazano je da KM AT-MMĆ značajno stimulišu migraciju MCF-7 ćelija, kao i da inflamatorni citokini, IFN- γ i TNF- α , pojedinačno ili u kombinaciji povećavaju ovu stimulaciju. Ovi rezultati su u skladu sa prethodnim istraživanjima koji pokazuju da solubilni faktori MMĆ izolovanih iz kostne srži stimulišu migraciju različitih kako tumorskih ćelijskih linija dojke (*De Luca i sar., 2012*) i prostate (*Mognetti i sar., 2013*), dok je s druge strane pokazano da kondicionirani medijum AT-MMĆ stimuliše migraciju normalnih ćelija kao što su fibroblasti (*Zhao i sar., 2013*). Pored toga, u prethodnim studijama je pokazano da inflamatorni citokini povećavaju stimulaciju migracije tumorskih ćelija jajnika, posredovanu MMĆ izolovanim iz kostne srži (*Jing i sar., 2012*). Migracija tumorskih ćelija u cirkulaciju i druge delove tkiva i organa povezana je sa ekspresijom enzima koji učestvuju u razgradnji postojećeg ekstracelularnog matriksa, pre svega urokinaza (uPA) i matriksnih metaloproteinaza (MMP). Naši rezultati su pokazali da solubilni faktori AT-MMĆ mogu da stimulišu ekspresiju enzima i uPA i MMP2 kod MCF-7 ćelija, i to kako na proteinskom, tako i na genskom nivou. Takođe, pokazano je da kondicionirani medijum AT-MMĆ stimuliše i enzimsku aktivnost ćelijski-vezanih urokinaza, dok isti efekat nije pokazan za enzimsku aktivnost MMP2 kod tumorskih ćelija. Ispitivanja mehanizama koji učestvuju u povećanju ekspresije uPA, na tumorskim ćelijama su od posebnog značaja obzirom da je iz ranijih studija poznato da je uPA enzim koji učestvuje u regulaciji migracije i invazivnosti tumorskih ćelija dojke i da se njegov povećan nivo povezuje sa lošom prognozom kod obolelih (*Weigelt, 2005, Giannopoulou i sar., 2007*).

Metastaza tumorskih ćelija je velikim delom uslovljena i procesom epitelo-mezenhimske tranzicije (EMT) adherentnih epitelnih ćelija u migratorno mezenhimsko stanje. U ovom procesu tumorske ćelije postaju cirkulišuće poprimaju i neka svojstva matičnih ćelija, kao što su diferencijacija i samoobnavljanje, a koja se nakon naseljavanja novih tkiva i formiranja novih tumora, gube u procesu mezenhimsko-epitelne tranzicije. Tokom epitelo-mezenhimske tranzicije, tumorske ćelije smanjuju ekspresiju E-kadherina, proteina koji ima ulogu u održavanju mećućelijskih kontakata epitelnih ćelija, a pri tome dolazi i do promene lokalizacije β -katenina koji je vezan za molekul E-kadherina sa unutarćelijske strane, tako da β -katenin iz citoplazme prelazi u nukleus, gde funkcioniše kao aktivator limfoidnog transkripcionog faktora (LEF,

Lymphoid Enhancer Factor), i utiče na ćelijsku adheziju i razvoj tumora (*Tian i sar., 2011*). S druge strane, tumorske ćelije tokom epitelo-mezenhimske tranzicije povećavaju ekspresiju mezenhinskog proteina Vimentina, čime stiču mezenhimski fenotip (*Brabletz, 2012*). Uloga epitelo-mezenhimske tranzicije u migraciji ćelija primarnih tumora ka metastaskim udaljenim mestima tela je vrlo važna, a uticaj MMĆ na EMT tumorskih ćelija je predmet mnogih aktuelnih istraživanja (*Brabletz, 2012, Barcellos-de-Souza i sar., 2013, Yu i sar., 2013, Sun i sar., 2014*).

Naša ispitivanja su pokazala da je ekspresija transmembranskog glikoproteina E-kadherina, smanjena, a ekspresija Vimentina povećana kod MCF-7 ćelija nakon kultivacije sa kondicioniranim medijumom AT-MMĆ, što ukazuje na to da je kondicionirani medijum AT-MMĆ stimulisao epitelo-mezenhimsku tranziciju kod MCF-7 ćelija. Međutim, ispitivanjem ekspresije β -katenina nije pokazana i njegova translokacija iz citoplazme u nukleus MCF-7 ćelija, iako je ekspresija E-kadherina bila istovremeno smanjena, što može da bude posledica dugotrajnog tretmana MCF-7 ćelija (6 dana), tokom kog dolazi do *de novo* sinteze β -katenina u citoplazmi. Ovakvi nalazi su u skladu sa drugim istraživanjima u kojima je pokazano da MMĆ izolovane iz kostne srži spontano (*Mele i sar., 2014*) ili pod uticajem inflamatornih citokina (*Jing i sar., 2012*), stimulišu proces epitelo-mezenhimske tranzicije tumorskih ćelija debelog creva.

Nakon pokazane stimulacije genske ekspresije TGF- β kod AT-MMĆ koje su bile izložene proinflamatornim citokinima IFN- γ i TNF- α , u sledećem segmentu istraživanja pokušali samo da utvrdimo da li je zaista molekul TGF- β uključen u stimulaciju migracije i epitelo-mezenhimske tranzicije kod MCF-7 ćelija posredovnu kondicioniranim medijumom AT-MMĆ (*Hung i sar., 2013*). Naša pretpostavka da bi TGF- β mogao da bude uključen u modulaciju migracije i epitelo-mezenhimske tranzicije tumorskih ćelija, proizilazi i iz literaturnih podataka da molekul TGF- β može da bude produkovan od strane MMĆ tokom njihove aktivnosti pri reparaciji tkiva, ali i nakon stimulacije inflamatornim faktorima, kada TGF- β ispoljava svoju imunosupresorsku funkciju (*Hass i Otte, 2012*), kao i da može da stimuliše migraciju i metastazu tumorskih ćelija prostate (*Ye i sar., 2012*). Takođe, pokazano je i da hipoksija, ali i direktni ćelijski kontakti MMĆ i tumorskih ćelija mogu da indukuju produkciju TGF- β od strane MMĆ (*Hung i sar., 2013, Mele i sar., 2014*). S obzirom da smo u našim istraživanjima ispitivali uticaj tdAT-MMĆ, koje su prethodno bile u

tumorskom okruženju, možemo da pretpostavimo da ove ćelije imaju potencijal da produkuju TGF- β , a ostaje da se ispita da li je ovaj molekul zaslužan za stimulatorno dejstvo na proliferaciju MCF-7 ćelija kada su one bile u direktnim ili indirektnim ćelijksim kontaktima sa AT-MMĆ, kao što je pokazano u drugim istraživanjima (*Mele i sar., 2014*). Zapravo, inflamatorni faktori normalne ili tumorske sredine mogu delovati na MMĆ, tako da one ispolje svoj imunosupresivni potencijal, koji zauzvrat ćelije u okruženju (meću kojima mogu da budu i tumorske) primaju kao signal koji reguliše imunološki nadzor (*Hong i sar., 2014*).

U cilju potvrđivanja ove pretpostavke, u eksperimente je uvođenjem farmakološkog inhibitora za TGF- β receptor I (SB505124), pokazano da se u prisustvu ovog inhibitora poništava stimulatorni efekat kondicioniranog medijuma tdAT-MMĆ na migraciju MCF-7 ćelija. Takođe, SB505124 je poništio i stimulatorno dejstvo kondicioniranog medijuma tdAT-MMĆ na proteinsku i gensku ekspresiju uPA kod MCF-7 ćelija. Kako je poznato da je TGF- β uključen u kontrolu migracije tumorskih ćelija (*Drabsch i sar., 2012*) kao i da je njegova uloga posredovana aktivacijom uPA kod tumorskih ćelija (*Mandel i sar., 2013*), ovi rezultati su uputili na pretpostavku da bi TGF- β mogao da bude odgovoran za efekte AT-MMĆ na migraciju MCF-7 ćelija. Međutim, u narednim ispitivanjima neophodno je da se odredi da li se TGF- β molekul produkovan od strane AT-MMĆ (iako je pokazana genska ekspresija), vezuje za TGF- β receptor na MCF-7 ćelijama, aktivirajući i uPA sistem, a time i migraciju ćelija, ili je neki od drugih solubilnih faktora prisutnih u kondicioniranom medijumu tdAT-MMĆ sposoban da aktivira postojeću TGF- β -uPA petlju u MCF-7 tumorskim ćelijama.

Pored migracije, ispitivana je i potencijalna uloga TGF- β u kondicionirani medijum tdAT-MMĆ-posredovanoj epitelo-mezenhimskoj tranziciji MCF-7 ćelija. U prisustvu SB505124 inhibitora došlo je do poništavanja inhibitornog dejstva kondicioniranog medijuma AT-MMĆ na ekspresiju E-kadherina, kao i stimulatornog dejstva na ekspresiju Vimentina kod MCF-7 ćelija. Ovakvi nalazi naveli su nas da pretpostavimo da TGF- β molekul, produkovan od strane AT-MMĆ, može biti potencijalni medijator procesa epitelo-mezenhimske tranzicije tumorskih ćelija. U prilog ove pretpostavke su i prethodna istraživanja u kojima je pokazano da je TGF- β prisutan u kondicioniranom medijumu MMĆ izolovanih iz kostne srži (*Jing i sar., 2012*), ali i da je ovaj molekul vezan za površinu ćelijske membrane MMĆ, slično kao

što je to pokazano kod $CD4^+CD25^+$ T ćelija, koje zahvaljujući membranski vezanom TGF- β , a posredstvom direktnih ćelijskih kontakata ostvaruju svoje imunosupresorske funkcije (*Mele i sar., 2014*).

