



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

**Неда Милосављевић**

**Утицај мезенхималних матичних ћелија на сигнални пут IL-17 у моделима  
акутног хепатитиса и фиброзе јетре**

**ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА**

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

Крагујевац, 2018. године

## ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<b><i>I Аутор</i></b>	
Име и презиме: Неда Милосављевић	
Датум и место рођења: 28.08.1986. Краљево	
Садашње запослење: лекар на специјализацији	
<b><i>II Докторска дисертација</i></b>	
Наслов: Утицај мезенхималних матичних ћелија на сигнални пут IL-17 у моделима акутног хепатитиса и фиброзе јетре	
Број страница: 149	
Број слика: 6	
Број библиографских података: 330	
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, Крагујевац	
Научна област (УДК): Имунологија, инфекција и инфламација	
Ментор: др сци. мед. Владислав Воларевић, ванредни професор	
<b><i>III Оцена и одбрана</i></b>	
Датум пријаве теме: 09.06.2017.	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: 08.09.2017. године; IV-03-829/35	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:	
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Миодраг Л. Лукић, професор емеритус Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Микробиологија и имунологија</i>, председник;</li><li>2. Проф. др Владимир Трајковић, ванредни професор Медицинског факултета Универзитета у Београду, за ужу научну област <i>Имунологија</i>, члан;</li><li>3. Проф. др Иван Јовановић, ванредни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за уже научне области <i>Микробиологија и имунологија</i> и <i>Онкологија</i>, члан;</li></ol>	
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:	
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Проф. др Миодраг Лукић, редовни професор - емеритус Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Микробиологија и имунологија</i>, председник;</li><li>2. Проф. др Данило Војводић, редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду, за ужу научну област <i>Имунологија</i>, члан;</li><li>3. Доц. др Александар Арсенијевић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну област <i>Онкологија</i>, члан.</li></ol>	
Датум одбране дисертације:	

## Сажетак

Мезенхималне матичне ћелије (MSCs), паракриним механизмима, редукују акутно оштећење и фиброзу јетре. С обзиром да утицај мезенхималних матичних ћелија (MSCs) на IL-17 сигнални пут у акутном хепатитису и фибрози јетре није познат, анализирани су молекулски механизми одговорни за MSCs-зависну модулацију IL-17 у овим болестима.

У експерименталним моделима акутног хепатитиса изазваним  $\alpha$ -галактоцерамидом ( $\alpha$ GalCer) и угљен тетра хлоридом ( $CCl_4$ ), MSCs су редуковале хепатотоксичност NKT ћелија паракриним механизмом који зависи од активности индоламин 2, 3-диоксигеназе (IDO). Смањена концентрација инфламацијског IL-17 и повећана концентрација имуносупресивног IL-10, мањи број IL-17-продукујућих NKT ћелија (NKT17) и веће присуство IL-10-продукујућих FoxP3<sup>+</sup>NKT ћелија (NKTreg) уочени су у јетрама оболелих мишева који су примили MSCs. Примена кондиционираног медијума MSCs (MSC-CM) значајно је редуковала акутни хепатитис узрокујући конверзију хепатотоксичних NKT17 у имуносупресивне NKTreg. Примена 1-метил триптофана (1-MT), фармаколошког инхибитора IDO-а, у потпуности је супримирала имуномодулаторне ефекте MSC-CM.

У моделу  $CCl_4$ -индуковане фиброзе јетре, MSCs су значајно редуковале фиброзу јетре смањењем серумске концентрације IL-17 и повећањем концентрације имуносупресивних IL-10, IDO и кинуренина. MSCs су значајно смањиле број интрахепатичних Th17 лимфоцита и повећале проценат CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Т ћелија. Слично као и MSCs, и MSC-CM значајно је редуковао број Th17 лимфоцита у јетри, смањено концентрацију IL-17 у серуму и поспешило експанзију CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> регулаторних Т лимфоцита. Примена 1-MT у потпуности је супримирала хепатопротективни и имуномодулацијски ефекат MSC-CM.

Најважнији закључак ове докторске дисертације је да MSCs, активношћу IDO-а, редукују акутни хепатитис индукујући конверзију хепатотоксичних NKT17 ћелија у имуносупресивне NKTreg, док у фибрози јетре инхибирају ослобађање IL-17 из Th17 лимфоцита и повећавају присуство имуносупресивних IL-10-продукујућих Tregs у јетри, доприносећи значајном смањењу фиброзе.

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

## **Abstract**

Mesenchymal stem cells (MSCs), in paracrine manner, reduce acute hepatitis and liver fibrosis. Considering that mechanism by which MSCs modulate IL-17 signaling in acute hepatitis and liver fibrosis is still unknown, molecular mechanisms responsible for MSCs-dependent modulation of IL-17 in these diseases, were analysed.

In experimental models,  $\alpha$ -galactosylceramide ( $\alpha$ -GalCer)- and carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced acute hepatitis, MSCs attenuate hepatotoxicity of NKT cells in a paracrine, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-dependent manner. Decreased concentration of inflammatory IL-17, increasing immunosuppressive IL-10, reduced number of IL-17 producing NKT (NKT17) cells and increased number of FoxP3<sup>+</sup> IL-10 producing NKT regulatory (NKTreg) cells in the injured livers of MSC-treated mice.

Injection of MSC conditioned medium (MSC-CM) attenuates acute hepatitis, by converting hepatotoxic NKT17 into immunosuppressive NKTreg. Immunomodulatory effects of MSC-CM were completely abrogated in the presence of IDO inhibitor, 1-methyltryptophan (1-MT).

In CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis, MSCs significantly attenuated CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis by decreasing serum levels of inflammatory IL-17, increasing immunosuppressive IL-10, IDO and kynurenine. MSCs reduce number of IL-17 producing, intrahepatic Th17 cells and increase percentage of CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> T cells.

Similar to MSCs, injection of MSC-CM decreases number of Th17 cells in the liver and serum levels of IL-17. MSC-CM promoted expansion of CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> T regulatory cells. In presence of 1-MT, hepatoprotective and immunomodulatory effect of MSC-CM was completely abrogated.

The most important conclusion is that MSCs, in IDO-dependent manner, reduce acute hepatitis, by inducing conversion of hepatotoxic NKT17 cells into immunosuppressive NKTreg, while in liver fibrosis, they suppress Th17 production of IL-17 and increase presence of immunosuppressive IL-10 producing Tregs in liver, thus contributing to a significant fibrosis attenuation.

**Keywords:** Mesenchymal stem cells, IL-17, acute hepatitis, liver fibrosis

*Због несебичног залагања и подршке током израде ове докторске дисертације неизмерну захвалност дугујем свом ментору, проф. др Владиславу Воларевићу.*

*Хвала др Бојани Симовић Марковић и др Марини Газдић на подршци и уложеном труду.*

*Проф. др Миодрагу Лукићу и проф. др Небојши Арсенијевићу захваљујем на указаном поверењу.*

*Хвала породици и колегама на подршци и разумевању.*

## САДРЖАЈ

<b>1. УВОД.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1. Јетра, морфолошке и функционалне карактеристике.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2. Обољења јетре.....</b>	<b>10</b>
<b>1.2.1. АКУТНИ ХЕПАТИТИС.....</b>	<b>15</b>
1.2.1.1. Дефиниција и етиологија.....	15
1.2.1.2. Клиничка слика акутног хепатитиса.....	16
1.2.1.3. Улога ћелија имунског система у патогенези акутног хепатитиса.....	16
1.2.1.3.1. Урођеноубилачки Т лимфоцити.....	19
1.2.1.4. Улога цитокина у патогенези акутног хепатитиса.....	21
1.2.1.4.1. IL-17 у акутном хепатитису.....	21
1.2.1.5. Дијагноза акутног хепатитиса.....	23
1.2.1.6. Терапија акутног хепатитиса.....	23
<b>1.2.2. ФИБРОЗА ЈЕТРЕ.....</b>	<b>23</b>
1.2.2.1. Дефиниција и етиологија.....	23
1.2.2.2. Патогенеза фиброзе јетре.....	24
1.2.2.3. Клиничка слика фиброзе јетре.....	26
1.2.2.4. Улога ћелија имунског система у фибрози јетре.....	26
1.2.2.5. Цитокини који су важни у имунорегулацији фиброзе јетре.....	28
1.2.2.6. Дијагноза фиброзе јетре.....	29
1.2.2.7. Терапија фиброзе јетре.....	29
<b>1.3. МЕЗЕНХИМАЛНЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ.....</b>	<b>30</b>
1.3.1. Механизми којима MSCs модулирају имунски одговор.....	30
1.3.2. Улога MSCs у акутном хепатитису и фибрози јетре.....	31
<b>1.4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ АКУТНОГ ХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ.....</b>	<b>32</b>
1.4.1. Акутни хепатитис индукован CCl <sub>4</sub> .....	33
1.4.2. Фиброза јетре изазвана CCl <sub>4</sub> .....	33

1.4.3. Акутни хепатитис индукован $\alpha$ -GalCer-ом.....	34
2. ЦИЉ РАДА.....	35
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ.....	36
3.1. Ћелијска линија мишићних MSCs.....	36
3.2. Ћелијска линија хуманог карцинома јетре (HepG2).....	36
3.3. Кондиционирани медијум мезенхималних матичних ћелија (MSC-CM).....	37
3.4. Фармаколошка инхибиција IDO.....	37
3.5. Експерименталне животиње.....	37
3.6. Индукција акутног хепатитиса и апликација MSCs.....	38
3.7. Индукција фибозе јетре и апликација MSCs.....	39
3.8. Трансплантација MSCs у развијеној фибрози изазваној CCl <sub>4</sub> .....	39
3.9. Биохемијска анализа оштећења јетре.....	39
3.10. Патохистолошка анализа ткива јетре.....	40
3.10.1. Бојење хематоксилином и еозином (H&E).....	40
3.10.2. <i>PicroSirius-Red</i> бојење.....	41
3.11. Мерење концентрације цитокина и имуносупресивних фактора које продукују MSCs у серуму.....	41
3.12. Одређивање кинуренина у серуму.....	43
3.13. Одређивање профиброгених протеина полимеризованом ланчаном реакцијом.....	43
3.13.1. Изолација РНК.....	43
3.13.2. Реверзна транскрипција.....	44
3.13.3. Реакција ланчаног умножавања у реалном времену.....	44
3.14. Изолација моноклеарних ћелија из јетре.....	45
3.15. Фенотипизација моноклеарних ћелија јетре проточном цитометријом.....	46
3.16. Детекција MSCs у јетрама мишева третираних CCl <sub>4</sub> .....	50
3.17. Изолација NKT ћелија из јетре.....	50
3.18. Изолација CD4 <sup>+</sup> Т лимфоцита помоћу магнетне сепарације.....	51
3.19. Мерење цитотоксичности NKT ћелија употребом xCELLigence система.....	52
3.20. Испитивање паракриних ефеката MSCs на хепатотоксичност NKT ћелија <i>in</i> <i>vitro</i> .....	53

3.21.	Испитивање паракриних ефеката MSCs на функцију CD4 <sup>+</sup> Т лимфоцита <i>in vitro</i> .....	53
3.22.	Изолација стелатних ћелија јетре.....	54
3.23.	Кокултивација MSCs, CD4 <sup>+</sup> Т лимфоцита и стелатних ћелија.....	54
3.24.	Статистичка обрада података.....	55
<b>4.</b>	<b>РЕЗУЛТАТИ.....</b>	<b>56</b>
<b>4.1.</b>	<b>УТИЦАЈ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА НА СИГНАЛНИ ПУТ IL-17 У МОДЕЛУ АКУТНОГ ХЕПАТИТИСА.....</b>	<b>56</b>
4.1.1.	Једнократна апликација MSCs значајно смањује акутно оштећење јетре које је изазвано CCl <sub>4</sub> , смањује инфилтрацију инфламацијским ћелијама концентрацију IL-17 у серуму.....	56
4.1.2.	Примена MSCs значајно смањује број NKT ћелија које продукују IL-17, али не утиче на број неутрофила, CD4 <sup>+</sup> и CD8 <sup>+</sup> Т лимфоцита који продукују IL-17 у акутном оштећењу јетре изазваном CCl <sub>4</sub> .....	59
4.1.3.	У експерименталном моделу акутног хепатитиса изазваног NKT ћелијама, мезенхималне матичне ћелије смањују укупан број NKT ћелија које продукују IL-17 <sup>+</sup> а повећавају број FoxP3 <sup>+</sup> IL-10 <sup>+</sup> NKT ћелија.....	61
4.1.4.	MSCs смањују хепатотоксичност NKT ћелија јетре.....	65
4.1.5.	MSCs, паракриним механизмом, смањују продукцију IL-17 у NKT ћелијама.....	65
4.1.6.	Смањење хепатотоксичности NKT ћелија, посредством MSCs, зависи од IDO.....	68
<b>4.2.</b>	<b>УТИЦАЈ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА НА СИГНАЛНИ ПУТ IL-17 У МОДЕЛУ ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ.....</b>	<b>70</b>
4.2.1.	Интравенски апликоване MSCs мигрирају у јетру експерименталних животиња који су примали CCl <sub>4</sub> и смањују изазвану фиброзу.....	70
4.2.2.	MSCs значајно редукују фиброзу јетре изазвану CCl <sub>4</sub> .....	71
4.2.3.	MSCs смањују ниво IL-17 у серуму и инфилтрацију CD4 <sup>+</sup> Т лимфоцита који продукују IL-17 у јетрама мишева третираних CCl <sub>4</sub> .....	74
4.2.4.	MSCs паракриним механизмом супримирају Th17 лимфоците.....	77
4.2.5.	Примена 1-MT <i>in vivo</i> погоршава фиброзу јетре.....	82



<b>4.2.6. Терапијска примена MSCs смањује фиброзу јетре у развијеној болести.....</b>	86
<b>5. ДИСКУСИЈА.....</b>	89
<b>5.1. MSCs редукују акутно оштећење јетре смањењем броја NKT17 ћелија и повећањем присуства регулаторних NKT ћелија у јетри.....</b>	89
<b>5.2. Мезенхималне матичне ћелије редукују фиброзу јетре смањењем броја Th17 лимфоцита у јетри.....</b>	92
<b>6. ЗАКЉУЧЦИ.....</b>	97
<b>СКРАЋЕНИЦЕ.....</b>	98
<b>7. РЕФЕРЕНЦЕ.....</b>	100
<b>8. ПРИЛОГ.....</b>	
8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА.....	
8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION.....	
8.3. БИОГРАФИЈА.....	
8.4. БИБЛИОГРАФИЈА.....	

## 1. УВОД

У уводном делу су описана морфолошка и функционална својства јетре, приказане су опште карактеристике и класификација обољења јетре. Уз то, објашњена је етиологија, клиничка слика, дијагноза и прогноза акутног хепатитиса и фиброзе јетре, улога ћелија имунског система, цитокина, а посебно IL-17 у имунопатогенези ових ентитета. Такође, описана је детаљна патогенеза експерименталног акутног хепатитиса и фиброзе јетре, имуномодулацијски ефекти мезенхималних матичних ћелија, као и терапијски потенцијал који ове ћелије имају у лечењу патологије јетре.

### 1.1. Јетра: морфолошке и функционалне карактеристике

Јетра је витални орган, неопходан за функционисање организма сисара. Налази се у десном хемиабдомену, десном горњем квадранту, испод дијафрагме, покривена ребарним луком. Јетра поседује велики број функција: обавља детоксикацију метаболита; синтетише протеине, укључујући ензиме, хормоне, факторе коагулације, цитокине, као и биохемијске продукте, неопходне за дигестију (1, 2); филтрира крв из дигестивног тракта, која у њу долази путем *Venae portae*; метаболише хемикалије, лекове и алкохол. Овај орган игра значајну улогу у конвертовању амонијака у уреу, која се потом екскретује преко бубрега. Такође, јетра представља депо за липо- и хидросолубилне витамине (витамин B12, фолну киселину, гвожђе, витамин А, витамин D, витамин Е и витамин К). Сходно наведеним улогама, јетра учествује у уклањању непотребних продуката организма, али и лекова, бактерија, гљивица, вируса, паразита, хемикалија, масти и алкохола (2, 3).

### 1.2. ОБОЉЕЊА ЈЕТРЕ

Узроци обољења јетре су бројни, где поремећаји у функционисању и оштећењу јетре, настају као последица инфекције (вирусни хепатитис) (4, 5), хроничне употребе алкохола (6), као последица примене бројних лекова (парацетамол, амоксицилин, ципрофлоксацин, хлорпромазин, еритромицин и други) (7, 8) (Табела 1).

Генетски предиспониране особе могу развити аутоимунска обољења јетре, чија патогенеза још увек није разјашњена, а може се манифестовати у три клиничка ентитета: аутоимунски хепатитис, примарна билијарна цироза и примарни склерозирајући холангитис (5, 9, 10).

Оштећење јетре може бити и последица функционалних или опструктивних поремећаја, затим и као последица поремећаја депоновања гликогена, холестерола, амилоида. У јетри се могу развити примарни тумори: хепатоцелуларни кацином, који је заступљен у око 90% случајева или холангиоцелуларни карцином (11).

Оштећење јетре може бити и последица поремећаја васкуларизације, а обзиром да јетра има двоструку васкуларизацију и да заузима централно место у метаболизму организма, примарни тумори дигестивног тракта метастазирају у јетру (3, 12, 13).

Обзиром да бројни етиолошки и патогенетски механизми још увек непознати, ниједна доступна класификација болести није апсолутно адекватна (5, 14).