Na osnovu pokazanih rezultata, možemo da zaključimo da masno tkivo predstavlja potencijalno dobar izvor MMC, te da su AT-MMC uspešno izolovane iz masnog tkiva zdravih osoba i pacijenata sa tumorima. Između izolovanih populacija AT-MMC nije primećena značajna razlika u osobinama koje su neophodne za njihovu karakterizaciju, i moraju da budu ispunjene prema kriterijumima Društva za ćelijsku terapiju. Multipotentni potencijal diferencijacije AT-MMC čini ove ćelije potencijalno dobrim kandidatima za regenerativnu medicinu i ćelijsku terapiju, kao i imunomodulatorno delovanje koje nije konstitutivna osobina AT-MMC već je zavisna od faktora mikrosredine. Stimulatorna uloga AT-MMC u proliferaciji, migraciji i epitelomezenhimske tranziciji tumorskih ćelija, upozorava da mikrosredina može značajno da modulira kako karakteristike tako i funkcionalna svojstva AT-MMC, tako da uloga ovih ćelija u patološkim stanjima mora da bude detaljno ispitana pre njihove potencijalne terapijske primene.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu prethodno izloženih ciljeva i predstavljenih rezultata, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Uspešno su izolovane mezenhimske matične ćelije masnog tkiva (AT-MMĆ) zdravih osoba i pacijenata sa malignim bolestima, pri čemu:

- Izolovane AT-MMĆ ispoljavaju adherentnost za plastiku i morfologiju karakterističnu za mezenhimske matične ćelije (MMĆ)
- Izolovane AT-MMĆ pokazuju proliferativni i klonogeni kapacitet koji su u skladu sa literaturnim podacima
- Izolovane AT-MMĆ ekspimiraju mezenhimske površinske markere, dok ne ekspimiraju markere hematopoetskih ćelija. Imunofenotip AT-MMĆ izolovanih iz različitih tipova masnog tkiva je sličan.
- Izolovane AT-MMĆ ekspimiraju unutarćelijske proteinske markere karakteristične za MMĆ
- Izolovane AT-MMĆ ne ekspimiraju markere embrionalnih matičnih ćelija na proteinskom nivou
- Izolovane AT-MMĆ imaju multipotentni potencijal diferencijacije pokazujući sposobnost osteogeneze, adipogeneze, hondrogenoze i miogeneze

2. Ispitivanja imunomodulatornih funkcija AT-MMĆ pokazala su da:

- Izolovane AT-MMĆ u zavisnosti od brojčanog odnosa: stimulišu proliferaciju alogenih MNĆ, dok inhibiraju proliferaciju mitogenom i aloantigenom stimulisanih MNĆ
- Kondicionirani medijumi AT-MMĆ ne utiču na spontanu i mitogenom stimulisanu proliferaciju MNĆ, dok značajno inhibiraju proliferaciju MNĆ stimulisanu aloantigenom
- Izolovane AT-MMĆ konstitutivno ekspimiraju iRNK za molekule koji su važni za njihove imunomodulatorne funkcije: HLA-A, HLA-DR, IDO-1, COX2, IL-6 i TGF- β

- Inflamatorni citokini IFN- γ i TNF- α , samostalno ili u kombinaciji, dovode do povećanja ekspresije iRNK molekula koji su važni za imunomodulatorne funkcije AT-MMĆ: HLA-A, HLA-DR, HLA-G5, COX2, IDO-1, IL-6 i TGF- β

3. Ispitivanja uticaja AT-MMĆ na tumorske ćelije pokazala su da:

- Izolovane AT-MMĆ kako iz masnog tkiva zdravih osoba tako i pacijenata sa malignitetom:
 - na nivou direktnih i indirektnih ćelijskih kontakata stimulišu proliferaciju MCF-7 ćelija (tumorske ćelije adenokarcinoma dojke)
 - kondicionirani medijumi AT-MMĆ (kultivisanih 24h) stimulišu proliferaciju MCF-7
 - kondicionirani medijumi AT-MMĆ (kultivisanih 48h) inhibiraju proliferaciju MCF-7

4. Ispitivanja uticaja AT-MMĆ poreklom iz masnog tkiva pridruženog tumoru dojke (tdAT-MMĆ) tretiranih inflamatornim citokinima IFN- γ i/ili TNF- α i njihovih kondicioniranih medijuma na MCF-7 ćelije pokazala su da:

- kondicionirani medijumi tretiranih tdAT-MMĆ stimulišu proliferaciju MCF-7 ćelija
- tretirane tdAT-MMĆ stimulišu formiranje CFU kolonija MCF-7 ćelija, dok kondicionirani medijumi tretiranih tdAT-MMĆ nemaju efekat na formiranje CFU kolonija MCF-7 ćelija
- Kondicionirani medijum tretiranih tdAT-MMĆ inhibira adheziju tumorskih ćelija, dok s druge strane stimuliše migraciju MCF-7 ćelija
- Kondicionirani medijumi tdAT-MMĆ stimulišu epitelo-mezenhimsku tranziciju tumorskih ćelija, redukujući ekspresiju E-kadherina i povećavajući ekspresiju Vimentina kod MCF-7 ćelija

- Kondicionirani medijumi tretiranih tdAT-MMĆ povećavaju enzimsku aktivnost, proteinsku i gensku ekspresiju urokinaza (uPA), dok ne utiču na enzimsku aktivnost matriksnih metaloproteinaza 2 (MMP2), ali povećavaju njihovu proteinsku i gensku ekspresiju kod MCF-7 ćelija
- Kondicionirani medijumi tretiranih tdAT-MMĆ redukuju proteinsku i gensku ekspresiju E-kadherina, a povećavaju proteinsku i gensku ekspresiju Vimentina kod MCF-7 ćelija
- Efekat kondicioniranog medijuma tdAT-MMĆ na migraciju i epitelo-mezenhimsku tranziciju MCF-7 ćelija se ostvaruje posredstvom TGF- β , pri čemu se u prisustvu farmakološkog inhibitora receptora za TGF- β :
 - poništava stimulacija migracije MCF-7 ćelija ostvarena pri kultivaciji sa kondicioniranim medijumima tretiranih tdAT-MMĆ, uz smanjenje proteinske i genske ekspresije urokinaza (uPA).
 - poništava stimulacija epitelo-mezenhimske tranzicije MCF-7 ćelija, blokiranjem redukcije proteinske ekspresije E-kadherina i povećanja proteinske ekspresije Vimentina, ostvarene pri kultivaciji sa kondicioniranim medijumom tretiranih tdAT-MMĆ.

6. LITERATURA

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and molecular immunology. 7 th ed.Elsevier 2012, Philadelphia, PA. ISBN 978-1-4377-1528-6, 2012.

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4):1815-22, 2005.

Aggarwal BB, Gehlot P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Curr Opin Pharmacol*. Aug;9(4):351-69, 2009.

Ahn Jo, Lee Hw, Seo Kw, Kang Sk, Ra Jc, Youn Hy. Anti-tumor effect of adipose tissue derived-mesenchymal stem cells expressing interferon- β and treatment with cisplatin in a xenograft mouse model for canine melanoma. *PLoS One*, 8(9):e74897, 2013.

Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol*, 66(1):1-9, 2008.

Allen, TD. Ultrastructural aspects of in vitro haemopoiesis. In *The Second Symposium of the British Society for Cell Biology on Stem Cells and Tissue Homeostasis*, B.I. Lord, C. Potten, and D. Cole, eds. (Cambridge, UK: Cambridge University Press), p. 217. (1978).

Al-toub M, Almusa A, Almajed M, Al-Nbaheen M, Kassem M, Aldahmash A, Alajez NM. Pleiotropic effects of cancer cells' secreted factors on human stromal (mesenchymal) stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 4(5):114, 2013.

Ankrum JA, Ong JF, Karp JM. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat Biotechnol* 32(3):252-60, 2014.

Baer PC, Geiger H. Adipose-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells: Tissue Localization, Characterization, and Heterogeneity. *Stem Cells International* doi:10.1155/2012/812693, 2012.

Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kawamata M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. IFATS collection: in vivo therapeutic potential of human adipose tissue mesenchymal stem cells after transplantation into mice with liver injury. *Stem Cells*, 26(10):2705-12, 2008.

Bao Y, Liu X, Han C, Xu S, Xie B, Zhang Q, Gu Y, Hou J, Qian L, Qian C, Han H, Cao X. Identification of IFN- γ -producing innate B cells. *Cell Res*, 24(2):161-76, 2014.

Barberini DJ, Freitas NP, Magnoni MS, Maia L, Listoni AJ, Heckler MC, Sudano MJ, Golim MA, da Cruz Landim-Alvarenga F, Amorim RM. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Res Ther*, 5(1):25, 2014.

Barcellos-de-Souza P, Gori V, Bambi F, Chiarugi P. Tumor microenvironment: bone marrow-mesenchymal stem cells as key players. *Biochim Biophys Acta*, 1836(2):321-35, 2013.

Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36, 568–584, 2004.

Bassi EJ, Aita CA, Câmara NO. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J Stem Cells*, (1):1-8, 2011.

Bauer-Kreisel P, Goepferich A, Blunk T. Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*, 62(7-8):798-813, 2010.

Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, 13(4):392-402, 2013.

Beyaert R, Beaugier L, Van Assche G, Brochez L, Renaud JC, Viguier M, Cocquyt V, Jerusalem G, Machiels JP, Prenen H, Masson P, Louis E, De Keyser F. Cancer risk in immune-mediated inflammatory diseases (IMID). *Mol Cancer*, 29;12(1):98, 2013.

Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 10;2(4):313-9, 2008

Bielli A, Scioli MG, Gentile P, Agostinelli S, Tarquini C, Cervelli V, Orlandi A. Adult adipose-derived stem cells and breast cancer: a controversial relationship. *Springerplus*, 8;3:345, 2014.

Bierie B, Moses HL. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21(1):49-59, 2010.

Borlongan CV. Bone marrow stem cell mobilization in stroke: a „bonehead“ may be good after all! *Leukemia*, 25: 1674–1686, 2011.

Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noël D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One*, 5(12):e14247, 2010.

Boveri, T. *Sitzungsber d Gesellschaft f Morphologie und Physiologie*, 114–225, 1892b.

Brabletz T. EMT and MET in metastasis: where are the cancer stem cells? *Cancer Cell*, 22(6):699-701, 2012.

Brayfield CA, Marra KG, Rubin JP. Adipose tissue regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther*, 5(2):116-21, 2010.

Bronz and Soldati . 2011. *Adipose Stem Cells and Regenerative Medicine*. By Yves-Gerard Illouz, Aris Sterodimas. BOOK.

Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol*, 169(2):338-46, 2006.

DaCosta Byfield S, Major C, Laping NJ, Roberts AB. SB-505124 is a selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol*, 65(3):744-52, 2004.

Burr SP, Dazzi F, Garden OA. Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance? *Immunology and Cell Biology*, 91:12–18, 2013.

Campagnoli C1, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, 98(8):2396-402, 2001.

Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*, 213(2):341-7, 2007.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9(5):641-50, 1991.

Casiraghi F, Perico N, Remuzzi G. Mesenchymal stromal cells to promote solid organ transplantation tolerance. *Curr Opin Organ Transplant*, 18(1):51-8, 2013.

Cassatella MA, Mosna F, Micheletti A, Lisi V, Tamassia N, Cont C, Calzetti F, Pelletier M, Pizzolo G, Krampera M. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells*, 29(6):1001-11, 2011.

Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res*, 53(2):227-46, 2012.

Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells: the great WAT hope. *Trends Endocrinol Metab*, 23(6):270-7, 2012.

Chandler EM, Seo BR, Califano JP, Andresen Eguiluz RC, Lee JS, Yoon CJ, Tims DT, Wang JX, Cheng L, Mohanan S, Buckley MR, Cohen I, Nikitin AY, Williams RM, Gourdon D, Reinhart-King CA, Fischbach C. Implanted adipose progenitor cells as physicochemical regulators of breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(25):9786-91, 2012.

Chandra V, Swetha G, Phadnis S, Nair PD, Bhonde RR. Generation of pancreatic hormone-expressing islet-like cell aggregates from murine adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells*, 8: 1941-1953, 2009.

Chekhun S, Bezdenezhnykh N, Shvets J, Lukianova N. Expression of biomarkers related to cell adhesion, metastasis and invasion of breast cancer cell lines of different molecular subtype. *Exp Oncol*, 35(3):174-9, 2013.

Chen CC, Sun YT, Chen JJ, Chiu KT. TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression in human lung epithelial cells: involvement of the phospholipase C-gamma 2, protein kinase C-alpha, tyrosine kinase, NF-kappa B-inducing kinase, and I-kappa B kinase 1/2 pathway. *J Immunol*, 165(5):2719-28, 2000.

Chen PM, Yen ML, Liu KJ, Sytwu HK, Yen BL. Immunomodulatory properties of human adult and fetal multipotent mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*, 18;18:49, 2011.

Cherubino M, Marra KG. Adipose-derived stem cells for soft tissue reconstruction. *Regen Med*. 2009 Jan;4(1):109-17. doi: 10.2217/17460751.4.1.109.

Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med*, 12:8, 2014.

- Clark ER, Clark EL. Microscopic studies of the new formation of fat in living adult rabbits. *Am. J. Anat.*, 67: 255 – 285, 1940.
- Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*, 1(8):1397-406, 2001.
- Cos S, Fernández R, Güézmés A, Sánchez-Barceló EJ. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Res*, 58(19):4383-90, 1998.
- Crop MJ, Baan CC, Korevaar SS, Ijzermans JN, Pescatori M, Stubbs AP, van Ijcken WF, Dahlke MH, Eggenhofer E, Weimar W, Hoogduijn MJ. Inflammatory conditions affect gene expression and function of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*, 162(3):474-86, 2010.
- D'Anselmi F, Masiello MG, Cucina A, Proietti S, Dinicola S, et al. Microenvironment Promotes Tumor Cell Reprogramming in Human Breast Cancer Cell Lines. *PLoS ONE*, 8(12): e83770, 2013.
- De Miguel MP, Arnalich Montiel F, Lopez Iglesias P, Blazquez Martinez A, Nistal M. Epiblast-derived stem cells in embryonic and adult tissues. *Int J Dev Biol*, 53(8-10):1529-40, 2009.
- Dexter, TM, Allen, TD, Lajtha, LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *J. Cell. Physiol*, 91, 335–344, 1977.
- Dexter, TM, Testa, NG. Differentiation and proliferation of hemopoietic cells in culture. *Methods Cell Biol.* 14, 387–405, 1976.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Cytotherapy. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, 8(4):315-7, 2006.
- De Luca A, Lamura L, Gallo M, Maffia V, Normanno N. Mesenchymal stem cell-derived interleukin-6 and vascular endothelial growth factor promote breast cancer cell migration. *J Cell Biochem*, 113(11):3363-70.
- Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14(3-4):193-209, 2003.
- Devarajan E, Song YH, Krishnappa S, Alt E. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer lines is mediated through PDGF-D released by tissue-resident stem cells. *Int J Cancer*, 131(5):1023-31, 2012.
- Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol*. 2013 Sep 4;4:201, 2013.
- Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*, 20(1):5-14, 2011.
- Dittmer J, Leyh B. Paracrine effects of stem cells in wound healing and cancer progression (Review). *Int J Oncol*, 44(6):1789-98, 2014.

Djouad F, Charbonnier LM, Bouffi C, Louis-Plence P, Bony C, Apparailly F, Cantos C, Jorgensen C, Noël D. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*, 25(8):2025-32, 2007.

Drabsch Y, ten Dijke P. TGF- β signalling and its role in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 31(3-4):553-68, 2012.

Duffy MM, Pindjakova J, Hanley SA, McCarthy C, Weidhofer GA, Sweeney EM, English K, Shaw G, Murphy JM, Barry FP, Mahon BP, Belton O, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell- differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor. *Eur. Immunol*, 41(10):2840-51, 2011.

Duffy MJ. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies. *Clin Chem*, 48(8):1194-7, 2002.

Eggenhofer E, Renner P, Soeder Y, Popp FC, Hoogduijn MJ, Geissler EK, Schlitt HJ, Dahlke MH. Features of synergism between mesenchymal stem cells and immunosuppressive drugs in a murine heart transplantation model. *Transpl Immunol*, 25(2-3):141-7, 2011.

Eggenhofer E, Steinmann JF, Renner P, Slowik P, Piso P, Geissler EK, Schlitt HJ, Dahlke MH, Popp FC. Mesenchymal stem cells together with mycophenolate mofetil inhibit antigen presenting cell and T cell infiltration into allogeneic heart grafts. *Transpl Immunol*, 24(3):157-63, 2011.

Eliopoulos N, Stagg J, Lejeune L, Pommey S, Galipeau J. Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood*, 106(13):4057-65, 2005.

Elman JS, Li M, Wang F, Gimble JM, Parekkadan B. A comparison of adipose and bone marrow-derived mesenchymal stromal cell secreted factors in the treatment of systemic inflammation. *J Inflamm (Lond)*, 11(1):1, 2014.

Engela AU, Baan CC, Dor FJ, Weimar W, Hoogduijn MJ. On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. *Front Immunol*, 3:126, 2012.

Eridani, S. Types of Human Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Stem Cell Discovery*, 13-26, 2014.

Evans, M.J. Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos. *Nature*, 154-156, 1981.

Feng J, Mantesso A, De Bari C, Nishiyama A, Sharpe PT. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(16):6503-8, 2011.

Fonseka M, Ramasamy R, Tan BC, Seow HF. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (hUCB-MSC) inhibit the proliferation of K562 (human erythromyeloblastoid leukaemic cell line). *Cell Biol Int*, 36(9):793-801, 2012.