#### **Наследне хипербилирубинемије**

*Gilbert*-ов синдром

*Crigler-Najjar*-ов синдром, I и II тип

*Dubin Jonson*-ов синдром

*Rotor*-ов синдром

#### **Вирусни хепатитиси**

Хепатитис А

Хепатитис Б

Хепатитис Ц

Хепатитис Е

Остали (*Epstein-Barr* вирус- мононуклеоза)

Херпес вирус, хепатитис узрокован аденовирусом)

Криптогени хепатитис

### Имунске и аутоимунске болести јетре

Примарна билијарна цироза

Аутоимунски хепатитис

Склерозирајући холангитис

Болест калем против домаћина (енг. *Graft-versus-host*)

*Overlap* синдром

Одбацивање алографта

### Генетске болести јетре

Дефицијенција  $\alpha 1$  антитрипсина

Хемохроматоза

Вилсонова болест

Бенигна рекурентна интрахепатична холестаза

Прогресивна фамилијарна интрахепатична холестаза, типови I-III

Остало (галактоземија, тирозинемија, цистична фиброза, *Newman-Pick*-ова болест, *Gaucher*-ова болест)

### Алкохолна болест јетре

Акутна стеатоза јетре

Акутни алкохолни циститис

*Laennec*-ова цироза

### Неалкохолна стеатоза јетре

Стеатоза

Стеатозни хепатитис

### Акутна стеатоза јетре у трудноћи

### Обољења јетре у оквиру системских болести

Саркоидоза

Амилоидоза

Поремећај депоновања гликогена

Целијачна болест

Туберкулоза

Инфекција са *Mycobacterium avium-intracellulare*

### Холестатски синдроми

Бенигна постоперативна холестаза

Жутица у оквиру сепсе

Жутица узрокована потпуном парентералном исхраном

Холестаза у трудноћи

Холангитис и холесциститис

Екстрахепатична билијарна опструкција (камен, стриктура, карцином)

Билијарна атрезија

*Caroli*-јева болест

Криптосторидоза

### Лековима узрокована болест јетре

Доминатно хепатоцелуларно оштећење (изонијазид, ацетаминофен)

Доминатно холестатско оштећење (метилтестостерон)

Мешовита оштећења (сулфонамиди, фенитоин)

Микро- и макроваскуларна стеатоза (метотрексат, фиалуридин)

## Васкулана оштећења јетре

Вено-оклузивна болест

*Budd-Chiari* синдром

Исхемијски хепатитис

Пасивна конгестија

Тромбоза вене порте

Нодуларна регенеративна хиперплазија

## Лезије јетре

Хепатоцелуларни карцином

Холангиокарцином

Аденоми јетре

Фокална нодуларна хиперплазија

Метастаски тумори

Абсцеси

Цисте

Хемангиом

**Табела 1: Класификација обољења јетре.** Кориговано према: *Kasper, Denis L. Et al. Harrison's Principles of Internal Medicine, 19<sup>th</sup> edition. 2015.*

Обољења јетре се, у зависности од тока болести, могу поделити на хиперакутне, акутне, субакутне и хроничне (15).

Хиперакутно оштећење настаје у року од седам дана од почетка првих симптома, акутно оштећење карактерише интервал јављања симптома између 8. и 28. дана, док се термин субакутни хепатитис користи за случајеве код којих се енцефалопатија јавља између 5.

и 12. недеље. Хронично оштећење јетре карактеришу симптоми и знакови болести који настају након 12. недеље од почетка болести (16, 17).

Акутно оштећење јетре се карактерише брзом некрозом хепатоцита, а у одсуству претходног обољења јетре (16). Настала некроза хепатоцита узрокује рапидан губитак функције јетре и карактерише се жутицом, израженом коагулопатијом и хепатичном енцефалопатијом (18).

Хронично оштећење јетре настаје као последица фиброзних промена у јетри, те нарушавања нормалне архитектонике и функције јетре (19) која у касном стадијуму болести може прогредирати у цирозу јетре и хепатоцелуларни карцином (20, 21). Карактерише се појавом жутице, асцитом – присуством слободне течности у абдомену, енцефалопатије и гастроинтестиналним крварењима (22, 23).

## 1.2.1. АКУТНИ ХЕПАТИТИС

### 1.2.1.1. Дефиниција и етиологија

Акутно оштећење јетре је обољење које се манифестује брзом некрозом хепатоцита, најчешће код особа без претходног обољења јетре (16) у коме се знакови болести јављају унутар осам недеља од појаве првих симптома (17, 24).

Акутно оштећење јетре се, у односу на временски ток болести, може поделити на хиперакутно, акутно и субакутно оштећење јетре (25).

Узроци акутног оштећења јетре су бројни и значајно се разликују између развијених земаља и земаља у развоју. Најчешћи узроци су вирусне инфекције, примена лекова, метаболичка оштећења, токсични производи, иако је у великом броју случајева етиологија непозната (16).

У већини земаља у развоју, вируси хепатитиса (А, В, С, и Е) су најзаступљенији узрочници акутног оштећења јетре, са процентом смртности и до 50 % (26-28). У ређе узрочнике се могу убројати хепатотропни вируси, као што су: херпес *simplex* вирус, цитомегаловирус, *Epstein-Barr* вирус и парвовируси (29).

У развијеним земљама, токсично дејство лекова је најчешћи узрочник акутног оштећења јетре (16, 30), када је проценат преживљавања мањи од 50% уколико трансплантација

није могућа (31). Акутно оштећење јетре могу изазвати и лекови: парацетамол (31, 32), антибиотици (амоксицилин у комбинацији са клавуланском киселином, цефазолин, ципрофлоксацин) (8, 33, 34), туберкулостатици, хиполипемиси, биљни суплементи (29, 35, 36), као и одређени наркотици: екстази (*3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine*, MDMA) и кокаин (*benzoylecgonine*) (16).

Поред наведеног, оштећење јетре може бити последица исхемијског оштећења јетре, код болесника са примарним срчаним, васкуларним или респираторним поремећајима (36). Може бити последица малигнитета, аутоимунске реакције али и метаболичких болести, (Вилсонова болест) (29, 37, 38).

#### **1.2.1.2. Клиничка слика акутног хепатитиса**

Симптоми акутног оштећења јетре су следећи: мучнина, повраћање, свраб, умор, малаксалост, бол у абдомену, губитак у телесној маси, мијалгија, односно артралгија. Физикалним прегледом се уочава жутица коже и видљиве слузокоже, хепатомегалија која може бити праћена спленомегалијом, и у мањем броју случајева присуством слободне течности у абдомену (асцит) (29, 39).

Стање пацијента се може додатно компликовати развојем кардиореспираторне инсуфицијенције, холестазом различитог интензитета, развојем бубрежне слабости, коагулопатијом због смањене способности јетре да синтетише факторе коагулације, настанком интракранијалне хипертензије, односно прогресивном хепатичном енцефалопатијом удруженом са бројним метаболичким поремећајима (16, 40-43).

#### **1.2.1.3. Улога ћелија имунског система у патогенези акутног хепатитиса**

У акутном оштећењу јетре, изазваном различитим факторима, централну улогу има развој инфламацијског одговора, који обухвата и резидентне и инфламацијске ћелије које инфилтришу јетру. Због своје улоге и чињенице да јетра прима и порталну (венску) и артеријску крв, она представља значајну и критичну компоненту у одбрани организма од антигена из крви (44). У јетри су присутне бројне ћелије урођеног и стеченог имунског одговора (35, 45).



У урођеном имунском одговору учествују моноцити, дендритске ћелије, макрофаги (Купферове ћелије), урођеноубилачке ћелије (енг. *Natural killer (NK) cells*) и урођеноубилачки Т (NKT) лимфоцити, као и цитокини, хемокини, протеини система комплемента (46).

Акумулација неутрофила на место оштећења у јетри настаје због тзв. механичког заробљавања ових ћелија у најближим синусоидалним крвним судовима, односно као последица измена, како у самим активираним неутрофилима, тако и синусоидалним ендотелним ћелијама које експримирају CD44, али и због смањеног протока крви у капиларима (49). Поред CD44, у миграцији неутрофила у јетру су укључени и протеини система комплемента, хемокини (као што је CXCL8) и цитокини (TNF- $\alpha$  и IL-1) (50).

Неутрофили као професионални фагоцити (49), су прве ћелије које мигрирају у акутно оштећену јетру (50), где ослобађају реактивне облике кисеоника (енг. *reactive oxygen species*, ROS), оксидансе, кателицидине, дефенсине и лактоферин (49-53), хемокине, цитокине и факторе раста (TNF- $\alpha$ , IL-1 и GM-CSF), који привлаче нове неутрофиле и одржавају инфламацијску реакцију (9, 50).

Експесивно накупљање неутрофила може изазвати инфламацију и оштећење ткива јетре (54), што је показано у бројним експерименталним моделима (58-60). Неутрофили могу оштетити хепатоците на различите начине: ослобађањем реактивних облика кисеоника и протеаза (47), продукцијом мијелопероксидазе (58), као и активношћу IL-17 (6).

Моноцити су део монуклеарног фагоцитног система (59, 60). Код мишева, моноцити експримирају следеће рецепторе за хемокине: CD62L (*L-selectin*), LFA-1 ( $\alpha$ L $\beta$ 2 *integrin*), Mac-1 ( $\alpha$ M $\beta$ 2 *integrin*), PECAM-1 (CD31) и VLA-4 ( $\alpha$ 4 $\beta$ 1) (61). На месту инфламације диферентују у макрофаге и имају улогу у уклањању оштећених ћелија и ремоделовању ткива (62).

Купферове ћелије су резидентни макрофаги јетре, присутни у јетри, дуж лумена синусоидалних простора (60, 62, 63). Имају улогу у фагоцитози и инфламацији (продукују бројне цитокине, попут IL-1, IL-6, GM-CSF, TNF $\alpha$ ) (64), подстичу инфлукс моноцита и неутрофила у инфламирану јетру (65). Својом прекомерном активношћу могу да оштете здраве хепатоците продукцијом реактивних облика кисеоника, про-инфламацијских цитокина и привлачењем неутрофила на место оштећења (65).

За разлику од класично активираних (M1) макрофага, алтернативно активирани (M2) макрофаги имају анти-инфламацијску, имуносупресивну улогу коју остварују продукцијом имуносупресивног цитокина IL-10 и неопходни су за одржавање хомеостазе у јетри (66-68). Уз IL-10, M2 макрофаги продукују и IL-4 и IL-13 којим утичу на репаративне процесе јетре (66-68).

Експерименталне студије на анималним моделима показују да су Купферове ћелије укључене у бројне патогенетске механизме оштећења јетре (67).

Мастоцити се налазе у близини крвних судова јетре и жучних путева (69-70). У хепатитису и фибрози јетре, у већем броју инфилтришу јетру и оштећују хепатоците (70-73). Улога базофила у оштећењу јетре још увек није довољно испитана (44). Као и мастоцити, мигрирају у јетру у оквиру запаљенског одговора (74, 75).

Еозинофили играју значајну улогу у патогенези примарне билијарне цирозе, примарног склерозирајућег холангитиса, акутном оштећењу јетре које је изазвано лековима (76-78).

Дендритске ћелије (енг. *dendritic cells*, DCs) јетре имају значајну улогу у индукцији и регулацији имунског одговора и представљају везу између урођеног и стеченог имунског одговора у јетри (44).

NK ћелије су бројне у јетри и представљају прву линију одбране (72, 77). У људи, NK ћелије јетре (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) чине и до 30% резидентних лимфоцита, а код мишева чине 5-10% популације и дефинишу се као NK1.1<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> (за C57BL/6 сој) или као DX5<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> (79, 80). NK ћелије имају улогу у ремоделовању и фибрози јетре, антивирусном и антитуморском одговору (81, 44).

Специфични, цитотоксички CD8<sup>+</sup> Т лимфоцити имају значајну улогу у хепатотропним вирусним инфекцијама (инфекције хепатитис В и С вирусима) и хепатоцелуларном карциному (82), обзиром да су ове ћелије способне да препознају инфициране или измењене ћелије и униште их (83-85).

Њихова заштитна и деструктивна функција, након препознавања антигена, зависи од способности ових ћелија да мигрирају у јетру, препознају хепатоцелуларне антигене и ослобађањем цитотоксичних молекула оштете хепатоците (86).

Активирани CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити мигрирају на место инфламације у јетри, и у зависности од субпопулације, могу имати про-инфламацијску или имуносупресивну улогу у

акутном хепатитису (87). Th1 лимфоцити продукцијом IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  поспешују хепатотоксичност NK и NKT ћелије, и подстичу макрофаге да секретују инфламацијске цитокине (IL-1, IL-12, TNF- $\alpha$ ) и хемокине (87). Регулаторни Т лимфоцити (*Tregs*), који чине од 0.5% - 1% укупног броја лимфоцита у јетри здраве особе (88) супримирају пролиферацију и функцију ефекторских Т лимфоцита (89). Т регулаторни лимфоцити имају значајну улогу у контроли имунског одговора у јетри (90). Показано је, у експерименталном моделу фулминантног хепатитиса изазваног применом Конканавалина А (енг. *Concanavalin A*, Con A), да CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Treg супримирају Th1 лимфоците продукцијом имunosупресивних цитокина (TGF- $\beta$  и IL-10) (91, 92). Такође, познато је да деплеција регулаторних Т лимфоцита (применом анти-CD25 антитела), узрокује масивну некрозу хепатоцита, а адоптивни трансфер CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Т лимфоцита смањује оштећење јетре у експерименталном моделу изазваном Con A (91).

#### 1.2.1.3.1. Урођеноубилачки Т лимфоцити

Урођеноубилачки Т лимфоцити (енг. *Natural Killer T cells*, NKT) су ћелије урођеног имунског система које имају важну улогу у патогенези фулминантног хепатитиса (93, 94). NKT ћелије експримирају Т ћелијски рецептор (енг. *T cell receptor*, TCR) и маркере NK ћелија као што су NK1.1, NKG2A, NKG2C, NKG2D, NKG2E, Ly49a и CD49b (који су експримирани на мишијим ћелијама), односно CD56, CD16 и CD161 (који су експримирани на ћелијама људи) (95, 96). NKT ћелије препознају гликолипидне антигене приказане у склопу CD1d молекула, неполиморфног MHC-like молекула I класе на мембрани ћелија које презентују антигене (енг. *antigen-presenting cells*, APCs): дендритским ћелијама, В и Т лимфоцитима и макрофагима (97, 98).

На основу фенотипа, NKT ћелије се деле на тип I, односно инваријантне NKT ћелије (енг. *invariant NKT cells*, iNKT) и тип II NKT ћелије (99, 100).

iNKT ћелије су многобројније у односу на тип II и код мишева чине око 50% интрахепатичних лимфоцита (101, 102). iNKT ћелије експримирају инваријантни  $\alpha$  ланац TCR-а, настао реаранжирањем V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 ланца (у мишева), односно хомолог V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 ланца (у људи). Инваријантни  $\alpha$  ланац TCR-а упарује се са  $\beta$  ланцем, ограничене хетерогености (код мишева: V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7 или V $\beta$ 2, а код људи V $\beta$ 11 ланац) (103, 104). Ове ћелије препознају  $\alpha$ -галактоцерамид (енг.  *$\alpha$ -galactosylceramide*,  $\alpha$ -GalCer)

приказан у склопу CD1d молекула (105, 106). NKT ћелије тип II, које су бројније код људи, експримирају TCR молекул који поседује већу разноликост (106, 107) и препознаје хидрофобне антигене. Диференцијацијом хематопоезних прекурсора iNKT ћелије сазревају у тимусу, где подлежу негативној и позитивној селекцији, након које, као функционално компетентне, зреле ћелије мигрирају у периферне органе (108).

Активација NKT почиње по препознавању антигена у склопу CD1d молекула на APCs (97, 108-111). Активирани NKT ћелије продукују Th1 (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ), Th2 (IL-4, IL-10), Th17 (IL-17, IL-22) цитокине (109, 112-114) неколико часова по активацији. Уз то, NKT ћелије могу да оштете хепатоците експресијом FasL који се везује за Fas рецептор на хепатоцитима, и ослобађањем серин протеаза (96, 97, 114). NKT ћелије продукују и бројне друге цитокине: IL-3, IL-5, IL-9, IL-13, IL-21, колоностимулишући фактор гранулоцита и макрофага (енг. *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) (115, 116). NKT ћелије, посредством CD40L-CD40 интеракције, стимулишу дендритске ћелије да продукују IL-12, који је важан за активацију T-bet транскрипционог фактора и последичну продукцију Th1 цитокина у NKT ћелијама (116, 117).

NKT ћелије, током инфламације, у повећаном броју мигрирају у јетру, што је праћено повећаном експресијом CD1d на површини APCs и хепатоцита (118, 119). NKT ћелије конститутивно експримирају mRNA, која кодира већи број про-инфламацијских цитокина (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 и IL-4) (120), који се, након активације ових ћелија, брзо секретују (121) што омогућава NKT ћелијама да, у неколико сати након активације, директно оштећују хепатоците и индиректно (подстицањем миграције осталих имунских ћелија у јетру) доприносе прогресији фулминантног хепатитиса. Уз то, NKT ћелија имају важну инфламацијску улогу у примарној билијарној цирози, токсичним и исхемијским оштећењима јетре и стеатози (122-125).

За разлику од про-инфламацијске улоге NKT ћелија, у којој доминантну улогу игра тип I (iNKT ћелије), тип II NKT ћелија поседују антиинфламацијску улогу, ограничавајући оштећење хепатоцита. Овај субпопулација експримира T ћелијски рецептор веће разноликости него iNKT ћелије и карактерише се смањеном осетљивошћу на  $\alpha$ -GalCer. (113, 121, 125).

#### 1.2.1.4. Улога цитокина у патогенези акутног хепатитиса

Цитокини играју значајну улогу у патофизиологији акутног хепатитиса, узрокујући некрозу хепатоцита, екстрахепатичне компликације и регенерацију хепатоцита (90, 126). Каскада активације про-инфламацијских цитокина (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-17) у акутном хепатитису је слична оној у сепси (92, 127).

У раној фази оштећења јетре, високе концентрације TNF- $\alpha$  штите хепатоците од апоптозе, док континуирано повећање индукује апоптозу и некрозу хепатоцита. Повећање TNF- $\alpha$  је праћено повећаном експресијом TNF- $\alpha$  рецептора 1 (128-131).

У акутном оштећењу јетре, NK ћелије и Т лимфоцити продукују IFN- $\gamma$  који потом активира макрофаге (92). Смањена продукција IFN- $\gamma$  у акутном оштећењу јетре редукује оштећење хепатоцита (132).