- Foroni C, Broggini M, Generali D, Damia G. Epithelial-mesenchymal transition and breast cancer: role, molecular mechanisms and clinical impact. *Cancer Treat Rev*, 38(6):689-97, 2012.
- Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro I, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Embryol exp Morph*, 16:581-390, 1966.
- Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 4:393-403, 1970.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. *Cell Tissue Kinet*, 20, 263–272, 1987.
- Friedenstein AJ. Osteogenic stem cells in bone marrow. In *Bone and Mineral Research*, J.N.M. Heersche and J.A. Kanis, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 243–272, 1990.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17(4):331-40, 1974.
- Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers *Cell Tissue Kinet*, 20(3):263-72, 1987.
- Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D. Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther*, 15;1(1):2, 2010.
- Giannopoulou I, Mylona E, Kapranou A, Mavrommatis J, Markaki S, Zoumbouli Ch, Keramopoulos A, Nakopoulou L. The prognostic value of the topographic distribution of uPAR expression in invasive breast carcinomas. *Cancer Lett*, 246(1-2):262-7, 2007.
- Gimble JM, Katz AJ, Bunnell BA. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circ Res*, 100:1249-1260, 2007.
- Giuliani M, Fleury M, Vernochet A, Ketroutsi F, Clay D, Azzarone B, Lataillade JJ, Durrbach A. Long-lasting inhibitory effects of fetal liver mesenchymal stem cells on T-lymphocyte proliferation. *PLoS One*, 6(5):e19988, 2011.
- Gomes LR, Terra LF, Wailemann RA, Labriola L, Sogayar MC. TGF- β 1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC Cancer*, 12:26, 2012.
- Griffin MD, Ritter T, Mahon BP. Immunological Aspects of Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Therapies. *Human gene therapy*, 21:1641–1655. 2010.
- Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*, 140(6):883-99, 2010.
- Grivennikov SI, Tumanov AV, Liepinsh DJ, Kruglov AA, Marakusha BI, Shakhov AN, Murakami T, Drutskaya LN, Förster I, Clausen BE, Tessarollo L, Ryffel B, Kuprash DV, Nedospasov SA. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by t cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects. *Immunity*, 22(1):93-104, 2005.

Gronthos, S, Zannettino, AC, Hay, SJ, Shi, S, Graves, SE, Kortessidis, A, and Simmons, PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell Sci.* 116, 1827–1835, 2003.

Guo X, Chen SY. Transforming growth factor- β and smooth muscle differentiation. *World J Biol Chem*, 3(3):41-52, 2012.

Guzik TJ, Korbout R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*, 54(4):469-87, 2003.

Haabeth OA, Lørvik KB, Hammarström C, Donaldson IM, Haraldsen G, Bogen B, Corthay A. Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nat Commun*, 2:240, 2011.

Haddad NE. Mesenchymal Stem Cells: Immunology and Therapeutic Benefits. DOI: 10.5772/21933. "Stem Cells in Clinic and Research", book edited by Ali Gholamrezanezhad, ISBN 978-953-307-797-0, 2011.

Haeckel, E. *Natürliche Schöpfungsgeschichte*. Berlin: Georg Reimer, 1868.

Häcker, V. *Archiv f mikr Anat*, 39, 556–581, 1892.

Han Z, Jing Y, Zhang S, Liu Y, Shi Y, Wei L. The role of immunosuppression of mesenchymal stem cells in tissue repair and tumor growth. *Cell Biosci*, 2(1):8, 2012.

Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*, 14:9:12, 2011.

Hass R, Otte A. Mesenchymal stem cells as all-round supporters in a normal and neoplastic microenvironment. *Cell Commun Signal*, 10(1):26, 2012.

Heo SC, Lee KO, Shin SH, Kwon YW, Kim YM, Lee CH, Kim YD, Lee MK, Yoon MS, Kim JH. Periostin mediates human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-stimulated tumor growth in a xenograft lung adenocarcinoma model. *Biochim Biophys Acta*, 1813(12):2061-70, 2011.

Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res*, 12;13(4):215, 2011.

Hong IS, Lee HY, Kang KS. Mesenchymal stem cells and cancer: Friends or enemies? *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen*, pii: S0027-5107(14)00022-0, 2014.

Hoogduijn MJ, Popp F, Verbeek R, Masoodi M, Nicolaou A, Baan C, Dahlke MH. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol*, 10(12):1496-500, 2010.

Houthuijzen JM, Daenen LG, Roodhart JM, Voest EE. The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression. *Br J Cancer*, 106(12):1901-6, 2012.

Hsieh HL, Wang HH, Wu WB, Chu PJ, Yang CM. Transforming growth factor- β 1 induces matrix metalloproteinase-9 and cell migration in astrocytes: roles of ROS-dependent ERK- and JNK-NF- κ B pathways. *J Neuroinflammation*, 7: 88, 2010.

Hung SP, Yang MH, Tseng KF, Lee OK. Hypoxia-induced secretion of TGF- β 1 in mesenchymal stem cell promotes breast cancer cell progression. *Cell Transplant*, 22(10):1869-82, 2013.

Ivanova-Todorova E, Bochev I, Dimitrov R, Belemezova K, Mourdjeva M, Kyurkchiev S, Kinov P, Altankova I, Kyurkchiev D. Conditioned medium from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells induces CD4+FOXP3+ cells and increases IL-10 secretion. *J Biomed Biotechnol*, 2012:295167, 2012.

Iyama K, Ohzono K, Usuku G. Electron microscopical studies on the genesis of white adipocytes: Differentiation of immature pericytes into adipocytes in transplanted preadipose tissue. *Virchows Archiv B*, 31:143-155, 1979.

Jacobson LO, Marks EK, Gaston, EO, Zirkle, RE . The Effect of Spleen Protection on Mortality Following X-Irradiation. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1538-1543, 1949.

Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*, 32(5):414-25, 2004.

Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon SJ, Jeon HB, Choi SJ, Kim SW, Yang YS, Oh W, Chang JW. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci*, 14(9):17986-8001, 2013.

Jing Y, Han Z, Liu Y, Sun K, Zhang S, Jiang G, Li R, Gao L, Zhao X, Wu D, Cai X, Wu M, Wei L. Mesenchymal stem cells in inflammation microenvironment accelerates hepatocellular carcinoma metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*, 7(8):e43272, 2012.

Jones SA. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *J Immunol*, 175:3463-3468, 2005.

Jotzu C, Alt E, Welte G, Li J, Hennessy BT, Devarajan E, Krishnappa S, Pinilla S, Droll L, Song YH. Adipose tissue derived stem cells differentiate into carcinoma-associated fibroblast-like cells under the influence of tumor derived factors. *Cell Oncol (Dordr)*, 34(1):55-67, 2011.

Jung Y, Bauer G, Nolte JA. Concise review: Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells: progress toward safe clinical products. *Stem Cells*, 30(1):42-7, 2012.

Kalinina NI, Sysoeva VY, Rubina KA, Parfenova YV, Tkachuk VA. Mesenchymal stem cells in tissue growth and repair. *Acta Naturae*, 3(4):30-7, 2011.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*, 119(6):1420-8, 2009.

Kaplan FS, Hahn GV, Zasloff M. Heterotopic Ossification: Two Rare Forms and What They Can Teach Us. *AJ Am Acad Orthop Surg*, 2(5):288-296, 1994.

Kéramidas M, de Fraipont F, Karageorgis A, Moisan A, Persoons V, Richard MJ, Coll JL, Rome C. The dual effect of mesenchymal stem cells on tumour growth and tumour angiogenesis. *Stem Cell Res Ther*, 4(2):41, 2013.

Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(6):2548-56, 2004.

Kidd S, Spaeth E, Watson K, Burks J, Lu H, Klopp A, Andreeff M, Marini FC. Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One*, 7(2):e30563, 2012.

Kim EH, Heo CY. Current applications of adipose-derived stem cells and their future perspectives. *World J Stem Cells*, 6(1):65-8, 2014.

Kim EJ, Kim N, Cho SG. The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Exp Mol Med*, 45:e2, 2013.

Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*, 11(4):377-91, 2009.

Köhrmann A, Kammerer U, Kapp M, Dietl J, Anacker J. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. *BMC Cancer*, 9: 188, 2009.

Kokai LE, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Transl Res*, 163(4):399-408, 2014.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Research & Therapy*, 9:204, 2007.

Korkaya H, Liu S, Wicha MS. Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment. *J Clin Invest*, 121(10):3804-9, 2011.

Kovačić JC, Mercader N, Torres M, Boehm M, Fuster V. Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease. *Circulation*, 125(14):1795-808, 2012.

Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 101(9):3722-9, 2003.

Kucerova L, Matuskova M, Hlubinova K, Altanerova V, Altaner C. Tumor cell behaviour modulation by mesenchymal stromal cells. *Mol Cancer*, 9:129, 2010.

Kucerova L, Skolekova S, Matuskova M, Bohac M, Kozovska Z. Altered features and increased chemosensitivity of human breast cancer cells mediated by adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Cancer*, 9:13:535, 2013.

Le Blanc K, Mougiakakos D. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol*, 25;12(5):383-96, 2012.

Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*, 57(1):11-20, 2003.

Lebrun JJ. The Dual Role of TGF β in Human Cancer: From Tumor Suppression to Cancer Metastasis. *ISRN Molecular Biology*, doi:10.5402/2012/381428, 2012.

Lee HJ, Jung J, Cho KJ, Lee CK, Hwang SG, Kim GJ. Comparison of in vitro hepatogenic differentiation potential between various placenta-derived stem cells and other adult stem cells as an alternative source of functional hepatocytes. *Differentiation*, 3: 223–231, 2012.

Lee J, Han DJ, Kim SC. In vitro differentiation of human adipose tissue-derived stem cells into cells with pancreatic phenotype by regenerating pancreas extract. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 547– 551, 2008.

Lee JM, Jung J, Lee HJ, Jeong SJ, Cho KJ, Hwang SG, Kim GJ. Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells. *Int Immunopharmacol*, 13(2):219-24, 2012.

Leto Barone AA1, Khalifian S, Lee WP, Brandacher G. Immunomodulatory effects of adipose-derived stem cells: fact or fiction? *Biomed Res Int*, 2013:383685, 2013.

Li H, Xu Y, Fu Q, Li C. Effects of multiple agents on epithelial differentiation of rabbit adipose-derived stem cells in 3D culture. *Tissue Eng Part A*, 18(17-18):1760-70, 2012.

Li L, Tian H, Chen Z, Yue W, Li S, Li W. Inhibition of lung cancer cell proliferation mediated by human mesenchymal stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 43(2):143-8, 2011.

Li W, Ren G, Huang Y, Su J, Han Y, Li J, Chen X, Cao K, Chen Q, Shou P, Zhang L, Yuan ZR, Roberts AI, Shi S, Le AD, Shi Y. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ*, 19(9):1505-13, 2012.

Lin CS, Lin G, Lue TF. Allogeneic and xenogeneic transplantation of adipose-derived stem cells in immunocompetent recipients without immunosuppressants. *Stem Cells Dev*, 21(15):2770-8, 2012.

Lin CS, Xin ZC, Deng CH, Ning H, Lin G, Lue TF. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol*, 25(6):807-15, 2010.

Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev*, 7(2):269-91, 2011.

Lin G, Liu G, Banie L, Wang G, Ning H, Lue TF, Lin CS. Tissue distribution of mesenchymal stem cell marker Stro-1. *Stem Cells Dev*, 20(10):1747-52, 2011.

Liu Y, Han ZP, Zhang SS, Jing YY, Bu XX, Wang CY, Sun K, Jiang GC, Zhao X, Li R, Gao L, Zhao QD, Wu MC, Wei LX. Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. *J Biol Chem*, 286(28):25007-15, 2011.

Lorenz E, Uphoff D, Reid TR and Shelton E. Modification of Irradiation Injury in Mice and Guinea Pigs by Bone Marrow Injections. *Journal of the National Cancer Institute*, 12, 197-201, 1951.

Lüth S, Schrader J, Zander S, Carambia A, Buchkremer J, Huber S, Reifenberg K, Yamamura K, Schirmacher P, Lohse AW, Herkel J. Chronic inflammatory IFN- γ signaling suppresses hepatocarcinogenesis in mice by sensitizing hepatocytes for apoptosis. *Cancer Res*, 71(11):3763-71, 2011.

Mandel K, Seidl D, Rades D, Lehnert H, Gieseler F, Hass R, Ungefroren H. Characterization of spontaneous and TGF- β -induced cell motility of primary human normal and neoplastic mammary cells in vitro using novel real-time technology. *PLoS One*, 8(2):e56591, 2013.

Manferdini C, Maumus M, Gabusi E, Piacentini A, Filardo G, Peyrafitte JA, Jorgensen C, Bourin P, Fleury-Cappellesso S, Facchini A, Noël D, Lisignoli G. Adipose-derived mesenchymal stem cells exert antiinflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients through prostaglandin E2. *Arthritis Rheum*, 65(5):1271-81, 2013.

Mao Y, Keller ET, Garfield DH, Shen K, Wang J. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 32(1-2):303-15, 2013.

Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*, 21(2):216-25, 2013.

Massagué J, Chen YG. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev*, 14(6):627-44, 2000.

Maxson S, Lopez EA, Yoo D, Danilkovitch-Miagkova A, Leroux MA. Concise review: role of mesenchymal stem cells in wound repair. *Stem Cells Transl Med*, (2):142-9, 2012.

McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, Kloster A, Di Halvorsen Y, Ting JP, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*, 24(5):1246-53, 2006.

Mele V, Muraro MG, Calabrese D, Pfaff D, Amatruda N, Amicarella F, Kvinlaug B, Bocelli-Tyndall C, Martin I, Resink TJ, Heberer M, Oertli D, Terracciano L, Spagnoli GC, Iezzi G. Mesenchymal stromal cells induce epithelial-to-mesenchymal transition in human colorectal cancer cells through the expression of surface-bound TGF- β . *Int J Cancer*, 134(11):2583-94, 2014.

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*, 103(12):4619-21, 2004.

Melief SM, Schrama E, Brugman MH, Tiemessen MM, Hoogduijn MJ, Fibbe WE, Roelofs H. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells*, 31:1980–1991, 2013.

Mishra PJ, Merlino G. A traitor in our midst: mesenchymal stem cells contribute to tumor progression and metastasis. *Future Oncol*, 4(6), 745-749, 2008.

- Mitra A, Mishra L, Li S. Technologies for deriving primary tumor cells for use in personalized cancer therapy. *Trends Biotechnol.*, 31(6):347-54, 2013.
- Mizuno H, Tobita M, Uysal AC. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*, 30(5):804-10, 2012.
- Moffet JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunology and Cell Biology* 81, 247–265, 2003.
- Mognetti B, La Montagna G, Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C. Bone marrow mesenchymal stem cells increase motility of prostate cancer cells via production of stromal cell-derived factor-1 α . *J Cell Mol Med*, 17(2):287-92, 2013.
- Mohyeldin A, Muvdi TG, Hinojosa AQ. Oxygen in Stem Cell Biology: A Critical Component of the Stem Cell Niche. doi 10.1016/j.stem.2010.07.007, 2010.
- Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, 22;132(4):598-611, 2008.
- Morrison SJ, Weissman IL. The Long-Term Repopulating Subset of Hematopoietic Stem Cells Is Deterministic and Isolatable by Phenotype. *Immunity*, 661-673, 1994.
- Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg*, 118(3 Suppl):121S-128S, 2006.
- Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*, 189(9):1363-72, 1999.
- Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*, 15;45:e54, 2013.
- Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, De Bruyn C, Bron D, Tounouz M, Lagneaux L. Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming. *Stem Cell Rev*, 8(4):1188-98, 2012.
- Najar M, Rouas R, Raicevic G, Boufker HI, Lewalle P, Meuleman N, Bron D, Tounouz M, Martiat P, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells promote or suppress the proliferation of T lymphocytes from cord blood and peripheral blood: the importance of low cell ratio and role of interleukin-6. *Cytotherapy*, 11(5):570-83, 2009.
- Nakamura K, Ito Y, Kawano Y, Kurozumi K, Kobune M, Tsuda H, Bizen A, Honmou O, Niitsu Y, Hamada H. Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther*, 11(14):1155-64, 2004.
- Nauta AJ, Westerhuis G, Kruisselbrink AB, Lurvink EG, Willemze R, Fibbe WE. Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood*, 108(6):2114-20, 2006.
- Nikolić N, Krstić A, Trivanović D, Mojsilović S, Kocić J, Santibanez JF, Jovčić G, Bugarski D. Mesenchymal stem cell properties of dental pulp cells from deciduous teeth. *Arch Biol Sci Belgrade*, 63: 933-942, 2011.

Opitz CA, Litztenburger UM, Lutz C, Lanz TV, Tritschler I, Köppel A, Tolosa E, Hoberg M, Anderl J, Aicher WK, Weller M, Wick W, Platten M. Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. *Stem Cells*, 27(4):909-19, 2009.

Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*, 11(2): 85–97, 2011.

Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara Y, Kikuchi Y, Ito T, Okada T, Urabe M, Mizukami H, Kume A. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmun*, 30(3):121-7, 2008.

Owen M, Friedenstein AJ. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*, 136:42-60, 1988.

Pappenheim, A. *Fol. Haematol*, (Suppl. 4), 301–308, 1907.

Pappenheim, A. *Virchows Arch*, 145, 587–643, 1896.

Patel DM, Shah J, Srivastava AS. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Stem Cells Int*, 496218, 2013.

Patel SA, Meyer JR, Greco SJ, Corcoran KE, Bryan M, Rameshwar P. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *J Immunol*, 184(10):5885-94, 2010.

Peng J, Li Q, Wigglesworth K, Rangarajan A, Kattamuri C, Peterson RT, Eppig JJ, Thompson TB, Matzuk MM. Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(8):E776-85, 2013.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284:143–147, 1999.

Philippou A, Maridaki M, Koutsilieris M. The role of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and transforming growth factor beta 1 (TGFbeta1) in muscle regeneration. *In Vivo*, 22(6):735-50, 2008.

Phipps RP, Stein SH, Roper RL. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunology today*, 12:10, 1991.

Plumas J, Chaperot L, Richard MJ, Molens JP, Bensa JC, Favrot MC. Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia*, (9):1597-604, 2005.

Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebé L, Papadaki HA. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cell Rev*, 7(3):569-89, 2011.