На основу до сада објављених резултата, IL-6, кога продукују макрофаги и Т лимфоцити, може имати про-инфламацијску и анти-инфламацијску улогу у акутном оштећењу јетре (133). Поједине студије су показале да повећана експресија IL-6 корелира са тежином оштећења јетре у акутном хепатитису (90, 133), док су друге студије указале да IL-6 остварује протективну улогу у оштећењу јетре путем индукције антиапоптотских протеина (Bcl-xL, Bcl-2 и FLIP), активације STAT3 (енг. *signal transducer and activator of transcription-3*, STAT3) сигналног пута и инхибиције секреције IFN- $\gamma$  (134, 135).

Анти-инфламацијски и хепатопротективни цитокин IL-10 смањује продукцију про-инфламацијских цитокина и инхибира активацију моноцита (преко сигналног пута NF- $\kappa$ B) (90). Смањена концентрација IL-10 у серуму пацијената са акутним оштећењем јетре представља неповољан прогностички параметар (136).

##### 1.2.1.4.1. IL-17 у акутном хепатитису

Интерлукин 17 (енг. *Interleukin-17*, IL-17) је плејотропни про-инфламацијски цитокин, ког продукују NK и NKT ћелије, CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити, урођене лимфоидне ћелије,  $\delta\gamma$  Т лимфоцити (137-140). Описано је шест изоформи IL-17 (IL-17A - IL-17F). IL-17A је до сада најбоље описан, док IL-17F поседује 60% хомологије са IL-17A, али има 10 пута мањи афинитет за своје рецепторе (139). IL-17A може формирати хомодимере или хетеродимере, а када се веже за свој рецептор IL-17RA, даље регрутује инфламацијске

ћелије и последично узрокује развој инфламацијског одговора (140). Активирани  $\alpha$ -GalCer-ом, iNKT продукују IL-17A, IL-17F, IL-21, и IL-22 (138).

Секрецију IL-17 у NKT ћелијама индукују IL-6 и IL-23, путем JAK-STAT сигналног пута и преко PI3K киназе и NF- $\kappa$ B (енг. *nuclear factor*-  $\kappa$ B). (141, 142). STAT3 и/или NF- $\kappa$ B у овом случају се транслоцирају у једро где поспешују продукцију IL-17 активацијом транскрипционог фактора ROR $\gamma$ T (142).

Постоји неколико различитих хетеродимерних рецептора за IL-17, при чему је IL-17RA експримиран на великом броју ткива (јетра, плућа, црева, масно ткиво) и ћелијским популацијама (ћелије имунског система и ендотелне ћелије) (141, 142). На свим ћелијама јетре (укључујући хепатоците, Купферове ћелије, синусоидалне ендотелне ћелије) се могу наћи рецептори за IL-17 (143).

IL-17 има значајну улогу у патогенези обољења јетре (143). Укључен је у мобилизацију, регрутовање и активацију инфламацијских ћелија (90). У инфекцији изазваној хепатитисом В вирусом, IL-17 стимулише продукцију IL-8, који пак учествује у регрутовању неутрофила у јетру (144). Концентрација IL-17 је значајно повишена код пацијената оболелих од алкохолног хепатитиса, а Т лимфоцити који продукују IL-17, као и неутрофили, могу се наћи у инфламацијском инфилтрату јетре (6, 143). У оштећењу јетре, IL-17 се поставља као кључни регулатор оштећења које је изазвано неутрофилима (145). Изражена експресија IL-17 доводи до масивне некрозе хепатоцита, док блокирање IL-17 значајно смањује акутно оштећење хепатоцита (146).

У експерименталном моделу токсичног оштећења јетре, концентрација IL-17 и трансaminaза су повишени, док администрација неутралишућег анти-IL-17 антитела, снижава серумске вредности трансaminaза (147). Код особа оболелих од вирусног хепатитиса В и С, израженији је Th17 имунски одговор и удружен је са повишеном концентрацијом серумских трансaminaза и појачаном активацијом моноцита (148, 149). У HBV инфекцији је показано да Th17 лимфоцити индукују активацију макрофага (преко CD86, CD83) и стимулишу продукцију про-инфламацијских цитокина (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ , IL-23 и IL-12) који учествују у оштећењу хепатоцита (150-151).

### **1.2.1.5. Дијагноза акутног хепатитиса**

Дијагноза акутног и хроничног оштећења јетре се поставља на основу клиничке слике, повишених вредности трансминаза (AST и ALT), вредности GGT и билирубина у серуму оболелих. Ради потврде дијагнозе акутног хепатитиса, неопходна је додатна дијагностика, у смислу радиолошких метода (ултразвук, компјутеризована томографија, магнетна резонанца), а дефинитивна дијагноза се поставља биопсијом и патохистолошком верификацијом промена на јетри (18, 152).

### **1.2.1.6. Терапија акутног хепатитиса**

Иако је прогноза пацијената са акутним и хроничним оштећењем јетре донекле побољшана интензивном симптоматском терапијом (метаболичка и нутритивна потпора, симптоматском терапијом насталих компликација, применом екстракорпоралних направа (биоартефицијална јетра)) или каузалном терапијом, када је познат узрочник, трансплантација јетре остаје једина куративна опција за ову популацију пацијената (153, 154). Трансплантација има бројна ограничења, у смислу недовољног броја донора јетре, честих хируршких компликација током и након трансплантације, нежељених ефеката примењених имуносупресива (155), због чега је неопходно испитати примену других терапијских опција у циљу лечења и превенције акутног оштећења јетре.

## **1.2.2. ФИБРОЗА ЈЕТРЕ**

### **1.2.2.1. Дефиниција и етиологија**

Фиброза јетре настаје услед динамичких молекуларних, ћелијских и ткивних процеса, и често може да прогредира до хроничне болести јетре или цирозе, односно може довести до развоја портне хипертензије или развоја хепатоцелуларног карцинома (156-158). Интеракција ових процеса одређује да ли ће фиброза јетре бити самоограничавајућа, или неконтролисана (159).

Након акутног оштећења јетре, чак иако је већи део овог органа оштећен, јетра поседује способност самообнављања (160-163). Насупрот томе, прогресивно, хронично

оштећење, услед понављаног оштећења ткива, слаби регенеративне капацитете јетре услед перзистираниог инфламацијског одговора и ексцесивног стварања компоненти екстрацелуларног матрикса, трајно нарушавајући архитектонику и функцију јетре (157). Овај процес настаје као одговор на различита паренхимска оштећења, иницирана инфламацијом (160). Фиброзу јетре може изазвати већи број етиолошких фактора: вирусне инфекције (хепатитис вируси В и С), конзумирање алкохола, метаболички поремећаји, токсини, стеатоза јетре и холестаза (161) (Табела 1).

### 1.2.2.2. Патогенеза фиброзе јетре

Као што је наведено, након акутног оштећења јетре, паренхимске ћелије се могу регенерисати и заменити некротичне или апоптотске ћелије, што је праћено развојем инфламацијског одговора и ограниченим депоновањем екстрацелуларног матрикса, међутим, ако оштећење траје или се понавља, хепатоцити бивају замењени фиброзним ткивом, чија дистрибуција зависи од иницијалне ноксе која је изазвала оштећење. Тако, у хроничним вирусним хепатитисима и поремећајима која укључују холестазу, фиброзно ткиво се најпре формира око портних простора, а код оштећења изазваног конзумирањем алкохола промене су у перицентралним и перисинусоидалним зонама (157, 162).

Фиброзу јетре карактеришу измене у квантитету (и до 6 пута више) и саставу компоненти екстрацелуларног матрикса (колаген тип 1, 3, 4, фибронектин, еластин, протеогликани, ламинин), што настаје као последица повећане синтезе и смањене деградације ових компоненти (163, 164). Баланс између матрикс металопротеиназа (енг. *matrix metalloproteinases*, MMPs) и њихових ткивних инхибитора (енг. *tissue inhibitors of metalloproteinase*, TIMPs) је круцијалан за хомеостазу екстрацелуларног матрикса (165).

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



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

<b>Б: Компаративни патохистолошки систем скорирања фиброзе јетре</b>			
<b>СКОР</b>	<b>IASL (<i>International Association for Study of the Liver</i>)</b>	<b><i>Batts-Ludwig</i></b>	<b><i>Metavir</i></b>
0	Фиброза није присутна	Фиброза није присутна	Фиброза није присутна
1	Блага фиброза	Иницијалне порталне фиброзне промене	Иницијалне перипорталне фиброзне промене
2	Умерена фиброза	Појединачни фиброзни мостови или септе	Перипорталне фиброзне септе (>1)
3	Тешка фиброза	Бројни фиброзни мостови или септе	Порталне/централне фиброзне септе
4	Цироза	Цироза	Цироза

**Табела 2: Компаративни патохистолошки систем скорирања инфламације (А) и фиброзе (Б) јетре.** Кориговано према: *Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C: an update. Hepatology. 2009;49:1335-1374.*

### 1.2.2.3. Клиничка слика фиброзе јетре

Клиничку слику фиброзе јетре одређује природа и тежина иницијалног обољења које је изазвало фиброзу (166). Манифестације обољења имају широк спектар, од стања без симптома и знакова болести до терминалног оштећења јетре. Око 40% пацијената може бити асимптоматско, међутим фиброза јетре може да има и прогресивни ток када се развију асцит, крварења из варикса и енцефалопатија уз високу стопу морталитета (156, 167, 168).

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

Поред наведеног, бројне компликације прате фиброзу јетре, односно хронично оштећење јетре: портна хипертензија, асцит, кардиолошке манифестације, спленомегалија, хеморагијски синдроми, али и учестале инфекције, потхрањеност и хепатична енцефалопатија која може прогредирати до коме. Фиброза јетре, уколико се не третира, може бити узрок хепатоцелуларног карцинома. Такође, може се јавити акутизација симптома, на терену већ развијене фиброзе (енг. *Acute-on-chronic-liver-failure*, ACLF), које се карактерише акутном декомпензацијом постојећег обољења, праћеном отказивањем органа и високом стопом морталитета (166, 169).

### 1.2.2.4. Улога ћелија имунског система у фибрози јетре

Купферове ћелије, макрофаги јетре, имају важну улогу у патогенези фиброзе јетре (170-175). Активирани бактеријским продукцима, Купферове ћелије продукују про-инфламацијске цитокине и профиброгене медијаторе: трансформишући фактор раста  $\beta 1$  (енг. *transforming growth factor*, TGF- $\beta 1$ ), фактор раста сличан инсулину (енг. *insulin-like growth factor*, IGF) или фактор раста тромбоцита (енг. *platelet-derived growth factor*, PDGF) који промовишу експресију гена у фибробластима за иницијацију ремоделовања екстрацелуларног матрикса (170-172). Показано је да деплеција Купферових ћелија смањује хистолошке карактеристике фиброзе у експерименталном моделу фиброзе јетре индуковане применом  $CCl_4$  (173).

NK ћелије, продукцијом IFN- $\gamma$ , инхибирају фиброзу јетре (175, 176). Деpleција NK ћелија подстиче прогресију фиброзе јетре (176, 177). NKT ћелије, продукцијом цитокина, стимулишу развој фиброзе јетре (170). У експерименталном моделу фиброзе јетре, индукованом CCl<sub>4</sub>, показано је да деpleција NKT ћелија има протективну улогу (179).

Интрахепатични, регулаторни Т лимфоцити се налазе у блиском контакту са дендритским ћелијама и ефекторским Т лимфоцитима, вршећи њихову супресију на местима развоја хроничног оштећења јетре (180). Интрахепатични *Treg* се налазе у микросредини сиромашној кисеоником а богатој микроорганизмима, продукцијом метаболита, инфламацијских цитокина и хормона, што има значајну улогу у диференцијацији и функцији овог субсета Т лимфоцита (181). Такође, јетра је богата липосолубилним витаминима. Метаболит витамина А, АТРА (енг. *All-Trans retinoic acid*) се налази у изобиљу у стелатим ћелијама јетре и игра централну улогу у одржавању и функцији имуносупресивног фенотипа ових ћелија (182). Ретиноична киселина директно стимулише конверзију наивних Т лимфоцита у FoxP3<sup>+</sup> *Treg* фенотип, посредством TGF- $\beta$  (183, 184) или продукцијом IL-10 (185).

Насупрот *Treg*, активирани Th17 лимфоцити продукују IL-17A, IL-17F, IL-21 и IL-22 и TNF- $\alpha$ , промовишући инфламацију јетре чиме доприносе настајању хроничне инфламације и фиброзе. За диференцијацију наивних CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита у ефекторске Th17 ћелије, неопходан је комбиновани ефекат TGF- $\beta$ , IL-6 и IL-21 код мишева, односно IL-23 или IL-1 $\beta$  код људи. (186, 187). Наведени цитокини индукују експресију ROR $\gamma$ t код мишева, односно ROR $\alpha$  у хуманој популацији. (188, 189). Баланс између *Treg* и Th17 ћелија може бити веома значајан за хомеостазу јетре, тј. поремећај њиховог односа може утицати на развој хроничне инфламације и фиброзе у јетри (185).

Стелатне ћелије јетре (енг. *hepatic stellate cells*, HSCs) се још називају и Ито ћелије или перисинусоидалне ћелије а налазе се у *Disse*-овим просторима у нормалној јетри и главна улога им је депоновање ретиноида (170). Услед хроничног оштећења, HSCs се активирају и диферентују у ћелије миофибробластног облика које се акумулирају на месту оштећења и промовишу акумулацију екстрацелуларног матрикса доприносећи развоју фиброзе (190-192). Након вишеструких оштећења или пролонгираног излагања цитокинима, као што су PDGF, TGF- $\beta$ , IL-1, TNF- $\alpha$ , HSCs се активирају, што представља критичан корак у иницијацији и прогресији фиброзе јетре (170, 192, 193). Док су у стању

мировања, HSCs експримирају маркере карактеристичне за адипоците (PPAR $\gamma$ , SREBP-1c, и лептин), а активирани HSCs експримирају следеће маркере: глаткомишићни  $\alpha$  актин (енг.  *$\alpha$  smooth muscle actin*,  $\alpha$ -SMA), *c-myb*, и MEF-2 (енг. *myocyte enhancer factor-2*) (157). У развоју фиброзе, интеракција између стелатних ћелија и осталих ћелија имунског одговора игра значајну улогу (157). Инфламацијске ћелије стимулишу активирани HSCs да синтетишу колаген, а активирани HSCs секретују цитокине, експримирају адхезионе молекуле и утичу на активацију лимфоцита, стварајући зачаран круг (194-196). Активација HSCs се карактерише синтезом и депоновањем колагена, секрецијом хемотактичних и вазоактивних фактора и продукцијом MMP што доприноси развоју и прогресији фиброзе (197).

#### **1.2.2.5. Цитокини који су важни у имунорегулацији фиброзе јетре**

IL-13 је удружен са прогресијом фиброзе јетре и индукује активацију гена за колаген и TGF- $\beta$  у HSCs (198, 199), док блокада IL-13 у већ развијеној фибрози јетре значајно редукује фиброзу, указујући на терапијски потенцијал IL-13 у овој болести.

IL-10 је један од најзначајнијих анти-инфламацијских цитокина у јетри, који има хепатопротективну улогу (200). IL-10 директно смањује продукцију колагена и секрецију TGF- $\beta$  (201, 202). Мишеви дефицијентни за IL-10, у експерименталном моделу фиброзе јетре изазваној CCl<sub>4</sub>, имају израженију фиброзу јетре, са већим формирањем инфламацијских инфилтрата (203).

TGF- $\beta$  представља кључни медијатор у развоју фиброзе (202). Стимулише активацију стелатних ћелија, синтезу протеина екстрацелуларног матрикса и инхибира њихову деградацију. Блокирање синтезе TGF- $\beta$  или блокирање сигналног пута TGF- $\beta$  значајно редукује фиброзу јетре у експерименталним моделима (204).

Током хроничне инфламације јетре, IL-17 продукују Th17 лимфоцити у јетри, који су у повећаном броју присутни у јетрама пацијената оболелих од фиброзе јетре (6). Th17 лимфоцити, активацијом STAT-3 молекула у стелатним ћелијама, подстичу продукцију *Collagen-1*,  $\alpha$ SMA и TGF- $\beta$ 1 и промовишу фиброзу јетре (205-208).

Пораст броја Th17 у јетри и повећана концентрација IL-17 у серуму је уочена и у експерименталном моделу неалкохолне стеатозе јетре, указујући на значај овог цитокина за прогресију хроничне инфламације у јетри. (209).

#### **1.2.2.6. Дијагноза фиброзе јетре**

Рана фиброза јетре је обично асимптоматска (210). Биопсија јетре и патохистолошка анализа су метод избора за постављање дијагнозе (211, 212). Патохистолошка дијагноза може потврдити и стадијум фиброзе јетре (Табела 2, према различитим утврђеним системима скорирања) (213, 214). На основу процента заступљености колагена на патохистолошком исечку (енг. *collagen proportional area* (CPA)), може се квантификовати фиброза (215). Имунохистохемијском методом, може се анализирати експресија: цитокератина-7 (маркер дукталне пролиферације),  $\alpha$ -SMA (глаткомишићног  $\alpha$ -актина (енг.  *$\alpha$ -smooth muscle actin*,  $\alpha$ -SMA) (маркер активације стелатних ћелија), CD34 (маркер ендотелних ћелија и васкуларизације) (216).

Лабораторијским анализама могу се одредити MMP, субтипови колагена, хијалуронска киселина (217, 218). Индиректни показатељи оштећења јетре се односе на број тромбоцита, који рефлектује појаву спленомегалије као последице портне хипертензије, трансаминазе као маркере оштећених хепатоцита, цитокератин-18 као маркер апоптозе хепатоцита и INR (енг. *international normalized ratio*, INR) као индикатор малфункције хепатоцита (219, 220).

Комбинација наведених параметара даје прецизнију дијагнозу хроничног оштећења и фиброзе јетре. Радиолошке визуелизационе технике (ултразвук абдомена, магнетна резонанца, компјутеризована томографија) имају значајно место у дијагнози и праћењу фиброзе јетре (165).

#### **1.2.2.7. Терапија фиброзе јетре**

Не постоји, до сада, стандардизована терапија фиброзе јетре. Углавном се користи симптоматска терапија (примена антиоксиданаса код алкохолног хепатитиса, кортикостероида код аутоимунског и алкохолног хепатитиса). Код пацијената са развијеним компликацијама фиброзе јетре и цирозом, трансплантација и даље остаје

једина терапијска мера која продужава преживљавање и побољшава квалитет живота (166, 155), због чега је неопходно открити нове терапијске приступе у превенцији или лечењу фиброзе јетре.

### 1.3. МЕЗЕНХИМАЛНЕ МАТИЧНЕ ЋЕЛИЈЕ

Мезенхималне матичне ћелије (енг. *Mesenchymal stem cells*, MSCs) су адултне матичне ћелије које се могу наћи у свим постнаталним органима, укључујући и јетру (221).

Карактеришу се брзом пролиферацијом, и мултипотентном диференцијацијом (222). Међународно друштво за ћелијску терапију је дефинисало критеријуме за карактеризацију MSCs: мултипотентност, адхерентност за пластику, експресија маркера: CD105, CD73, CD90 и одсуство хематопоетских маркера: CD45, CD34, CD14, CD31, CD79 $\alpha$  и МНС молекула II класе (223).

MSCs се карактеришу брзом миграцијом у оштећена ткива (224) и способношћу да утичу на имунски одговор, тј да регулишу пролиферацију, активацију и ефекторске функције свих ћелија имунског система, укључујући Т лимфоците, дендритске ћелије, макрофаге, В лимфоците и NK ћелије (225, 226). За миграцију MSCs посебно је значајна интеракција CXCL12 хемокина и CXCR4 рецептора, експримираног на површини MSCs.

#### 1.3.1. Механизми којима MSCs модулирају имунски одговор

Ефекат у модулатији имунског одговора MSCs остварују дирекним контактом, или продукцијом солубилих медијатора (TGF- $\beta$ , HGF, PGE<sub>2</sub>, IDO, азот оксид (NO), IL-10, IL-6, леукемијски фактор инхибиције (енг. *leukemia inhibitory factor*, LIF), хумани леукоцитарни антиген G (енг. *human leukocyte antigen-G*, HLA-G) и хем оксигеназа 1 (енг. *heme oxygenase 1*, HO-1) (225, 226).

У зависности од микросредине у којој се одиграла инфламација, MSCs супримирају или промовишу инфламацију (225). У раним фазама запаљења, у присуству ниских концентрација про-инфламацијских цитокина (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  и IL-1 $\beta$ ) стичу про-инфламацијски фенотип (227), стимулишу пролиферацију и активацију Т лимфоцита, редукују апоптозу неутрофила, промовишу фагоцитозу (228, 229). Током касне фазе имунског одговора (када су присутне високе концентрације TNF- $\alpha$  и IFN- $\gamma$ ), у

макрофагима и моноцитима индукују експресију имуносупресивног IL-10 (230) и продукују имуносупресивне факторе, инхибирајући функцију ефекторске ћелије имунског система (229, 231).

MSCs утичу на функције CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита директним контактом и паракриним механизмима. Директни утицај је последица контакта између инхибиторног PD-1 молекула (енг. *programmed death 1*, PD-1) са његовим лигандима (PD-L1 и PD-L2) на Т лимфоцитима (226), а обзиром да не експримирају ко-стимулаторне молекуле CD80 (B7-1) и CD86 (B7-2), MSCs изазивају анергију Т лимфоцита (224, 230). Поред директног контакта, MSCs могу да супримирају Т лимфоците и паракрино активношћу IDO-а, iNOS-а, HLA-G5, PGE2, TGF- $\beta$ , IL-10 (232-235). Међу њима најзначајнији за супресију активираних Т лимфоцита су IDO и iNOS (236). IDO метаболише триптофан до кинуренина и токсичних метаболита (хинолна киселина и 3-хидрокси антранилина киселина), који супримирају пролиферацију и индукују апоптозу активираних Т лимфоцита. Ензим iNOS из L-аргинина синтетише NO, сигнални молекул, који инхибира фосфорилацију STAT5 сигналног молекула у Т лимфоцитима, заустављајући њихов ћелијски циклус (237-239).

У Th1 и Th2 имунском одговору, мишије MSCs имају значајно нижу активност IDO, те обично за имуномодулацију користе активност iNOS-а. Током Th17 имунског одговора, мишије MSC не продукују iNOS, већ своје имуномодулацијске ефекте остварују посредством других медијатора, као што је IDO (236, 239, 240).

MSCs супримирају пролиферацију и цитотоксички потенцијал NK ћелија и њихову продукцију IFN- $\gamma$  (241, 242). Показано је да MSCs инхибирају и експанзију NKT ћелија, директно и продукцијом солубилних фактора (243), а путем продукције iNOS и IDO смањују њихову хепатотоксичност (244).

### **1.3.2. Улога MSCs у акутном хепатитису и фибрози јетре**

MSCs могу да диферентују у хепатоците (245, 246). Уз то, резултати експерименталних студија показују да трансплантиране MSCs, али и њихови солубилни продукти, који се налазе у кондиционираном медијуму ових ћелија (MSC-CM), смањују апоптозу хепатоцита и подстичу њихову пролиферацију (247, 248) што је указало на терапијски потенцијал MSCs у лечењу акутног и хроничног оштећења јетре.

У Con-A моделу акутног оштећења јетре, примена MSCs смањује серумске вредности трансаминаза и патохистолошке параметре оштећења јетре, концентрацију проинфламацијских цитокина у серуму (218, 249, 250), а значајно повећава концентрацију хепатопротективног IL-10 у јетри и серуму (251). У моделу акутног оштећења јетре изазваном применом CCl<sub>4</sub>, MSC-СМ смањује апоптозу ћелија јетре посредством IL-6 и FGL-1 (енг. *fibroblast like protein-1*) (248).

Показано је да MSCs могу смањити хронично оштећење, односно фиброзу јетре, због могућности диференцијације у хепатоците, имуномодулацијских и антифиброгених карактеристика (252). Продукцијом имуномодулацијских фактора, MSCs стимулишу пролиферацију регулаторних Т лимфоцита, супримирају пролиферацију ефекторских Т лимфоцита инхибирају матурацију дендритских ћелија и смањују цитотоксичност NK ћелија (224, 253-258). Уз то, MSCs секретују факторе раста (HGF (енг. *hepatocyte growth factor*), VEGF (енг. *vascular endothelial growth factor*)), који стимулишу ангиогенезу и регенерацију јетре (259).

MSCs редукују пролиферацију HSCs и синтезу колагена, директним контактом или продукцијом солубилних медијатора (IL-10, HGF, TGF- $\beta$  и TNF- $\alpha$ ), док HGF и неурални фактор раста (енг. *nerve growth factor*-NGF) промовишу апоптозу HSCs (260, 261). MSCs регулишу и експресију MMPs и TIMPs и на тај начин доприносе модулацији фиброзе (262-264). И поред свих сазнања, још увек је непознат утицај MSCs на IL-17 сигнални пут у модулацији акутног хепатитиса и фиброзе јетре.

#### **1.4. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ МОДЕЛИ АКУТНОГ ХЕПАТИТИСА И ФИБРОЗЕ ЈЕТРЕ**

Експериментални модели акутног хепатитиса се могу, у зависности од механизма којим се изазива оштећење јетре, поделити на: хируршке моделе (где се убраја парцијална и тотална хепатектомија, ресекција/лигација, парцијална и тотална деваскуларизација (265-267) и фармаколошке моделе у којима се користе хепатотоксини (d-галактозамин (енг. *d-Galactosamine*), ацетаминофен (енг. *acetaminophen*), тиоацетамид (енг. *thioacetamide*, ТАА), Con A, угљен тетра хлорид (енг. *carbon tetrachloride*, CCl<sub>4</sub>), липополисахарид (енг. *lipopolysaccharide*, LPS),  $\alpha$ -галактоцерамид (енг. *alphagalactoceramide*,  $\alpha$ -GalCer) (268-272). Најчешће коришћени експериментални



моделу акутног хепатитиса су они у којима се инфламација изазива хемијски, јер се болест лако индукује.

#### 1.4.1. Акутни хепатитис индукован CCl<sub>4</sub>

Угљен тетра хлорид (CCl<sub>4</sub>) је испарљиви хлорински растварач са биоцидалним својствима, који је у претходним деценијама коришћен као индустријски одмашћивач, пестицид и као компонента смесе за гашење пожара, међутим, због доказане карциногености и откривеног штетног ефекта на озонски омотач, комерцијална употреба овог растварача је забрањена (до 1996. у развијеним земљама и до 2010. у земљама у развоју) (273). Још 1839. године га је синтетисао *Henri Victor Regnault*, у реакцији хлороформа и хлорина ( $\text{CH}_4 + 4 \text{Cl}_2 \rightarrow \text{CCl}_4 + 4 \text{HCl}$ ).

Хепатотоксични ефекат CCl<sub>4</sub>, односно тетрахлорметана, је дуго познат и често је коришћени као експериментални модел акутног хепатитиса (*Hubner* и сарадници. 1965.), док понављана (хронична) администрација овог токсичног хемијског агенса изазива фиброзу јетре, цирозу и карциногенезу (274).

CCl<sub>4</sub> се метаболише (редуктивном дехалогенацијом) преко P450 цитохрома (CYP2E1 изоформе), стварајући активне метаболите: CCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>2</sub> и CCl<sub>3</sub>-OO (275, 276). CCl<sub>4</sub> оштећује хепатоците ковалентним везивањем прелазних реактивних једињења за ћелијске компоненте или појачаном липидном пероксидацијом, коју изазива везивање ових радикала са кисеоником и разградњом незасићених масних киселина (272). У акутној фази, CCl<sub>4</sub>, путем формирања реактивних облика кисеоника (ROS), у хепатоцитима узрокује дисфункцију митохондрија, измене у бета-оксидацији масних киселина и измене у хомеостази калцијума (274). Продукти метаболизма тетрахлорметана се доминантно везују за триацилглицероле и фосфолипиде, инхибишући продукцију липопротеина, стимулишући тако развој стеатозе, док реакција са кисеоником (односно формирање везе CCl<sub>3</sub>-OO) иницира липидну пероксидацију (272). Ова два процеса су независна и имају исти исход: поремећај хомеостазе калцијума, и на крају апоптозу, односно смрт хепатоцита (272). Поред наведених механизма, CCl<sub>4</sub> стимулише продукцију про-инфламацијских цитокина (TNF- $\alpha$ , NO и IL-6) (277), стимулишући развој инфламације на месту оштећења хепатоцита.

#### 1.4.2. Фиброза јетре изазвана CCl<sub>4</sub>

CCl<sub>4</sub> се, поред индукције акутног оштећења јетре, користи и у експерименталном моделу фиброзе јетре (278). Оштећења хепатоцита настала током првобитне примене CCl<sub>4</sub> подлежу регенерацији у циљу успостављања нормалне архитектоники јетре (279). Међутим, перзистентно, понављано оштећење хепатоцита, изазвано вишеструкима апликацијама CCl<sub>4</sub>, узрокује фиброзу, док пролонгирана експозиција узрокује цирозу или чак хепатоцелуларни карцином (278, 280). Понављана оштећења хепатоцита активирају стелатне ћелије јетре, које учествују у иницијацији и прогресији фиброзе јетре (281).

#### 1.4.3. Акутни хепатитис индукован $\alpha$ -GalCer-ом

У циљу идентификације новог антитуморског агенса, из морског сунђера *Agelas mauritianus* изолован је  $\alpha$ -GalCer, гликолипидни аналог агеласфина (комерцијално KRN7000) (284).  $\alpha$ -GalCer је изграђен од  $\alpha$ -галактозе, фитосфингозина и ацилног ланца.  $\alpha$ -GalCer представља антиген за CD1d-реактивне NKT ћелије миша и човека (282). Применом  $\alpha$ -GalCer може се индуковати активација NKT ћелија, јер га приказује CD1d, и последично акутно оштећење хепатоцита (282, 283).

Једнократна апликација  $\alpha$ -GalCer-а узрокује повећан инфлукс NKT ћелија у јетру, повећањем експресије хемокинског рецептора CXCR6 на NKT ћелијама и његовог лиганда, хемокина CXCL16, на синусоидалним ендотелним ћелијама (284).

DCs преузимају овај молекул из циркулације и презентују га у склопу CD1d молекула NKT ћелијама.  $\alpha$ -GalCer стимулише продукцију IL-12 и експресију CD40 на DCs, односно CD40L на NKT ћелијама (283), што за последицу има активацију NKT ћелија и сазревање DCs (283).

Активиране NKT ћелије синтетишу велики број цитокина: Th1 (IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ ), Th2 (IL-4, IL-5 и IL-13) и Th17 (IL-17) цитокине (285), који даље стимулишу развој урођеног и стеченог имунског одговора и развој оштећења јетре (286).

TNF- $\alpha$  индукује оштећење хепатоцита директним цитотоксичким механизмом као и индукцијом експресије FasL на NKT ћелијама (270). IL-4/STAT6 сигнални пут стимулише експресију мијелопероксидазе и инхибира апоптозу неутрофила у јетри (287).

## 2. ЦИЉ РАДА

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

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

1. Биохемијским тестовима и квантитативном хистологијом утврдити ефекат MSCs на сигнални пут IL-17 у акутном хепатитису и фибрози јетре.
2. Испитати утицај MSCs на фенотип, цитокински профил и функције ћелија имунског система у ткиву јетре у акутном хепатитису и фибрози јетре.
3. Утврдити молекулске механизме којим MSCs утичу на сигнални пут IL-17 у акутном хепатитису и фибрози јетре.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. Ћелијска линија мишијих MSCs

У експериментима је коришћена комерцијална линија мишијих MSCs, које су изоловане из костне срже C57BL/6 мишева (*Gibco/Invitrogen*, кат. број S10502-01). MSCs су култивисане у DMEM медијуму (енг. *Dulbecco's Modified Eagles Medium*) у који је додато: 10% феталног телећег серума (енг. *Fetal Bovine Serum*, FBS), 1 mmol/l пеницилин/стрептомицина, 1 mmol/l неесенцијалних аминокиселина (*Sigma-Aldrich*, Munich, Germany) и 2 mmol/l L-глутаминa. Ћелије су узгајане у асептичним условима на температури од 37°C, у инкубатору и у присуству 5% CO<sub>2</sub>, а у складу са препорукама произвођача (*Gibco/Invitrogen*). У експериментима су коришћене ћелије у шестој пасажи.

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

#### 3.2. Ћелијска линија хуманог карцинома јетре (HepG2)

Комерцијална ћелијска линија хуманог карцинома јетре HepG2 (American Type Culture Collection, Manassas, ATCC VA, USA; HB-8065) је коришћена у тестовима цитотоксичности. Ћелије HepG2 су култивисане у DMEM медијуму који садржи 10% FBS-а и инкубиране у атмосфери 5% CO<sub>2</sub>, засићеној воденом паром на температури 37°C.

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

MSCs су засејане у густини од 10 000 ћелија/cm<sup>2</sup> у посудама за културу ћелија - T<sub>75</sub> фласкови (BD Falcon). У циљу добијања кондиционог медијума мезенхималних матичних ћелија (енг. *MSC-conditioned medium*, MSC-CM), MSCs су првобитно култивисане у комплетном DMEM медијуму који садржи серум, у асептичним условима и инкубиране на 37°C у атмосфери са 5% CO<sub>2</sub>. При конфлуентности од 80%, ћелије су два пута испране PBS-ом (енг. *Phosphate Buffered Saline*, Invitrogen), након чега су култивисане у медијуму без серума. Након 48 сати, узет је медијум, означен као "MCS-кондиционирани медијум" (MCS-CM) и центрифугиран на 13,000g, на температури од 4°C, током 10 минута, а затим овако добијен MCS-CM и залеђен на -80°C до употребе (288).

### 3.4. Фармаколошка инхибиција IDO-а

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

MSCs су култивисане 48 сати у медијуму који садржи 1mM 1-MT (289, 290). Експерименталне животиње које су примиле CCl<sub>4</sub>/corn oil и CCl<sub>4</sub>/corn oil + MSCs су континуирано третиране 1-MT (2mg/mL у води за пиће), у циљу *in vivo* инхибиције активности IDO (290).

### 3.5. Експерименталне животиње

*In vivo* експерименти су спроведени у складу са одредбама Етичког комитета Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу за употребу животиња у експериментима. Коришћени су мишеви чистог соја C57BL/6 (енг. *wild type*, WT), мушког пола, старости од 8 до 10 недеља, водећи рачуна да старост и телесна тежина мишева буде слична између експерименталних група. Мишеви су одгајани у виваријуму Центра за молекуларску медицину и истраживања матичних ћелија, Факултета

медицинских наука у Крагујевцу. Током трајања експеримената, све животиње су имале слободан приступ храни и води.

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

### **3.6. Индукција акутног хепатитиса и апликација MSCs**

Мишевима, који су претходно насумично сврстани у експерименталне групе, акутни хепатитис је изазван једнократном, интраперитонеалном, апликацијом угљен тетра хлорида раствореном у кукурузном уљу ( $CCl_4/corn\ oil$ ) (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*).

$CCl_4$  узрокује акутно оштећење јетре, путем метаболичке активације краткоживећих реактивних метаболита (271), који се ковалентно везују за ћелијске компоненте или појачавају липидну пероксидацију посебно несатурисаних фосфолипида, што оштећује интра- и екстрацелуларне мембране и на тај начин узрокује тешку некрозу хепатоцита (291). Раствор  $CCl_4/corn\ oil$  је апликован у односу 1:1 у дози  $2\mu L/g$  телесне тежине за индукцију акутног оштећења јетре (208).

За разлику од раствора  $CCl_4/corn\ oil$ , који на описан начин узрокује акутни хепатитис, примена  $\alpha$ -галактоцерамида ( $\alpha$ -GalCer) индукује изражену и специфичну активацију NKT ћелија (292).  $\alpha$ -GalCer (кат. број 67576, *Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) је растворен у 0.75% L-хистидину, 0.5% Tween-20 и 5.6% сукрози, до концентрације  $500\mu M$ , угрејан на температури од  $60-80^\circ C$  у трајању од неколико минута. Експерименталне групе мишева су интравенски примили  $\alpha$ -GalCer у дози  $50\mu g/kg$  ТТ, растворен у  $200\mu L$  0.9% NaCl (293).