Potian JA, Aviv H, Ponzio NM, Harrison JS, Rameshwar P. Veto-like activity of mesenchymal stem cells: functional discrimination between cellular responses to alloantigens and recall antigens. *J Immunol*, 171(7):3426-34, 2003.

Prasanna SJ, Gopalakrishnan D, Shankar SR, Vasandan AB. Pro-Inflammatory Cytokines, IFN γ and TNF α , Influence Immune Properties of Human Bone Marrow and Wharton Jelly Mesenchymal Stem Cells Differentially. PLoS ONE, 5(2): e9016, 2010.

Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. Mol Ther, 20(1):14-20, 2012.

Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. Br J Haematol, 129(1):118-29, 2005.

Purandare B, Teklemariam T, Zhao L, Hantash BM. Temporal HLA profiling and immunomodulatory effects of human adult bone marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells. Regen Med, 9(1):67-79, 2014.

Qu X, Liu T, Song K, Li X, Ge D. Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Human Adipose-Derived Stem Cells Using a Non-Viral Polycistronic Plasmid in Feeder-Free Conditions. PLoS ONE, 7(10): e48161, 2012.

Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat Med, 19(11):1423-37, 2013.

Qiao L, Xu ZL, Zhao TJ, Ye LH, Zhang XD. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. Cancer Lett, 269(1):67-77, 2008.

Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". Cell Stem Cell, 1(1):35-8, 2007.

Rodgers DO, Harris AG. A Comparison of Stem Cells for Therapeutic Use. Stem Cell Rev and Rep, 7:782-796, 2011.

Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth. Leukemia, 21(2):304-10, 2007.

Rasmusson I, Uhlin M, Le Blanc K, Levitsky V. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. J Leukoc Biol, 82(4):887-93, 2007.

Ratajczak MZ, Zuba-Surma EK, Wysoczynski M, Wan W, Ratajczak J, Wojakowski W, Kucia M. Hunt for pluripotent stem cell -- regenerative medicine search for almighty cell. J Autoimmun, 30(3):151-62, 2008.

Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'hullie A, Zhang J, Lu Y, Roberts AI, Ji W, Zhang H, Rabson AB, Shi Y. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. Stem Cells, 27(8):1954-62, 2009.

Ribeiro A, Laranjeira P, Mendes S, Velada I, Leite C, Andrade P, Santos F, Henriques A, Grãos M, Cardoso CM, Martinho A, Pais M, da Silva CL, Cabral J, Trindade H, Paiva A. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit

different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Res Ther*, 4(5):125, 2013.

Riekstina U, Cakstina I, Parfejevs V, Hoogduijn M, Jankovskis G, Muiznieks I, Muceniece R, Ancans J. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev*, 5(4):378-86, 2009.

Rietjens M, De Lorenzi F, Rossetto F, Brenelli F, Manconi A, Martella S, Intra M, Venturino M, Lohsiriwat V, Ahmed Y, Petit JY. Safety of fat grafting in secondary breast reconstruction after cancer. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 64(4):477-83, 2011.

Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*, 87(1):125-8, 2005.

Romieu-Mourez R, François M, Boivin MN, Stagg J, Galipeau J. Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN- γ , TGF- β , and cell density. *J Immunol*, 179(3):1549-58, 2007.

Rowan BG, Gimble JM, Sheng M, Anbalagan M, Jones RK, Frazier TP, Asher M, Lacayo EA, Friedlander PL, Kutner R, Chiu ES. Human Adipose Tissue-Derived Stromal/Stem Cells Promote Migration and Early Metastasis of Triple Negative Breast Cancer Xenografts. *PLoS ONE*, 9(2): e89595, 2014.

Russo V, Yu C, Belliveau P, Hamilton A, Flynn LE. Comparison of human adipose-derived stem cells isolated from subcutaneous, omental, and intrathoracic adipose tissue depots for regenerative applications. *Stem Cells Transl Med*, 3(2):206-17, 2014.

Rutkowski JM, Davis KE, Scherer PE. Mechanisms of obesity and related pathologies: The macro- and microcirculation of adipose tissue. *FEBS Journal*, 5738–5746, 2009.

Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP. Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*, 149(2):353-63, 2007.

Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)*, 2:8, 2005.

Ryu H, Oh JE, Rhee KJ, Baik SK, Kim J, Kang SJ, Sohn JH, Choi E, Shin HC, Kim YM, Kim HS, Bae KS, Eom YW. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured at high density express IFN- β and suppress the growth of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Lett*, 352(2):220-7, 2014.

Samatov TR, Tonevitsky AG, Schumacher U. Epithelial-mesenchymal transition: focus on metastatic cascade, alternative splicing, non-coding RNAs and modulating compounds. *Mol Cancer*, 12(1):107, 2013.

Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*, 109(1):228-34, 2007.

Sbarbati D, Accorsi D, Benati L, Marchetti G, Orsini G, Rigotti P, Panettièrè. Subcutaneous adipose tissue classification. *European Journal of Histochemistry*, 54:e48, 2010.

Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells.*, 4(1-2):7-25, 1978.

Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*, 75(2):163-89, 2004.

Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Stem Cells*, 212-22, 2008.

Seo SH, Kim KS, Park SH, Suh YS, Kim SJ, Jeun SS, Sung YC. The effects of mesenchymal stem cells injected via different routes on modified IL-12-mediated antitumor activity. *Gene Ther*, 18(5):488-95, 2011.

Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, Xu C, Chen X, Huang Y, Zhu Z, Huang X, Han X, Xie N, Ren G. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res*, 20(5):510-8, 2010.

Sun Z, Wang S, Zhao RC. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J Hematol Oncol*, 7:14, 2014.

Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol*, 33(3):136-43, 2012.

Shore EM, Ahn J, Jan de Beur S, Li M, Xu M, Gardner RJ, Zasloff MA, Whyte MP, Levine MA, Kaplan FS. Paternally inherited inactivating mutations of the GNAS1 gene in progressive osseous heteroplasia. *N Engl J Med*, 10;346(2):99-106, 2002.

Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *Journal of Comparative Physiology*, 62, 327-336, 1963.

Simons BD, Clevers H. Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell*, 145(6):851-62, 2011.

Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol.*, 6:457-78. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130230, 2011.

Soria G, Ofri-Shahak M, Haas I, Yaal-Hahoshen N, Leider-Trejo L, Leibovich-Rivkin T, Weitzenfeld P, Meshel T, Shabtai E, Gutman M, Ben-Baruch A. Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNF α & IL-1 β with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer*, 11:130, 2011.

Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*, 113(26):6576-83, 2009.

Spaggiari GM, Moretta L. Interactions between mesenchymal stem cells and dendritic cells. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 130:199-208, 2013.

Steward AJ, Wagner DR, Kelly DJ. Exploring the roles of integrin binding and cytoskeletal reorganization during mesenchymal stem cell mechanotransduction in soft and stiff hydrogels subjected to dynamic compression. *J Mech Behav Biomed Mater*, 38:174-82, 2014.

Strong AL, Strong TA, Rhodes LV, Semon JA, Zhang X, Shi Z, Zhang S, Gimble JM, Burow ME, Bunnell BA. Obesity associated alterations in the biology of adipose stem cells mediate enhanced tumorigenesis by estrogen dependent pathways. *Breast Cancer Res*, 15(5):R102, 2013.

Storci G, Sansone P, Mari S, D'Uva G, Tavolari S, Guarnieri T, Taffurelli M, Ceccarelli C, Santini D, Chieco P, Marcu KB, Bonafè M. TNFalpha up-regulates SLUG via the NF-kappaB/HIF1alpha axis, which imparts breast cancer cells with a stem cell-like phenotype. *J Cell Physiol*, 225(3):682-91, 2010.

Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*, 121(6):2094-2101, 2011.

Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, Hu S, Cherry AM, Robbins RC, Longaker MT, Wu JC. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 15;106(37):15720-5, 2009.

Sun Z, Wang S, Zhao RC. The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment. *J Hematol Oncol*, 7:14, 2014.

Tanaka T, Saika S, Ohnishi Y, Ooshima A, McAvoy JW, Liu CY, Azhar M, Doetschman T, Kao WW. Fibroblast growth factor 2: roles of regulation of lens cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in response to injury. *Mol Vis*, 10:462-7, 2004.

Tavassoli, M, Crosby, W.H. *Science*, 161, 54-56, 1968.

Taylor AW. Review of the activation of TGF-beta in immunity. *J Leukoc Biol*, 85(1):29-33, 2009.

Terness P, Bauer TM, Röse L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med*, 196(4):447-57, 2002.

Terness P, Chuang JJ, Bauer T, Jiga L, Opelz G. Regulation of human auto- and alloreactive T cells by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-producing dendritic cells: too much ado about IDO? *Blood*, 105(6):2480-6, 2005.

Thien TT, Kahn CR. Transplantation of adipose tissue and stem cells: role in metabolism and disease. *Nature Reviews Endocrinology*, 195-213, 2010.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic Stem Cells Derived from Human Blastocysts. *Science*, 1145-1147, 1998.

Tian X, Liu Z, Niu B, Zhang J, Tan TK, Lee SR, Zhao Y, Harris DC, Zheng G. E-cadherin/ β -catenin complex and the epithelial barrier. *J Biomed Biotechnol*, 567305, 2011.