Непосредно након апликације раствора  $CCl_4/corn\ oil$  односно  $\alpha$ -GalCer-а, експерименталним групама мишева је интравенски апликовано  $500\ 000$  ( $5 \times 10^5$ ) MSCs ресуспендованих у  $200ml$  0.9% NaCl, у једној дози, путем латералне репне вене. Контролна група животиња је примила  $200\mu l$  NaCl-а, након индукције акутног хепатитиса.

### 3.7. Индукција фиброзе јетре и апликација MSCs

Фиброза јетре је изазвана применом интраперитоналног раствора  $\text{CCl}_4/\text{corn oil}$  (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*) у односу 1:3 и дози  $1\mu\text{L/g}$ , телесне тежина, два пута недељно у трајању од месец дана (294). Интравенски, у репну вену, је апликовано  $1 \times 10^6$  MSCs ресуспендованих у  $200\mu\text{L}$  0.9% NaCl, 24 сата након прве примене  $\text{CCl}_4/\text{corn oil}$ , а затим 7., 14., и 21. дана експеримента (263).

Под истим условима, контролним групама мишева је апликовано  $200\mu\text{L}$  0.9% NaCl или  $1 \times 10^6$  мишијих фибробласта (комерцијална линија STO ћелија, American Type Culture Collection, Catalog N<sup>o</sup>. CRL-1503).

### 3.8. Трансплантација MSCs у развијеној фибрози изазваној $\text{CCl}_4$

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

### 3.9. Биохемијска анализа оштећења јетре

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

Након коагулације 30 минута на собној температури, серум је изолован центрифугирањем (3000 rpm, 20 минута) ради одређивања вредности аспартат и аланин трансминазе (енг. *aspartate transaminase*, AST и *alanine transaminase*, ALT). Вредности трансминаза су мерене на Olympus AU 400 (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Germany) апарату, коришћењем Olympus AU reagents китова за мерење AST и ALT (Thermo Infinity AST(GOT) Liquid Stable Reagent & Thermo Infinity ALT(GPT) Liquid Stable Reagent for Olympus AU400/AU600/AU640/AU2700/AU5400 analysers) у складу са препоруком произвођача (295).

### 3.10. Патохистолошка анализа ткива јетре

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

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

#### 3.10.1. Бојење хематоксилином и еозином (H&E)

Добијени парафински исечци су загрејани у термостату на +56°C и након 45 минута депарафинисани у ксилолу. Потом је урађен је процес рехидратације ткива испирањем у опадајућим концентрацијама етил алкохола: 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 70% алкохолу и 5 минута у дестилованој води. Препарати су бојени *Mayer*-овим хематоксилином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*) 10 минута, након чега су испрани дестилованом и текућом водом током 5 минута. Након тога, препарати су 2 минута бојени алкохолним еозином (*Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA*). Затим је ткиво дехидратисано и просветљено у ксилолу. За процес дехидратације употребљене су растуће концентрације алкохола: 5 минута у 70% алкохолу, 5 минута у 90% алкохолу, 5 минута у 96% алкохолу и 2 пута по 5 минута у апсолутном алкохолу. Након бојења и дехидратације, препарати су просветљени потапањем у мешавини ксилола и апсолутног алкохола у односу 1:1 у трајању од 1 минута, а потом 2 пута по 1 минут у ксилолу. Обрађени исечци су прекривени Канада балзамом (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и покровним стаклима. Препарати су сушени 24 часа и након тога анализирани под светлосним микроскопом (*Olympus, Japan*).

H&E бојење је примењено у експерименталним и контролним групама мишева са акутним хепатитисом и са фиброзом јетре.



### 3.10.2. *PicroSirius-Red* бојење

Да би се квантификовао/одредио степен фиброзе јетре између различитих експерименталних група мишева код којих је индукована фиброза јетре, примењено је *PicroSirius-Red* бојење, специфично бојење за компоненте екстрацелуларног матрикса, као што је колаген (296).

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

Добијени препарати су потопљени у *Sirius-Red* раствору (0,1 g, Direct red 80, *Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA, Catalog N° 36-554-8*), у трајању од 60 минута на собној температури (20-22 °C), а потом испрани у дејонизованој води. Препарати су поново испрани, два пута по 5 минута, у ацидификованој води, која садржи 5ml глацијалне сирћетне киселине растворене у 1L дестиловане воде. Вишак раствора је уклоњен механичким покретима. У просецу дехидратације, препарати су потом два пута испрани у 100% алкохолу и три пута у ксилолу. Ткивни исечци су прекривени Канада балзамом (*Canada balsam, Centrohem, Србија*) и покровним стаклима. Након 24-часовног сушења препарати су анализирани под светлосним микроскопом (*Olympus, Japan*).

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

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

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

*Minneapolis, MN, USA; Mouse IL-10 DuoSet ELISA Development kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Mouse IL-17 DuoSet ELISA Development kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Mouse HGF DuoSet ELISA Development kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Mouse TGF- $\beta$  DuoSet ELISA Development kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA; Mouse PGE2 DuoSet ELISA Development kit R&D Systems, Minneapolis, MN, USA и Mouse IDO ELISA kit, NeoBioLab.*

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

У бунарчиће равног дна, микротитар плоча (једна микротитар плоча поседује 96 бунарчића, SARSTED) сипано је по 100 $\mu$ l радне концентрације везујућег антитела. Плоче су затворене адхезивном фолијом и током ноћи, остављене на собној температури. Након тога, бунарчићи су прво испрани пуфером за испирање. Затим, блокирајући пуфер је додат у све бунарчиће, у финалном волумену од 300 $\mu$ l. Након једног часа, плоче су испране пуфером за испирање. Припремљени стандарди и разблажени узорци су сипани у плоче, покривени адхезивном фолијом. Након двосатне инкубације, на собној температури и испирања бунарчића, додато је 100 $\mu$ l радне концентрације антитела за детекцију. Плоче су поново обложене адхезивном фолијом и остављене два сата на собној температури. Након испирања, у бунарчиће је сипано 100 $\mu$ l радне концентрације *Streptavidin*-HRP (енг. *Streptavidin horseradish peroxidase*). Након 20 минута инкубације на собној температури, на тамном месту, микротитар плоче су испране. У бунарчиће је сипано 100  $\mu$ l раствора супстрата (енг. *Substrate solution: Color reagent A + Color reagent B*, у односу 1:1). Након 20 минута, на собној температури и без извора светлости, у бунарчиће је сипано 50 $\mu$ l раствора за прекидање реакције. Након мешања, измерена је оптичка густина узорака на *MicroplateReader*-у (*Zenyth, Anthos, UK*) на таласној дужини од 450nm.

Добијене вредности су умањене за вредности апсорбанце слепе пробе (дејонизована вода). На основу измерених вредности стандарда, начињена је стандардна крива, а

помоћу ње су израчунате вредности за узорке појединачно. Сви узорци су мерени у дуплику.

### **3.12. Одређивање кинуренина у серуму**

Обзиром да IDO учествује у метаболизму триптофана, чији је крајњи продукт кинуренин, активност IDO је индиректно одређена спектрофотометријским мерењем концентрације кинуренина у серуму контролне групе мишева, мишева код којих је фиброза изазвана CCl<sub>4</sub> и мишева који су поред CCl<sub>4</sub> примили и MSCs (240). Прво је 200μl серума помешано са 100μl 30% трихлорацетатне киселине и инкубирано на температури од 50° C, 30 минута. Након центрифугирања (15400 g, 1 минут), 125μl добијеног супернатанта је помешано са истом запремином Ерлиховог реагенса (100mg *p*-диметилбензалдехида раствореног у 5ml глацијалне киселине). Узорци су, потом, очитани у односу на слепу пробу (дејонизована вода) на таласној дужини од 490 nm на спектрофотометру (*Specord S-600 Analytik Jena*) (240).

### **3.13. Одређивање профиброгених протеина полимеризованом ланчаном реакцијом**

*Real-time* RT-PCR техником је испитано да ли примена MSCs утиче на експресију профиброгених фактора колагена тип I, α-SMA и TGF-β1, у фибрози јетре изазиваном CCl<sub>4</sub>/*corn oil*, у јетри мишева и у претходно изолованим HSCs.

#### **3.13.1. Изолација РНК**

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

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

### 3.13.2. Реверзна транскрипција

Концентрација је измерена на *Gene Quant* колориметру, а волумену у ком се налази 1µg РНК додато је 0,2 µg насумичних прајмера (*Fermentas, Vilnius*, Литванија) и 15µl воде а потом и dNTP (3'-деокси нуклеотид трифосфат) (*Fermentas, Vilnius*, Литванија). Финална концентрација раствора је била 1mM. Као контролни узорак, узета је вода, због могуће контаминације. Након инкубације (10 минута на 70°C), у току које су се прајмери (хексамери) насумично везивали за РНК, раствори су стављени на суви лед, а након 5 минута је у њих додато 4µl пуфера за реверзну транскрипцију (5 x *First Strand Buffer*, *Fermentas, Vilnius*, Литванија) и 1µl М-MuLV реверзне транскриптазе (200U/µl, *Fermentas, Vilnius*, Литванија). Поновљена је инкубација и то 10 минута на 25°C и потом 60 минута на 42°C, када се одиграла реакција реверзне транскрипције. Инкубацијом узорака на 70°C (10 минута), реакција је преинута а добијена комплементарна ДНК (сDNA) је чувана на +4°C до употребе.

### 3.13.3. Реакција ланчаног умножавања у реалном времену

На апарату *ABI Prism 7500Thermocycler* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) је спроведена реакција ланчаног умножавања. Реакције су припремљене према протоколу за *QuantiTectSYBR Green RT-PCR* у једном кораку (*Applied Biosystems, Cheshire*, Велика Британија), уз употребу комерцијалних прајмера за TGF-β, *Collagen-1* и α-SMA (*Life Technologies, Carlsbad, CA*). Прајмери за β-актин (*sens* 5'-ТССТТСТТGGGTATGG-3' и *antisens* 5'-ACGCAGCTCAGТААCAG-3') су дизајнирани користећи *Primer Express® software v2.0* (*Applied Biosystems, Cheshire*, Велика Британија). Први корак RT-PCR је трајао 2 минута на 50°C, са задржавањем трајања 10 минута на 95°C. Реакцију је чинило 40 циклуса, који су подразумевали 15 подциклуса топлјења (95°C), и након тога везивање

прајмера за ДНК и синтезе ДНК ланца на 60°C у трајању од 1 минута. Реакције су учињене у трипликату.

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

### 3.14. Изолација моноклеарних ћелија из јетре

За изолацију моноклеарних ћелија из јетре, коришћен је метод механичке разградње јетре (297). Након издвајања јетре, уклоњена је жучна кеса и урађена перфузија јетре употребом 7mL PBS-а кроз *v. porta-e*. Јетра је уситњена маказицама на делове и потом нежно здробљена кроз 200 $\mu$ m челичну мрежу, коришћењем „клипа” шприца, а потом и кроз ћелијско сито. Добијени садржај је ресуспендован у 50mL RPMI-1640 медијума, који садржи *GlutaMax* 1,25 mM, HEPES и 10% FBS, и центрифугиран на 507 rpm (60 g) у трајању од 1 минут на собној температури, без наглог заустављања центрифуге (енг. *off break setting*). У следећем кораку, добијени супернатант (45ml), у коме се налазе интрахепатичне ћелије је пребачену нове епрувете и центрифугиран (1433 rpm), на собној температури, 8 минута, са активираним опцијом наглог кочења (енг. *high break setting*).

Тако добијени талог је ресуспендован у 10ml 37.5% *Percoll*-а у HBSS медијуму (енг. *Hank's balanced salt solution*, HBSS) који садржи 100 U/ml хепарина и центрифугиран на 1907 rpm током 30 минута на собној температури, без наглог заустављања центрифуге.

Добијени талог је потом ресуспендован у 5ml пуфера за лизирање еритроцита (енг. *Er Lysing buffer*) и инкубиран 5 минута, на леду (+4°C). Након тога, додато је 5ml RPMI-1640 са 10% FBS-ом, прекидајући даље лизирање. Затим су ћелије центрифугиране на 1433 rpm 8 минута на 8°C, са активираним опцијом наглог кочења. Добијени талог је ресуспендован или у 1ml PBS који садржи 1% FBS односно 0,1% NaN<sub>3</sub> (тзв. пуфер за анализу проточном цитометријом, енг. *FACS buffer*) или у 1ml комплетног RPMI-1640 медијума (који садржи 10% FBS, *GlutaMax* 1,25 mM и HEPES).

### 3.15. Фенотипизација мононуклеарних ћелија јетре проточном цитометријом

Након описаних поступака изолације мононуклеарних ћелија, спроведена је анализа изолованих мононуклеарних ћелија јетре проточном цитометријом, одређиван је релативни и апсолутни број инфламацијских ћелија. Најпре је одређивана је вијабилност ћелија применом *Trypan-blue*-а под светлосним микроскопом. У експериментима је вијабилност ћелија била у опсегу 90-95%.

Специфичност антитела	Обележивач	Клон	Изотип	Произвођач	Каталогски број
<b>CD4</b>	Alexa Fluor® 488	RM4-5	IgG2a, κ	BD Pharmingen	557667
<b>CD4</b>	PerCp	RM4-5	Rat IgG2a, κ	BD Pharmingen	553052
<b>CD25</b>	FITC	7D4	Lewis IgM, κ	BD Pharmingen	553072
<b>IL-4</b>	PE	BVD4-1D11	Rat IgG2b	BD Pharmingen	554389
<b>F4/80</b>	FITC	BM8	Rat IgG2a	Invitrogen	MF48020
<b>CD11b</b>	PerCp	M1/70	Rat IgG2b	Molecular probes	A14787
<b>IL-10</b>	PE	JES5-16E3	Rat IgG2b	BD Pharmingen	554467
<b>IL-10</b>	APC	JES5-16E3	IgG2b	BD Pharmingen	554468
<b>IFN-γ</b>	APC	XMG1.2	IgG2a, κ	eBioscience	17-7311-82
<b>TNF-α</b>	APC	MP6-XT22	IgG1	BD Pharmingen	554420
<b>TGF-β</b>	APC	860206	Rat IgG2A	R&D Systems	FAB8118A
<b>CD11c</b>	PE	N418	Hamster IgG	Molecular probes	MCD11c04
<b>CD8a</b>	APC	53-6.7	Rat (LOU) IgG2a, κ	BD Pharmingen	553035
<b>CD19</b>	PE	1D3	IgG2a, κ	BD Pharmingen	553786
<b>T-bet</b>	PE	4B10	IgG1, κ	eBioscience	12-5825-80
<b>Gata-3</b>	PE	TWAJ	Rat IgG2b, κ	eBioscience	12-9966-41
<b>CD21</b>	PerCp	7G6	Rat IgG2b, κ	BD Pharmingen	562797

Специфичност антитела	Обележивач	Клон	Изотип	Произвођач	Каталожки број
<b>IgM</b>	FITC	II/41	Rat IgG2a, κ	BD Pharmingen	553437
<b>CD5</b>	PE	53-7.3	Rat (LOU) IgG2a, κ	BD Pharmingen	553023
<b>CD1d</b>	FITC	1B1	Lewis IgG2b, κ	BD Pharmingen	561756
<b>CD49b</b>	PerCp	HMα2	Armenian Hamster IgG	Biologend	103519
<b>CD49b</b>	FITC	DX5	Rat IgMκ	MACS Miltenyl Biotec	130-102-801
<b>CXCR5</b>	FITC	L138D7	Rat IgG2a, κ	Biologend	145519
<b>CD3</b>	FITC	500A2	Syrian hamster / IgG	Invitrogen	HM3401
<b>CD45</b>	APC	30-F11	Rat IgG2a, κ	Invitrogen	MCD4505
<b>IL-17</b>	PE	TC11-18H10	Rat IgG1, κ	MACS Miltenyl Biotec	130-102-344
<b>FoxP3</b>	PE	MF23	Rat IgG2b, κ	BD Pharmingen	560408
<b>FoxP3</b>	APC	3G3	Rat IgG1, κ	MACS Miltenyl Biotec	130-093-013
<b>IL-23</b>	PE	320244	Rat IgG2A	R&D Systems	IC18871P
<b>Ly6 G</b>	PE	RB6-8C5	Rat IgG2a, κ	Invitrogen	12-5931-81
<b>Ly-6G</b>	PerCp	RB6-8C5	Rat (LEW) IgG2a, κ	eBioscience	45-5931-80
<b>RORγt</b>	PE	600380	IgG2b	R&D Systems	IC6006P
<b>IL-6</b>	PE	MP5-20F3	Rat IgG1	BD Pharmingen	554401
<b>IL-1β</b>	PE	166931	Rat IgG2b	R&D Systems	IC4013P
<b>CD206</b>	FITC	C068C2	Rat IgG2a, κ	Biologend	141703
<b>CD220</b>	PerCp	B6.220	Rat IgG2b, κ	Biologend	352602
<b>STAT 3</b>	FITC	LUVNKL A	IgG2b	eBioscience	11-9033-42

**Табела 3.** Моноклонска антитела коришћена у проточној цитометрији.

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

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

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



Интрацелуларно бојење цитокина је започето стимулацијом ћелија форбол 12-миристат 13-ацетатом (енг. *Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA; Sigma Aldrich*) и јономицином (енг. *Ionomycin; Sigma Aldrich*), који активирају протеин киназу C (енг. *Protein kinase C, PKC*) и интраћелијско накупљање јона калцијума, што индукује експресију цитокина у активираној ћелији (298) у временском интервалу од 4 до 6 часова. У *in vitro*, ћелијској стимулацији су употребљени BD *GolgyStop*™ (који садржи моненсин) и BD *GolgyPlug*™ (који садржи брефелдин А) инхибитори интрацелуларног транспорта протеина, узрокујући накупљање цитокина у ендоплазматском ретикулуму или Голџи комплексу, што повећава могућност детекције ових ћелија.

Иzolовани моноклеари (број ћелија у милилитру медијума износи 1 милион) ресуспендовани у медијуму (са 10% FBS-ом) уз 50 ng/ml PMA и 500 ng/ml јономицина, су инкубирани на 37°C у присуству 5% CO<sub>2</sub>. Након двочасовне инкубације (на +4°C, у мраку) суспензији је додато 0,7 µl/ml BD *GolgyStop*™, који блокира секрецију и повећава унутарћелијско накупљање цитокина. Након 4 часа инкубације (на +4°C, у мраку), моноклеарне ћелије су испране и ресуспендоване у медијуму а потом су пребачене у одговарајуће епрувете (енг. *Falcon round-bottom test tubes, BD*).

Првобитно је учињено бојење површинских макера, јер фиксација и пермеабиланизација ћелија могу оштетити епитопе мембранских маркера. Након инкубације са антителима за мембранске антигене, ћелије су опране са 2ml пуфера за бојење, након чега су 5 минута центрифугиране на 250 g. Добијени талог је ресуспендован у 250µl *Cytofix/CytoPerm*™ раствора (BD *Pharmingen*), инкубиран на температури +4°C у трајању од 20 минута, након чега су ћелије опране са 1ml *Perm/Wash*™ пуфера (BD *Pharmingen*) и центрифугиране на 250 g, 5 минута. Након одливања супернатанта додата су антитела за интрацелуларно бојење цитокина и инкубирана у трајању од 30 минута, на температури од +4° C. Талог је, потом, ресуспендован у 50µl *Perm/Wash*™ пуфера. Додата су примарно коњугована моноклонска антитела специфична за цитокине наведене у Табели 3. Након инкубације, ћелије су опране коришћењем 2 mL пуфера за бојење и центрифугиране 5 минута на 250 g.

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

### 3.16. Детекција MSCs у јетрама мишева третираних CCl<sub>4</sub>

MSCs су флуоресцентно обележене бојом карбоксифлуоресцин диацетат сукцинил естром, (CFSE; Molecular Probes), према упутствима произвођача (299). MSCs обележене са CFSE, у дози од  $1 \times 10^6$ , су интравенски апликоване мишевима, путем репне вене, 24 часа након прве администрације CCl<sub>4</sub>/corn oil, затим 7., 14. и 21. дана експеримента.

Добијена једноћелијска суспензија из изолованог ткива јетре, 2., 11., 18. и 27. дана експеримента је анализирана на проточној цитометрији. Апсолутан број регистрованих MSCs по органу је израчунат на основу формуле  $n = m_g / m_a \times v_1 / v_2 \times 100\,000 / x$ , где је  $m_g$  укупна маса анализираних органа;  $m_a$  маса анализираних пропорција органа;  $v_1$  укупна запремина суспензије у којој се анализиране ћелије налазе;  $v_2$  запремина анализираних узорка;  $x$  број позитивних догађаја на 100 000 свих догађаја (300).

### 3.17. Изолација NKT ћелија из јетре

Из добијене суспензије моноклеарни ћелија јетре су изоловане NKT ћелије, магнетном сепарацијом, помоћу кита *NK1.1<sup>+</sup> iNKT Cell Isolation Kit, mouse*, према утврђеном протоколу произвођача (*Miltenyi Biotec*).

Најпре су изоловане моноклеарне ћелије јетре, избројане и узето је  $10^7$  ћелија. Ове ћелије су центрифугиране (300 g, 10 минута), а добијени талог је ресуспендован у 80µl пуфера (PBS (без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>) w/0.1% BSA и 2mM EDTA (pH 7.4) и додато је 20µl NK1.1<sup>+</sup> iNKT Cell Biotin-Antibody Cocktail-a, који садржи различита антитела (анти-NKp46, CD115, CD8a, TCRγδ и CD45R антитело) уклањајући дефинисане популације ћелија. Након инкубације на температури од 2-8°C (10 минута), ћелије су опране применом 2ml пуфера. Суспензија ћелија је центрифугирана (10 минута, 300 g) на температури од 2-8°C. Након одливања супернатанта, добијени талог је ресуспендован у 90µl Buffer-a и додато је 10µl Anti-Biotin MicroBeads. Након инкубације у трајању од 15 минута, на температури од 2-8°C, талог је ресуспендован у 2ml пуфера и центрифугиран 10 минута на 300g. Након уклањања комплетног супернатанта, преостали талог је ресуспендован у 500µl пуфера. У магнетно поље MidiMACS сепаратора (*Miltenyi Biotec*) постављена је LD колона, која је претходно испрана са 2ml Buffer-a. Пропуштањем ћелијске суспензије кроз ову колону су сакупљене необележене NK1.1<sup>+</sup> NKT ћелије, које су центрифугиране (10 минута, 300g). Добијени талог је

ресуспендован у 90 $\mu$ l пуфера (PBS (pH=7.2), 2mM EDTA и 0.5% BSA) и потом је додато 10 $\mu$ l Anti-NK1.1-APC. Након инкубације ћелија са антителом, специфичним за NKT ћелије (10 минута, на температури од 2-8°C), ћелије су опране у 2ml Buffer-a и центрифугиране (10 минута, 300g). Пипетом је уклоњен целокупан супернатант, а талог ресуспендован у 80 $\mu$ l пуфера, у који је потом додато 20 $\mu$ L Anti-APC MicroBeads. Талог ћелија којима је додат AntiAPC MicroBeads је инкубиран 15 минута на температури од 2-8°C, након чега су ћелије ресуспендоване у 2ml пуфера и центрифугиране (10 минута, 300g). Добијени талог је ресуспендован у 500 $\mu$ l пуфера.

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

### **3.18. Изолација CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита помоћу магнетне сепарације**

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

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

FBS-ом. Овако добијена суспензија појединачних ћелија слезине је употребљена за даље експерименте, након одређивања броја и вијабилности ћелија.

За издвајање CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита из слезине је употребљен *CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit mouse*, према протоколу произвођача (*Miltenyi Biotec*). Из претходно добијене суспензије је узето 10<sup>7</sup> ћелија, које су центрифугиране (10 минута, 300 g) након чега је одливен супернатант, а талог ресуспендован у 40µl пуфера (PBS (без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>) w/0.1% BSA и 2mM EDTA (pH 7.4)). У ћелијску суспензију је додато 10µl *CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cell Biotin-Antibody Cocktail*-а који садржи различита антитела (анти-CD8a, Ter-119, CD45R, CD11b и CD49b антитело) којима се отклањају дефинисане ћелијске субпопулације. Добро измешан талог ћелија је инкубиран 10 минута на температури од 2-8°C, након чега је додато 30µL пуфера, 20µL *Anti-Biotin MicroBeads* и 10µL CD25-PE антитела. У припремљену LD колону, постављену у магнетно поље MidiMACS сепаратора (*Miltenyi Biotec*) је након инкубације у трајању од 15 минута на температури од 2-8°C, пропуштена ћелијска суспензија и на тај начин су прикупљени необележени CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити. LD магнетна колона са обележеним ћелијама је уклоњена са MACS сепаратора и постављена у епрувету, додато је 1ml пуфера и садржај је потиснут пластичним клипом, уклањајући тако ћелије из колоне. Чистоћа популације је проверена помоћу проточне цитометрије, након чега су CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити употребљени за *in vitro* експерименте.

### **3.19. Мерење цитотоксичности НКТ ћелија употребом xCELLigence система**

За одређивање цитотоксичке активности НКТ ћелија јетре експерименталних животиња употребљена је DP верзија xCELLigence система, која поседује 3 микротитар плоче са по 16 бунарчића (E16) са златним дном. 100µl комплетног медијума је наливено у сваки бунарчић и спроведена је калибрација, постављањем xCELLigence система у инкубатор на 37° у присуству 5% CO<sub>2</sub>. HepG2 ћелије су коришћене као циљне, односно таргет ћелије. Туморске ћелије су, најпре, подигнуте са дна флашка краткотрајном апликацијом раствора 0.25% *Trypsin*-а и 0.02% EDTA раствореног у PBS-у. Ћелијама је додато 6mL DMEM медијума са 10% FBS-ом, због неутрализације *Trypsin*-а. Након центрифугирања (5 минута, 125 g), супернатант је одливен, а талог ресуспендовану комплетном медијуму. Вијабилност туморских ћелија је одређивана применом *Trypan-blue*-а а у експериментима је коришћена ћелијска суспензија која је садржала више од 95%

вијабилних ћелија. Припремљена је суспензија HepG2 ћелија ( $4 \times 10^5$  ћелија/mL комплетног медијума) тако да у свакој комори E16 плоче буде по  $4 \times 10^4$  туморских ћелија у волумену од 100 $\mu$ l. E16 плоче су постављене у xCELLigence систем и инкубација таргет ћелија на температури од 37°C и у присуству 5% CO<sub>2</sub> је трајала 24h.

Изоловане NKT ћелије су кокултивисане са таргет ћелијама у односу 10:1 (301), тако што су ресуспендоване у комплетном медијуму  $4 \times 10^6$  ћелија/mL, а потом су сипане у бунарчиће, у волумену од 100 $\mu$ l, након инкубације таргет ћелија.

E16 плоче су постављене у xCELLigence систем, којим је мерен ћелијски индекс током 6 часова (на температури од 37°C, у присуству 5% CO<sub>2</sub>). Подаци су анализирани применом програма RTCA Software 1.2 (Acea Biosciences).

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

За испитивање паракриног ефекта MSCs на NKT ћелије у акутном хепатитису, NKT ћелије које су изоловане из јетре мишева и култивисане у комплетном медијуму (уз додатак 10% FBS-а, 2mM L-глутамин, 100IU/ml пеницилина G и 100 $\mu$ g/ml стрептомицина), су стимулисане  $\alpha$ -GalCer-ом (100ng/ml) и кокултивисане са MSCs у *transwell* систему са 24 отвора (0,4  $\mu$ m, Corning Incorporated, Life Sciences, France). NKT ћелије ( $1 \times 10^6$ ) су засејане у доњој комори, а MSCs у инсерте *transwell* система, у односу 10:1 (302). Након 48 сати инкубације, ELISA есејом је анализирано присуство цитокина у супернатантима из свих комора, помоћу ELISA китова у складу са препоруком произвођача. NKT ћелије су сакупљене и потом анализирани проточном цитометријом и тестом цитотоксичности.

### **3.21. Испитивање паракриних ефеката MSCs на функцију CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита *in vitro***

За испитивање паракриног ефекта MSCs на CD4<sup>+</sup> Т лимфоците у фибрози јетре, CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити, који су претходно изоловани из слезине мишева, су стимулирани Конканавалином А (енг. *Concanavalin A*) (2.5  $\mu$ g/mL) (303) и IL-2 (енг. *Interleukin-2*, 50 ng/mL) (304) и кокултивисани са MSCs у директном контакту или физички одвојено

помоћу *transwell* система са 24 отвора (0,4  $\mu\text{m}$ , Corning Incorporated, Life Sciences, France).  $\text{CD4}^+$  Т лимфоцити су засејани у доњој комори, а MSCs у инсерте *transwell* система или у директном контакту у односу 10:1 (228). Након инкубације, у трајању од 48 часова, ELISA есејом (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) је одређена концентрација цитокина у супернатантима, према упутству произвођача.

### 3.22. Изолација стелатних ћелија јетре

Након перфузије јетри мишева (6.5 mL/min), путем *Vena portae*, коришћењем перфузионих раствора 1 и 2, јетре су додатно испране са перфузионим раствором 2 уз додатак 0.75 U/mL Колагеназе Р (Roche, Basel, Switzerland). После процеса перфузије јетре су уклоњене и механички уситњене. Тако добијен садржај је пропуштен кроз ћелијско сито (200 $\mu\text{m}$ ). Затим у тако добијену ћелијску суспензију додат је перфузиони раствор 2 уз додатак 0.4 mg/mL Проназе Е, 1.5 U/mL Колагеназе Р и 0.02 mg/mL Dna-зе I (Roche, Basel, Switzerland). Овако добијена суспензија је након ћелијске дигестије у трајању од 20 минута у воденом купатилу, филтрирана кроз 70 $\mu\text{m}$  ћелијско сито (енг. *cell strainer*, BD Pharmingen, USA), испрана помоћу перфузионог раствора 2 и центрифугирана на 600g током 10 минута. Након одливања супернатанта ћелијска суспензија је још двапут центрифугирана на 50 g, 90 секунди. Талог је ресуспендован у 37.5% Percoll-а (Sigma, UK) и центрифугиран 5 минута на 50 g. Пелет је ресуспендован у 10ml DMEM-а и центрифугиран у неколико серија на 50 g током 5 минута. Овај поступак је понављан до тренутка када се више није формирао видљиви пелет. Након тога центрифугирањем на 200 g, 10 минута је добијен пелет који је садржао стелатне ћелије јетре и он је ресуспендован у 10mL DMEM-а и засејан у ћелијски флак, који је потом чуван у асептичним условима у инкубатору на температури од 37°C и присуству 5% CO<sub>2</sub>. Након 20 часова медијум је замењен (305, 306), а након 72 часа, добијене HSCs су потом коришћене за кокултивацију са  $\text{CD4}^+$  Т лимфоцитима.

### 3.23. Кокултивација MSCs, $\text{CD4}^+$ Т лимфоцита и стелатних ћелија

MSCs су узгајане у комплетном медијуму, у већ описаном поступку, у присуству или одсуству инхибитора IDO, 1mM 1-MT, а потом засејане у *transwell* систему са  $\text{CD4}^+$  Т лимфоцитима који су *in vitro* стимулирани (однос 10:1), као што је описано (228). Након

48 часова, CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити су прикупљени и култивисани са HSCs (однос 20:1) (305). *Real-time* PCR (поступком који је претходно описан) мерена експресија колагена тип 1 (енг. *Collagen-1*).

### **3.24. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА**

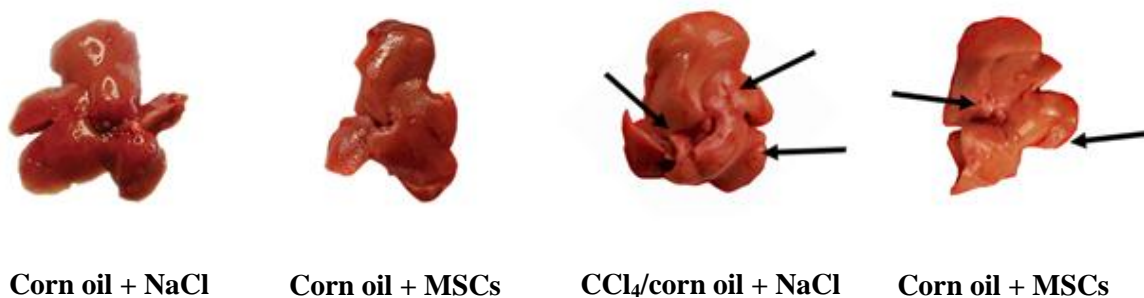
Подаци су анализирани коришћењем статистичког програма SPSS, верзија 20. Нормалност расподеле је одређена тестом *Kolmogorov-Smirnov*. За вредности са нормалном расподелом, коришћен је параметарски *Student's*-ов t тест, а у случају неправилне расподеле употребљен је непараметарски *Mann-Whitney*-ев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

## 4. РЕЗУЛТАТИ

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

#### 4.1.1. Једнократна апликација MSCs значајно редукује акутно оштећење јетре које је изазвано CCl<sub>4</sub>, смањујући инфилтрацију инфламацијских ћелија и концентрацију IL-17 у серуму

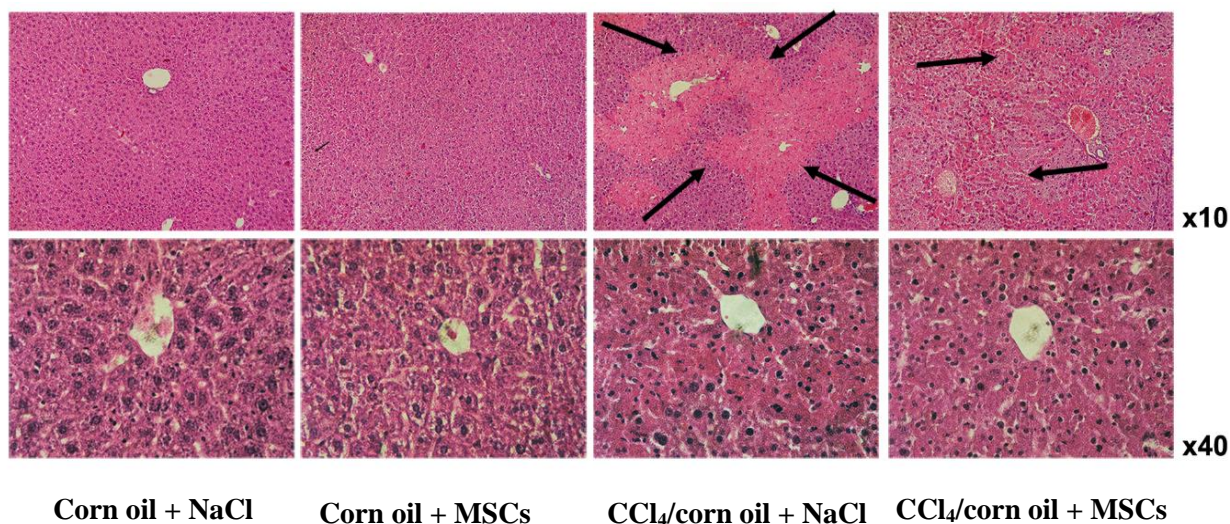
Макроскопски, јетре мишева који су примили само CCl<sub>4</sub> су увећане, са блеђом и неправилнијом структуром (црне стрелице). Ове карактеристике указују на изражено оштећење јетре, за разлику од јетри мишева којима су поред CCl<sub>4</sub> апликоване и MSCs— ове јетре имају глатку, униформисану површину, слично јетрама контролних животиња (Слика 1).