Till JE, McCulloch EA. A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research*, 14, 213-222, 1961.

Tomita K, Madura T, Mantovani C, Terenghi G. Differentiated adipose-derived stem cells promote myelination and enhance functional recovery in a rat model of chronic enervation. *Journal of Neuroscience Research*, 7: 1392–1402, 2012.

Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, Johnstone BH, March KL. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. *Circ Res*, 102(1):77-85, 2008.

Vaughan RA, Garcia-Smith R, Dorsey J, Griffith JK, Bisoffi M, Trujillo KA. Tumor necrosis factor alpha induces Warburg-like metabolism and is reversed by anti-inflammatory curcumin in breast epithelial cells. *Int J Cancer*, 133(10):2504-10, 2013.

Wang D, Feng X, Lu L, Konkel JE, Zhang H, Chen Z, Li X, Gao X, Lu L, Shi S, Chen W, Sun L. A CD8 T cell/indoleamine 2,3-dioxygenase axis is required for mesenchymal stem cell suppression of human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol*, 66(8):2234-45, 2014.

Wang D, Ji YR, Chen K, Du WT, Yang ZX, Han ZB, Chi Y, Liang L, Bayard F, Han ZC. IL-6 production stimulated by CD14(+) monocytes-paracrine IL-1 β does not contribute to the immunosuppressive activity of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Cell Physiol Biochem*, 29(3-4):551-60, 2012.

Wang XY, Lan Y, He WY, Zhang L, Yao HY, Hou CM, Tong Y, Liu YL, Yang G, Liu XD, Yang X, Liu B, Mao N. Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. *Blood*. 111(4):2436-43, 2008.

Wan M, Li C, Zhen G, Jiao K, He W, Jia X, Wang W, Shi C, Xing Q, Chen YF, Jan De Beur S, Yu B, Cao X. Injury-activated transforming growth factor β controls mobilization of mesenchymal stem cells for tissue remodeling. *Stem Cells*, 30(11):2498-511, 2012.

Waterman RS, Henkle SL, Betancourt AM. Mesenchymal Stem Cell 1 (MSC1)-Based Therapy Attenuates Tumor Growth Whereas MSC2-Treatment Promotes Tumor Growth and Metastasis. *PLoS ONE*, 7(9): e45590, 2012.

Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*, 5(4):e10088, 2010.

Weigelt B, Peterse JL, van 't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*, 5(8):591-602, 2005.

Weismann, A. Die Continuität des Keimplasmas als Grundlage einer Theorie der Vererbung. Jena: Gustav Fischer, 1885.

Wu Y, Ren M, Yang R, Liang X, Ma Y, Tang Y, Huang L, Ye J, Chen K, Wang P, Shen H. Reduced immunomodulation potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells induced CCR4+CCR6+ Th/Treg cell subset imbalance in ankylosing spondylitis. *Arthritis Res Ther*, 13(1):R29, 2011.

Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, Yarmush ML. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplant*, 19(6):667-79, 2010.

Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell*, 3;137(1):13-7, 2009.

Yañez R, Lamana ML, García-Castro J, Colmenero I, Ramírez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*. 24(11):2582-91, 2006.

Yang C, Lei D, Ouyang W, Ren J, Li H, Hu J, Huang S. Conditioned media from human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells efficiently induced the apoptosis and differentiation in human glioma cell lines in vitro. *Biomed Res Int*, 2014:109389, 2014.

Yang J, Weinberg RA. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell*, 14(6):818-29, 2008.

Yang X, Du J, Xu X, Xu C, Song W. IFN- γ -secreting-mesenchymal stem cells exert an antitumor effect in vivo via the TRAIL pathway. *J Immunol Res*, 2014:318098, 2014.

Yang X, Hou J, Han Z, Wang Y, Hao C, Wei L, Shi Y. One cell, multiple roles: contribution of mesenchymal stem cells to tumor development in tumor microenvironment. *Cell Biosci*, 21;3(1):5, 2013.

Ye H, Cheng J, Tang Y, Liu Z, Xu C, Liu Y, Sun Y. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells produced TGF beta contributes to progression and metastasis of prostate cancer. *Cancer Invest*, 30(7):513-8, 2012.

Yeh GL, Mathur S, Wivel A, Li M, Gannon FH, Uljed A, Audi L, Olmstead EA, Kaplan FS, Shore EM. GNAS1 mutation and Cbfa1 misexpression in a child with severe congenital platelike osteoma cutis. *J Bone Miner Res*, 15(11):2063-73, 2000.

Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg*, 34(9):1178-85, 2008.

Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, Isakoff SJ, Ciciliano JC, Wells MN, Shah AM, Concannon KF, Donaldson MC, Sequist LV, Brachtel E, Sgroi D, Baselga J, Ramaswamy S, Toner M, Haber DA, Maheswaran S. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science*, 339(6119):580-4, 2013.

Zaidi MR, Merlino G. The two faces of interferon- γ in cancer. *Clin Cancer Res*, 17(19):6118-24, 2011.

Zenz R, Eferl R, Scheinecker C, Redlich K, Smolen J, Schonhaler HB, Kenner L, Tschachler E, Wagner EF. Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease. *Arthritis Res Ther*, 10(1): 201, 2008.

Zeve D, Tang W, Graff J. Fighting fat with fat: the expanding field of adipose stem cells. *Cell Stem Cell*, 6;5(5):472-81, 2009.

Zhang Y, Bellows CF, Kolonin MG. Adipose tissue-derived progenitor cells and cancer. *World J Stem Cells*, 2(5):103-13, 2010.

Zhang T, Lee YW, Rui YF, Cheng TY, Jiang XH, Li G. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote growth and angiogenesis of breast and prostate tumors. *Stem Cell Res Ther*, 4(3):70, 2013.

Zhang Y, Cai W, Huang Q, Gu Y, Shi Y, Huang J, Zhao F, Liu Q, Wei X, Jin M, Wu C, Xie Q, Zhang Y, Wan B, Zhang Y. Mesenchymal stem cells alleviate bacteria-induced liver injury in mice by inducing regulatory dendritic cells. 2013.

Zhao J, Hu L, Liu J, Gong N, Chen L. The effects of cytokines in adipose stem cell-conditioned medium on the migration and proliferation of skin fibroblasts in vitro. *Biomed Res Int*, 2013:578479, 2013.

Zhao Y, Gao J, Lu F. Human adipose-derived stem cell adipogenesis induces paracrine regulation of the invasive ability of MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Exp Ther Med*, 6(4):937-942, 2013.

Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, Péault B, Rubin JP, Donnenberg AD. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry A*, 77(1):22-30, 2010.

Zuk PA. Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review. *ISRN Stem Cells*, doi.org/10.1155/2013/713959, 2013.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13(12):4279-95, 2002.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huanq J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz P, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*, 7:211-28, 2001.

PRILOG - SPISAK SKRAĆENICA

AT-MMĆ – mezenhimske matične ćelije masnog tkiva
nAT-MMĆ – mezenhimske matične ćelije izolovane iz masnog tkiva zdravog donora, normalne AT-MMĆ
tAT-MMĆ - mezenhimske matične ćelije izolovane iz masnog tkiva neposrednog okruženja tumora, tumor AT-MMĆ
tdAT-MMĆ - mezenhimske matične ćelije izolovane iz masnog tkiva pridruženog tumorskom tkivu dojke, tumor dojke AT-MMĆ
 α -SMA (*α -Smooth Muscle Actine*) – aktin glatkih mišića
ALK (*Activin Receptor-like Kinase*) – kinaza slična aktivinskom receptoru
ALP (*Alkaline Phosphatase*) – alkalna fosfataza
AP-1 – aktivatorski protein-1, transkripcioni faktor
Ang-1 - angiopoetin-1
BrdU (Bromodeoxyuridine) – bromodeoksiuridin
BSA (Bovine Serum Albumine) – albumin govećeg seruma
BCIP (*5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine*) – 5-bromo-4-hloro-3"-indlifosfat p-toluidinska so
BCA (*bicinchoninic acid*) – bicinhoninična kiselina
BMP (*Bone Morphogenic Protein*) – morfogenetski protein kosti
CD (*Cluster of Differentiation*) – klaster diferencijacije, odnosno membranski antigeni ćelija
CFU-F (*Colony Forming Unit-Fibroblastic*) – jedinica formiranja fibroblastnih kolonija
CFU-S (*Colony-Forming Unit- Spleen*) - jedinica formiranja kolonija slezine
COX-2 (Cyclooxygenase-2) – ciklooksigenaza-2
CXC - hemokin
CXCR – hemokinski reseptor
CXCL – hemokinski ligand
CCL – limfoidni hemokin
CAF (*cancer associated fibroblasts*) - fibroblasti pridruženi tumoru
CAA (*cancer associated adipose*) - masno tkivo pridruženo tumoru
CSC (*Cancer Stem Cells*) – matične ćelije kancera
DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle' Medium*)
DMSO – dimetilsulfoksid
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) - 4',6-diamidin-2-fenilindol
DTT (*Dithiothreitol*) – ditiotreitol, redukujući agens
kDNK- komplementarna deokisiribonukleinska kiselina
dNTP – deokisiribonukleotid trifosfat
EMT – epitelo-mezenhimska tranzicija
EDTA (*Etylenediaminetetraacetic Acid*) – etilendiamintetrasirćetna kiselina
E-ACA (*epsilon aminocaproic acid*) – epsilon-aminokaproična kiselina, inhibitor proteaza