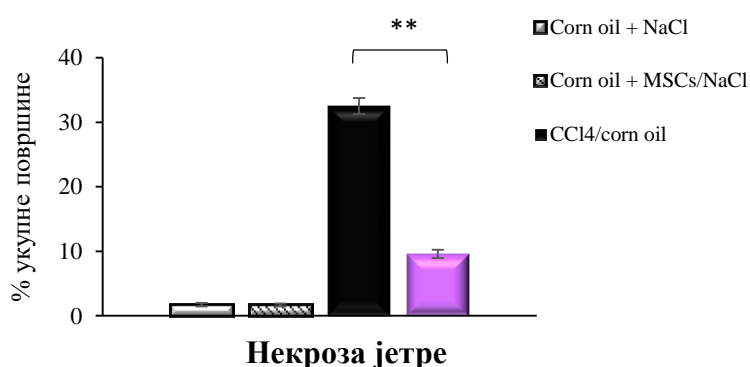
Слика 1: Макроскопски изглед јетри мишева.

Хистолошка анализа потврђује претходно описане разлике. На препаратима јетри (бојених хематоксилин-еозином) мишева који су примили CCl<sub>4</sub> се уочавају екстензивне зоне некрозе са губитком нормалне архитектуре ткива јетре, вакуолизацијом, кариолизом и израженом инфилтрацијом (црне стрелице). Уочава се повећање цитоплазме већине хепатоцита. Насупрот овом налазу, у јетрама мишева који су, поред CCl<sub>4</sub> примили и MSCs, видљиве су солитарне зоне некротичног ткива, показујући тиме да примена MSCs значајно смањује укупну површину некрозе ткива јетре (Слика 2, увећачање x 10, p < 0,01).



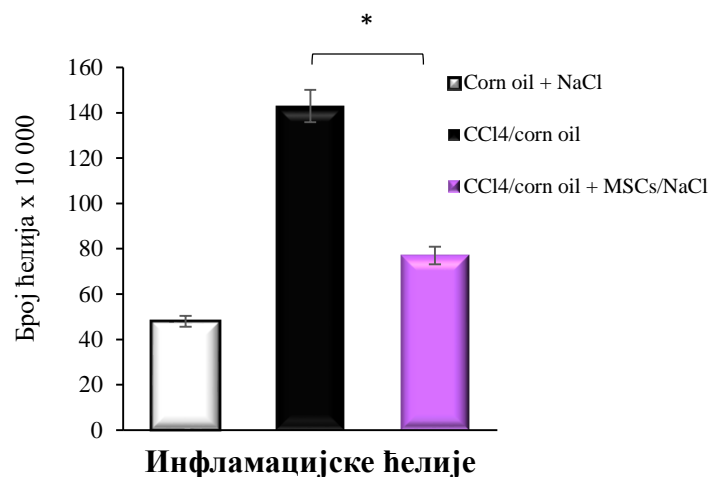


**Слика 2.** Репрезентативни исечци јетре мишева. Стандарно патохистолошко бојење (H&E), увећање x 10; x40.



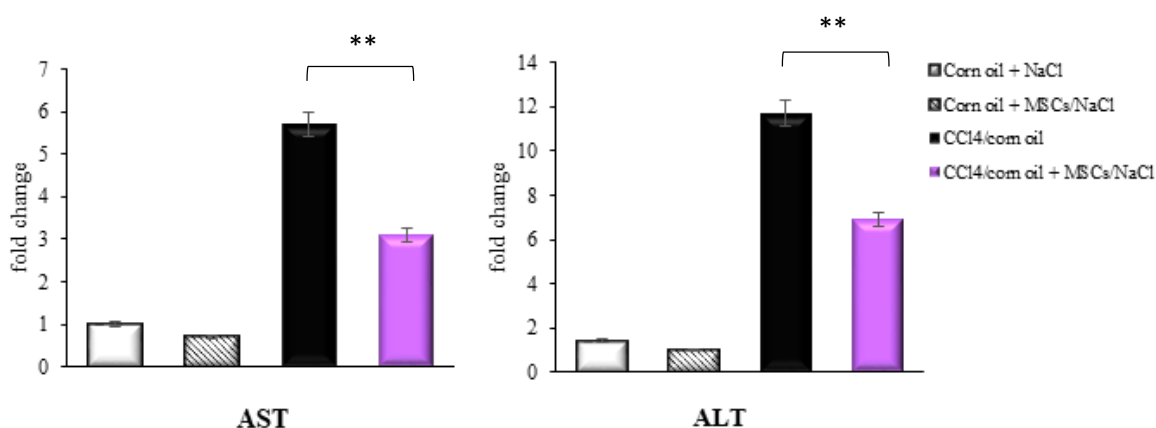
**Графикон 1:** Процент некрозе јетре је статистички значајно нижи код групе мишева која је након CCl<sub>4</sub> примила и MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само CCl<sub>4</sub>. (средња вредност ± SE, \*\*p<0.01).

Оштећење хепатоцита у овом експерименталном моделу прати екстензивна инфилтрација инфламацијским ћелијама, унутар лобулуса јетре и у непосредној близини централних вена и портних простора, показујући да се у приказаном ткиву одиграва инфламација. Приказана инфилтрација је значајно редукована код мишева који су након CCl<sub>4</sub> третирани и са MSCs (Графикон 2, p<0,05).



**Графикон 2: Инфилтрација инфламацијским ћелијама** је статистички значајно нижа код групе мишева која је након CCl<sub>4</sub> примила и MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само CCl<sub>4</sub>. (средња вредност ± SE, \*p<0.05).

Примена MSCs значајно смањује оштећење јетре, што је потврђено вредностима трансминаза (Фигура 1). Серумски ниво AST и ALT је значајно нижи код мишева који су примили CCl<sub>4</sub>+MSCs, у поређењу са мишевима који су третирани са само CCl<sub>4</sub>.

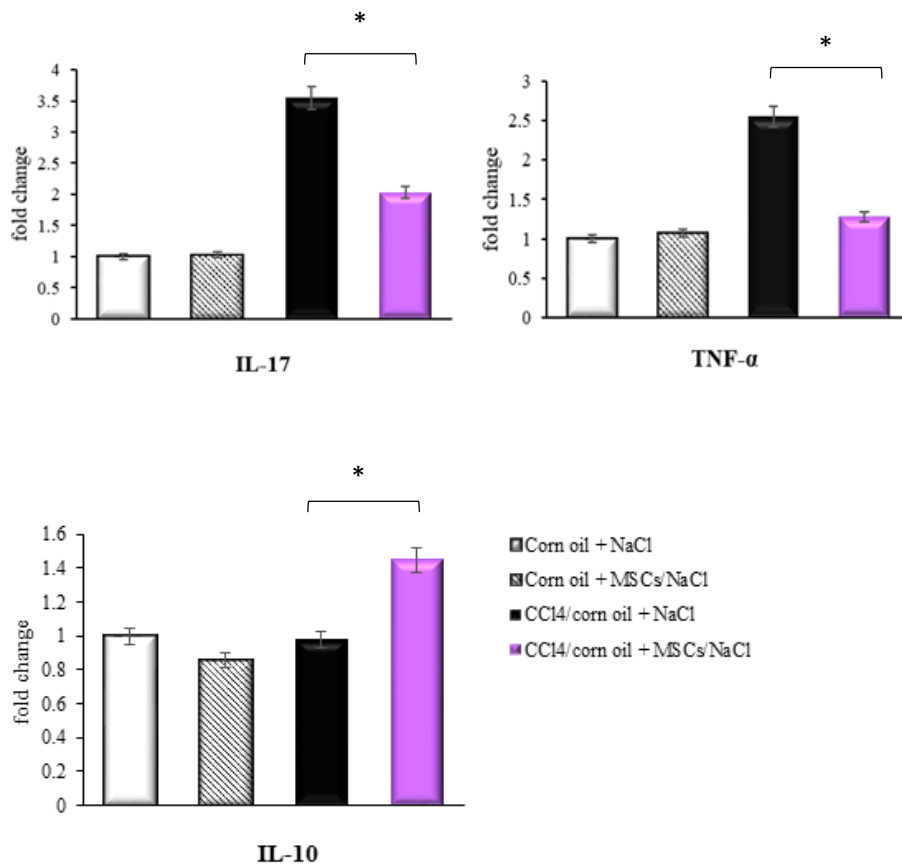


**Фигура 1. Концентрација трансминаза у серуму мишева након примене CCl<sub>4</sub> и MSCs.**

Концентрација трансминаза (AST и ALT) је статистички значајно мања у серуму мишева који су након CCl<sub>4</sub> примили и MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само CCl<sub>4</sub> (средња вредност ± SE, \*\*p<0,01).

Смањено инфламацијско оштећење код мишева који су примили CCl<sub>4</sub>+MSCs прати и смањена продукција IL-17. Серумски ниво IL-17 је значајно нижи, у односу на мишове који су примили само CCl<sub>4</sub> (p<0,05). Поред IL-17, значајно је снижен хепатотоксични

TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) и значајно повишен IL-10 који поседује имunosупресивно и хепатопротективно дејство ( $p < 0,05$ ) у серуму мишева који су примали CCl<sub>4</sub>+MSCs (Фигура 2).



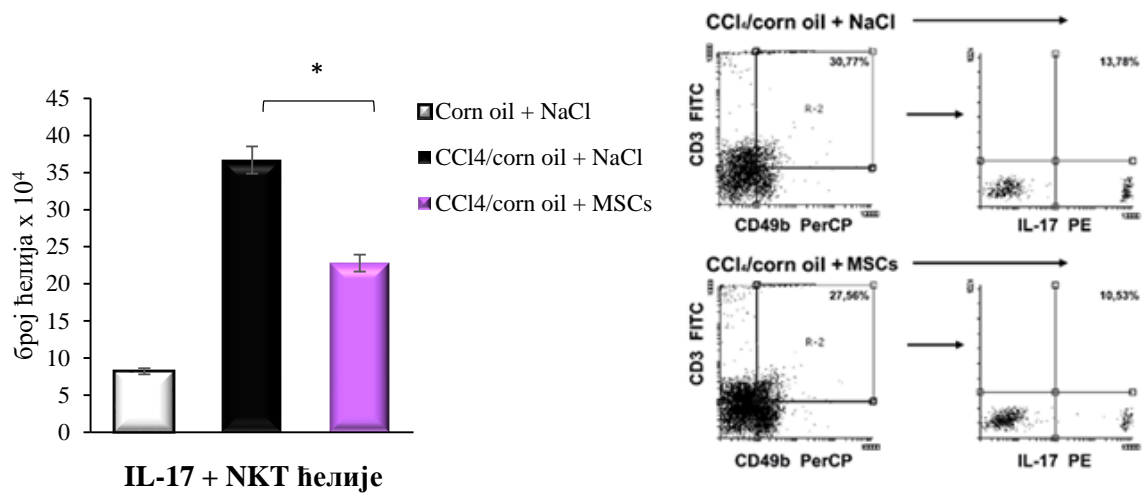
**Фигура 2. Вредности цитокина у серуму.** Вредности IL-17 и TNF- $\alpha$  су значајно ниже, а вредност IL-10 је значајно виша у серуму мишева који су након CCl<sub>4</sub> примили и MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само CCl<sub>4</sub> (средња вредност  $\pm$  SE, \* $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2. Примена MSCs значајно смањује број NKT ћелија које продукују IL-17, али не утиче на број неутрофила, CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита који продукују IL-17 у акутном оштећењу јетре изазваном CCl<sub>4</sub>

Да би се утврдило од које ћелијске популације доминантно зависи инфламација јетре посредством IL-17, односно на коју ћелијску популацију утиче примена MSCs, проточном цитометријом су анализирани леукоцити изоловани из инфилтратата јетре. Итрацелуларно бојење је показало да, у јетрама мишева који су примали CCl<sub>4</sub>, већина

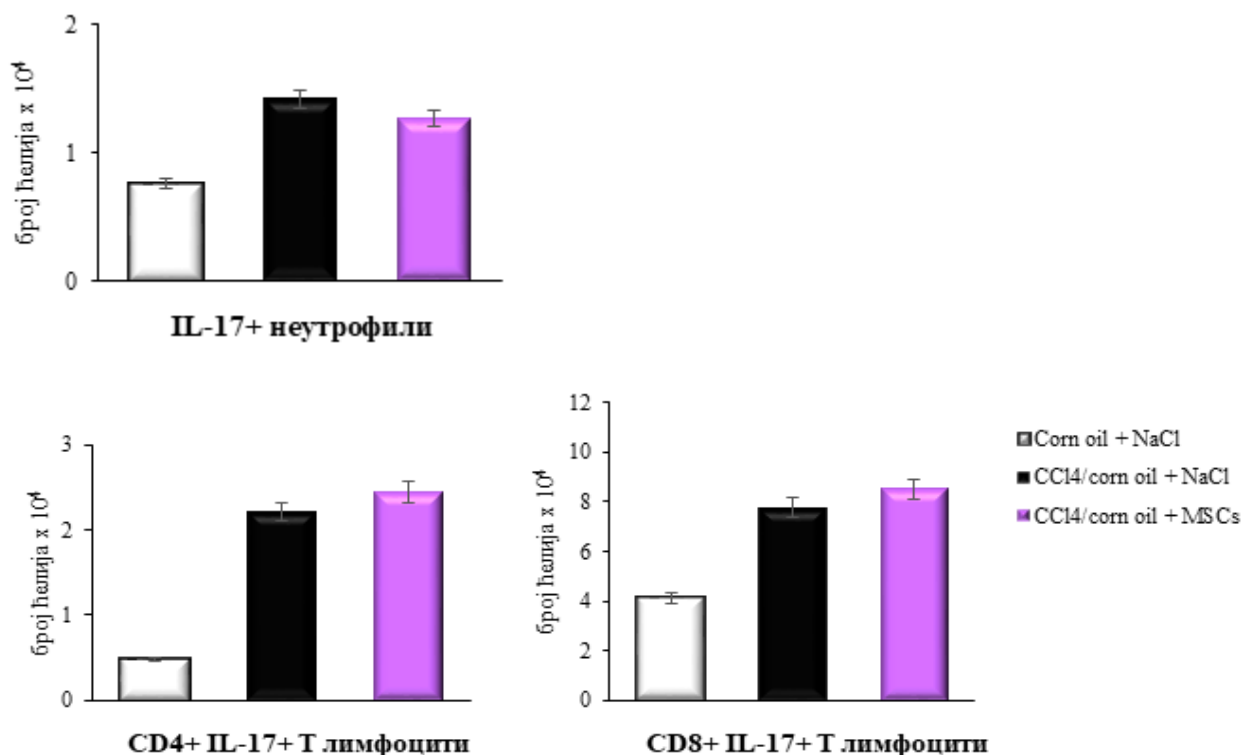
инфламацијских ћелија које продукују IL-17 су NKT ћелије. Сходно томе, редукција оштећења јетре у овом експерименталном моделу болести, је последица смањене продукције IL-17 у NKT ћелијама, под утицајем примењених мезенхималних матичних ћелија.

Постоји значајно мањи број CD3<sup>+</sup> CD49b<sup>+</sup> NKT ћелија које продукују IL-17, код мишева који су поред CCl<sub>4</sub> примили и MSCs, у односу на мишеве који су примили само CCl<sub>4</sub> (p<0,05) (Фигура 3).



**Фигура 3. Примена MSCs повећава број IL-17<sup>+</sup> NKT ћелија у јетри мишева којима је изазван хепатитис. Број IL-17<sup>+</sup> NKT ћелија је значајно виши у јетри мишева који су примили само CCl<sub>4</sub>, у поређењу са мишевима који сунакон CCl<sub>4</sub> примили и MSCs (средња вредност ± SE, \*p<0.05). Приказани су репрезентативни плотови.**

Насупрот томе, није уочена разлика у апсолутном броју CD45<sup>+</sup>Lyb6G<sup>+</sup> неутрофила, као ни CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцитима у јетри који продукују IL-17, између експерименталних група (Фигура 4).



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

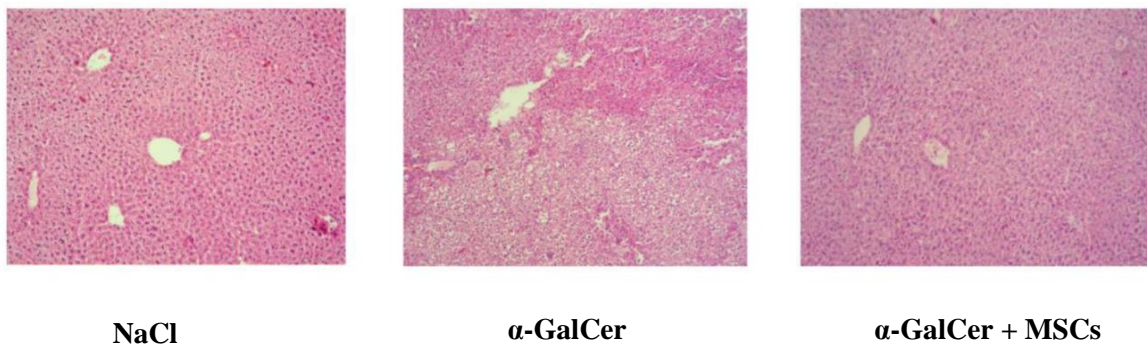
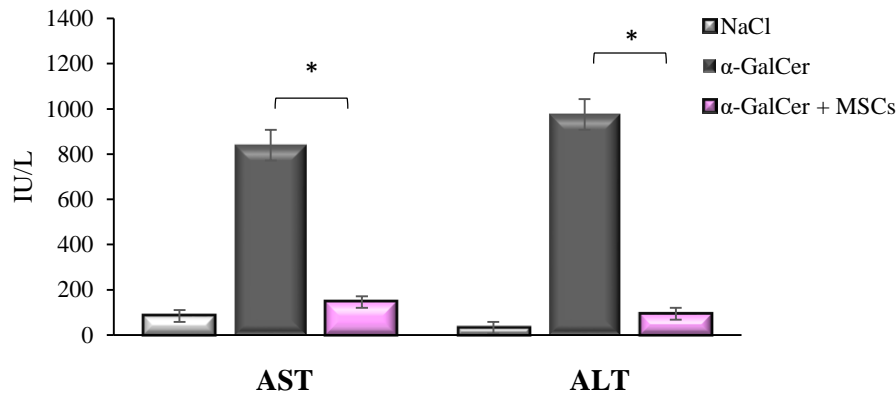
#### 4.1.3. У експерименталном моделу акутног хепатитиса изазваног NKT ћелијама, мезенхималне матичне ћелије смањују укупан број NKT ћелија које продукују IL-17 а повећавају број FoxP3<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> NKT ћелија

У експерименталном моделу акутног хепатитиса, где је акутно настало оштећење јетре изазвано CCl<sub>4</sub>, показано је да примена MSCs значајно смањује акутну инфламацију јетре, тако што смањује број NKT ћелија које продукују IL-17.