EGF (*epidermal growth factor*) - epidermalni faktor rasta
ER – estrogenski receptor
FAP (*Fibroblast Activated Protein*) – protein aktiviranih fibroblasta
FITC (*fluorescein isothiocyanate*) – fluorescein izotiocijanat, fluorohrom
FCS (*Fetal Calf Serum*) - fetalni goveći serum
FGF (*fibroblast growth factor*) - faktor rasta fibroblasta
GAPDH – gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, *housekeeping* gen
GvHD (*Graft versus Host Disease*) – bolest usled reakcije stranog protiv domaćeg tkiva
GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor*) - faktor stimulacije rasta granulocitno-makrofagnih kolonija
GMP – granulocitno-monocitni progenitori
HM – hranljivi medijum
HLA (*Human Leukocyte Antigen*) – antigen na humanim leukocitima
HMC – hematopoetske matične ćelije
HGF (*hepatocyte growth factor*) - faktor rast hepatocita
HER2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*) – receptor za epidermalni faktor rasta-2
HRP (*horseradish peroxidase*) – peroksidaza rena
IFN (*Interferon*) – interferon
IL (*Interleukin*) – interleukin
IDO-1 (*Indoleamine*) – indoleamindioksigenaza-1
IBMX (*3-isobutyl-1-methylxanthine*) – izobutilmetilksantin
iRNK – informaciona ribonukleinska kiselina
iPĆ – indukovane pluripotentne matične ćelije
ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) - intercelularni adhezivni molekul-1
Ig – imunoglobulin
IGF-1 (*insulin growth factor-1*) - insulinski faktor rasta-1
JAK/STAT (*Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*) – signalni put kinaza i provodnika signala i aktivatora transkripcije u ćelijama,
KM – kondicionirani medijum
KGF (*keratinocyte growth factor*) - faktor rast keratinocita
LT-HSC (*Long Term Hematopoietic Stem Cells*) - dugotrajna repopulišuća populacija hematopoetskih matičnih ćelija
LPS – lipopolisaharid
LIF (*leukemia inhibitory factor*) - leukemija inhibirajući faktor
MMC – mezenhimske matične ćelije
MEP – megakariocitni-eritrocitni progenitori
MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) - inhibitorni faktor migracije makrofaga
MNC – mononuklearne ćelije periferne krvi
MLR (*Myxed Lymphocytes Reaction*) – reakcija mešanih limfocita
MTT - 4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijum bromid

MMP (*Matrix Metalloproteinases*) – matriksne metaloproteinaze, enzimi koji učestvuju u degradaciji ekstracelularnog matriksa

MAPK (*Mitogen-activated Protein Kinases*) – kinaze aktivirane mitogenom

MHC (*Major Histocompatibility Complex*) – glavni kompleks histokompatibilnosti

M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) - faktor stimulacije stvaranja kolonija makrofaga

NBT (nitro-blue tetrazolium chloride) – nitro-plava tetrazolijum-hloridna so

NF-κB – nuklearni faktor lakog κ lanca-stimulanta B ćelija, transkripcioni faktor

NLRs (*NOD-like Receptors*) - receptori slični NOD-u

NK (*natural killer*) – ćelije “prirodne ubice”

NOS (*nitric oxide synthetase*) – azot-monoksid sintetaza

N-MSC (*Normal Mesenchymal Stem Cells*) – normalne MMC

Oligo dT – kratka sekvenca od nekoliko deoksiribonukleotida

PD-L1 (*Programmed Death Ligand*) – ligand programirane ćelijske smrti

PLA (*Processed Lipoaspirate*) – masno tkivo čija je struktura izmenjena liposukcijom

PE (*Phycoerythrin*) – fluorohrom fikoeritrin

PBS (*Phosphate Buffered Saline*) - azotonični rastvor fosfatnog pufera

PHA (*Phytohemagglutinine*) – fitohemaglutinin

PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) – mononuklearne ćelije periferne krvi

PDT (*Population Doubling Time*) – vreme dupliranja ćelijske populacije

PI (*Propidium Iodide*) – propidijum jodid

PMSF (*phenylmethanesulfonylfluoride*) – inhibitor serinskih proteaza, fenilmetansulfonilfluorid

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

PAI-1 - inhibitor-1 aktivatora plazminogena

PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) - patogen-asocirani molekulski obrasci

PGE₂ – prostaglandin E₂

PDGF (*platelet-derived growth factor*) - trombocitni faktor rasta

RIPA pufer (*Radioimmunoprecipitation buffer*) - pufer za izolaciju membranskih i citosolnih proteina

Rnaza – ribonukleaza

RT (*Reverse Transcription*) – reverzna transkripcija

R – receptor

SM - Standardni medijum

SDS- (*Sodium Dodecyl Sulfate*) – natrijum dodecil sulfat

STRO-1 – stromalni, odnosno mezenhimski marker (protein)

SSEA4 (*Stage Specific Embryonic Antigen*) – membranski antigen specifičan za embrionalne ćelije

ST-HSC (*Short-Term Hematopoietic Stem Cell*) - kratkotrajno repopulišuća populacija

SVF – stromalna vaskularna frakcija

STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) – provodnik signala i aktivator transkripcije

SDF-1 (*stromal-cell derived factor-1*) - faktor stromalnih ćelija-1

SCF (*stem cell factor*) - faktor matičnih ćelija

TRITC (*Tetramethylrhodamine*) – fluorohrom

Treg – regulatorne T ćelije

TIMP (*tissue inhibitor matrix metalloproteinase*) – tkivni inhibitor matriksnih metaloproteinaza

T-MSC (*Tumor Mesenchymal Stem Cells*) – tumorske MMC

TMB (3,3',5,5' Tetramethylbenzidine) - tetrametilbenzidin

TBS (*Tris Buffered Saline*) - alkalni rastvor puferovan Tris-om

TNF (*Tumor Necrosis Factor*) – faktor nekroze tumora

TGF-β (*Tumor Growth Factor-β*) – transformišući faktor rasta -β

TAE (*Tris-acetate-EDTA*) – tris-acetatni-EDTA pufer

TLR (*Toll-like Receptors*) – receptori slični Toll-u

TSG6 (*tumor necrosis factor-inducible gene-6*) - faktor nekroze tumora-inducibilni gen-6

TAM (*tumor associated macrophages*) – makrofagi pridruženi tumorima

TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) – apoptoza-indukujući ligand povezan sa faktorom nekroze tumora

TMS – tumorska mikrosredina

uPA (*urokinase Plasminogen Activator*) – urokinazni aktivator plazminogena

VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) - adhezivni molekul vaskularnih ćelija-1

VEGF (*vascular endothelial growth factor*) - vaskularno endotelški faktor rasta

ZP-MMC – mezenhimske matične ćelije zubne pulpe

ZEB (*Zinc finger E-box binding homebox 1*) – ZEB protein

ZMP – zajednički megakariocitni progenitor

ZLP – zajednički limfoidni progenitor

BIOGRAFIJA AUTORA

Drenka I. Trivanović je rođena 05. maja 1985. godine u Sisku, Republika Hrvatska. Gimnaziju je završila 2004. godine u Zemunu. Biološki fakultet je završila 2009. godine, studijski program Opšta biologija, smer Primenjena genetika sa prosečnom ocenom 8,97. Doktorske studije upisala je na Biološkom fakultetu, 2010. godine na studijskom programu Biologija, smer Imunobiologija, pri čemu je položila sve programom predviđene ispite. Zaposlena je na Institutu za medicinska istraživanja od 2010, kao istraživač pripravnik, a potom od 2012. godine kao istraživač saradnik. Učestvovala je na dva nacionalna projekta finansirana od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, kao i jednom bilateralnom projektu sa republikom Portugal. Publikovala je ukupno 15 bibliografskih jedinica kao autor ili koautor, od čega je 11 publikacija objavljeno u celini.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Тривановић Дренка

број индекса Б3035/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

**Изолација, карактеризација и функционална својства хуманих матичних
ћелија масног ткива**

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: **Тривановић Дренка**

Број индекса: **Б3035/2010**

Студијски програм: **Биологија (Имунобиологија)**

Наслов рада: **Изолација, карактеризација и функционална својства хуманих
матичних ћелија масног ткива**

Ментор: **проф. др Милена Катарановски**

Потписани/а: **Тривановић Дренка**

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Изолација, карактеризација и функционална својства хуманих матичних ћелија масног ткива

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Тривановић Дренка

број индекса Б3035/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

**Изолација, карактеризација и функционална својства хуманих матичних
ћелија масног ткива**

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

Потпис докторанда

У Београду, 07.12.2014.



Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске
верзије докторског рада**

Име и презиме аутора: **Тривановић Дренка**

Број индекса: **Б3035/2010**

Студијски програм: **Биологија (Имунобиологија)**

Наслов рада: **Изолација, карактеризација и функционална својства хуманих
матичних ћелија масног ткива**

Ментор: **проф. др Милена Катарановски**

Потписани/а: **Тривановић Дренка**

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 01.12.2014.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Изолација, карактеризација и функционална својства хуманих матичних ћелија масног ткива

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 01.12.2014.