Да би смо даље истражили интеракцију MSCs и NKT ћелија у акутном хепатитису, применили смо модел акутног хепатитиса у којем су NKT ћелије главне ефекторске ћелије ( $\alpha$ -GalCer-ом индуковано акутно оштећење јетре).

Показано је да једнократна примена MSCs значајно редукује  $\alpha$ -GalCer-ом изазван хепатитис. Ово је потврђено разликама у мереним трасаминазама јетре, као и хистолошким разликама између експерименталних група. На Фигури 5 је показано да

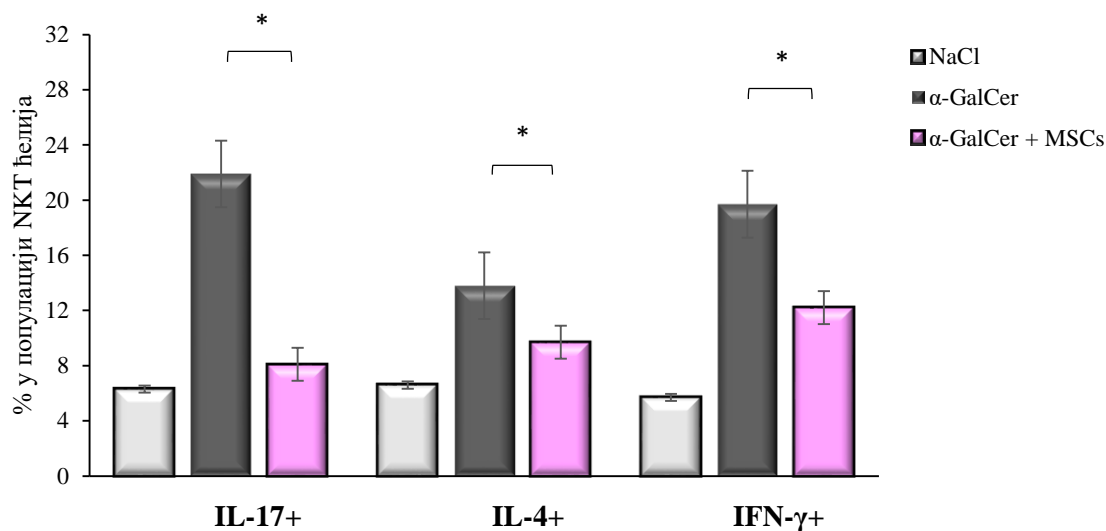
примена MSCs значајно смањује концентрације AST и ALT у серуму мишева који су примили  $\alpha$ -GalCer и значајно смањује некрозу хепатоцита која осликава степен акутог оштећења јетре.



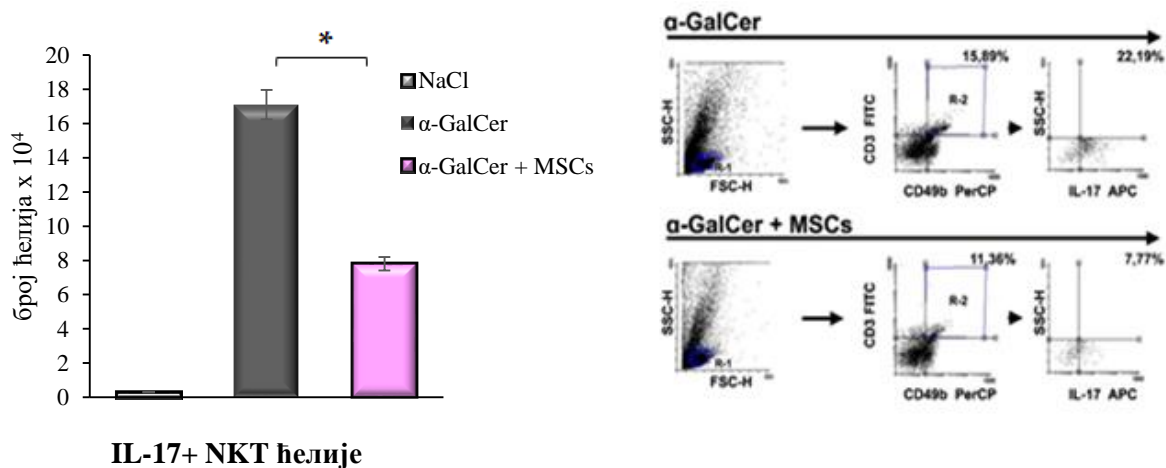
**Фигура 5. Концентрација трансаминаза у серуму мишева након примене  $\alpha$ -GalCer и MSCs. Концентрација трансаминаза (AST и ALT) је статистички значајно мања у серуму мишева који су након  $\alpha$ -GalCer-а примили и MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само  $\alpha$ -GalCer (средња вредност  $\pm$  SE, \* $p < 0,05$ ).**

**Приказани су репрезентативни исечци јетре мишева. Стандарно патохистолошко бојење (H&E), увећање x40.**

Применом проточне цитометрије у овом експерименталном моделу, показано је да MSCs значајно смањују продукцију свих мерених инфламацијских цитокина IL-17, IFN- $\gamma$  и IL-4 у NKT ћелијама јетре (Графикон 3) али и да већина NKT ћелија продукује IL-17 (Фигура 6).

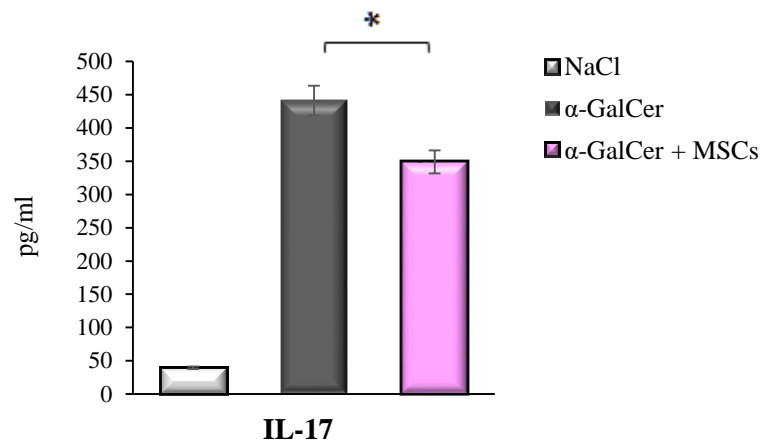


**Графикон 3.** MSCs смањују продукцију инфламацијских цитокина у NKT ћелијама јетре. Процент IL-17<sup>+</sup>, IFN-γ<sup>+</sup> и IL-4<sup>+</sup> NKT ћелија је значајно мањи у јетрама мишева који су након α-GalCer-а примили и MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само α-GalCer (средња вредност ± SE, \*p<0,05).



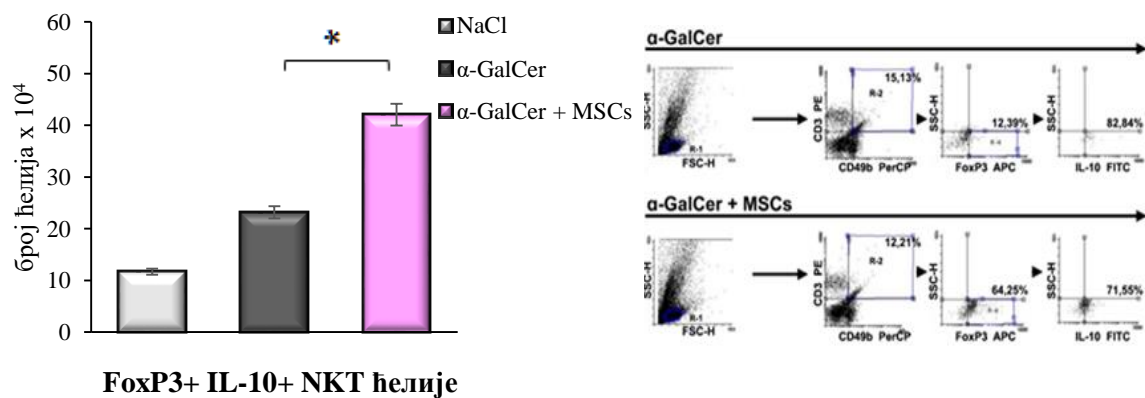
**Фигура 6.** Примена MSCs смањује број IL-17<sup>+</sup> NKT ћелија у јетри мишева којима је изазван хепатитис. Број IL-17<sup>+</sup> NKT ћелија је значајно виши у јетри мишева који су примили само α-GalCer, у поређењу са мишевима који су након α-GalCer примили и MSCs (средња вредност ± SE, \*p<0,05). Приказани су репрезентативни плотови.

Према наведеном, MSCs смањују апсолутни број NKT ћелија које инфилтришу јетру и продукују IL-17 ( $p < 0,05$ ) (Фигура 6) и исто тако смањују концентрацију IL-17 у серуму ( $p < 0,05$ ) (Графикон 4).



**Графикон 4: MSCs смањују концентрацију IL-17 код мишева којима је изазван акутни хепатитис.** Применом стандардног ELISA теста, показано је да је концентрација IL-17 значајно виша у серуму мишева који су примили само  $\alpha$ -GalCer, у поређењу са мишевима који су након  $\alpha$ -GalCer-а примили и MSCs (средња вредност  $\pm$  SE,  $*p < 0,05$ ).

Осим што смањују број NKT ћелија које продукују IL-17, MSCs значајно повећавају број FoxP3<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> NKT ћелија, које имају регулаторну и хепатопротективну улогу (Фигура 7).



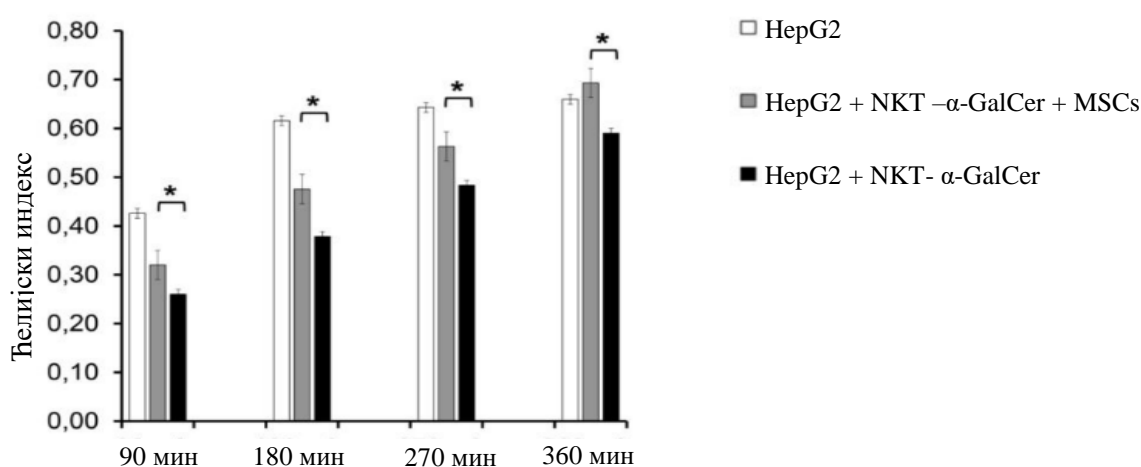
**Фигура 7. MSCs повећавају број FoxP3<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup>NKT ћелија у јетри.** Применом проточне цитометрије, показан је значајно повећан апсолутни број FoxP3<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> NKT ћелија у јетри мишева који су након  $\alpha$ -GalCer-а примили и MSCs, у односу на мишове који су примили само  $\alpha$ -GalCer. (средња вредност  $\pm$  SE,  $*p < 0,05$ ). Приказани су репрезентативни плотови.



#### 4.1.4. MSCs смањују хепатотоксичност NKT ћелија јетре

Да бисмо показали да MSCs супримирају хепатотоксичност NKT ћелија, анализирали смо цитотоксичност NKT ћелија *in vitro*, применом xCELLigence система.

NKT ћелије, изоловане из јетре мишева који су примили  $\alpha$ -GalCer и MSCs су значајно мање цитотоксичне за HepG2 ћелије, него NKT ћелије које су изоловане из јетре мишева који су примили само  $\alpha$ -GalCer, показујући да примена MSCs значајно смањује хепатотоксични потенцијал NKT ћелија јетре (Графикон 5).



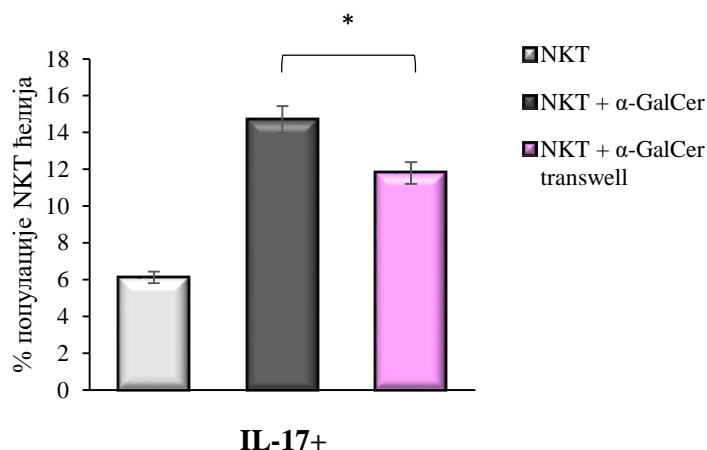
**Графикон 5. Системска апликација MSCs смањује цитотоксичку активност NKT ћелија јетре према HepG2 туморским ћелијама.** Резултати су представљени кроз ћелијски индекс хепатоцита. Хепатотоксичност NKT ћелија изолованих из јетри мишева који су примили  $\alpha$ -GalCer и MSCs је значајно мања у поређењу са хепатотоксичношћу NKT ћелија изолованих из јетри мишева који су примали само  $\alpha$ -GalCer. Приказане вредности су средње вредности  $\pm$  SE; \*  $p < 0,05$ .

#### 4.1.5. MSCs паракриним механизмом смањују продукцију IL-17 у NKT ћелијама

У описаним резултатима је показано да MSCs супримирају продукцију IL-17 у NKT ћелијама. Познато је да MSCs своје ефекте остварују директним контактом или путем својих продуката. Зато је у наредним експериментима испитивано да ли је директан међућелијски контакт неопходан да би MSCs редуковале хепатотоксичност NKT ћелија јетре. Из тог разлога, MSCs и NKT ћелије (претходно активирани  $\alpha$ -GalCer-ом) су

засејане у *transwell* систему, где ове ћелије нису у међусобном контакту, већ су одвојене мембраном која пропушта солубилне молекуле.

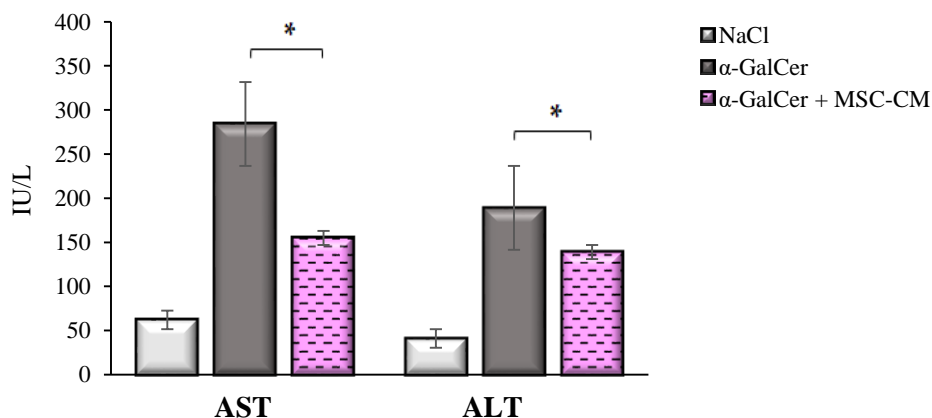
Интрацелуларно бојење је показало да NKT ћелије које су кокултивисане са MSCs, продукују значајно мање IL-17 (Графикон 6), показујући да MSCs својим солубилном молекулима, односно паракрино, смањују ослобађање IL-17 из NKT ћелија.

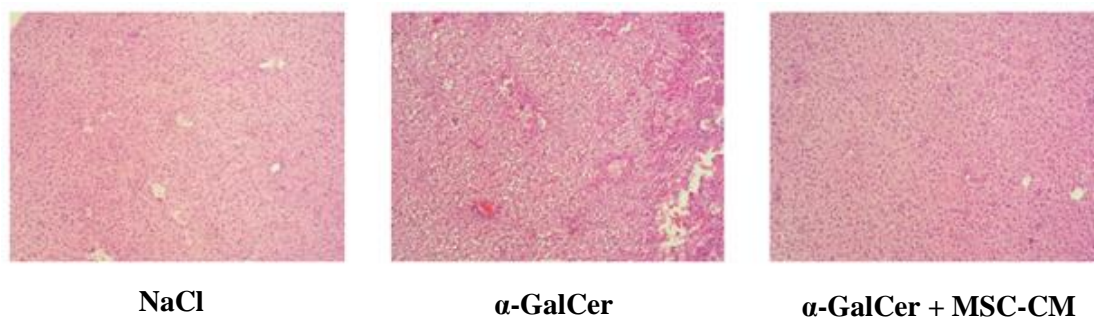


**Графикон 6. MSCs смањују број IL-17+ NKT ћелија продукцијом солубилних молекула.**

Процент NKT ћелија јетре које продукују IL-17 је значајно нижи код NKT ћелија које су кокултивисане са MSCs у *transwell* систему. Приказане вредности су средње вредности +/- SE;

Да би се потврдили резултати добијени *in vitro*, мишеви су интравенски добили MSC-СМ. Интравенска примена MSC-СМ значајно смањује трансаминазе у серуму (AST и ALT) и смањује оштећење, односно некрозу хепатоцита која се уочава хистолошком анализом (Фигура 8).

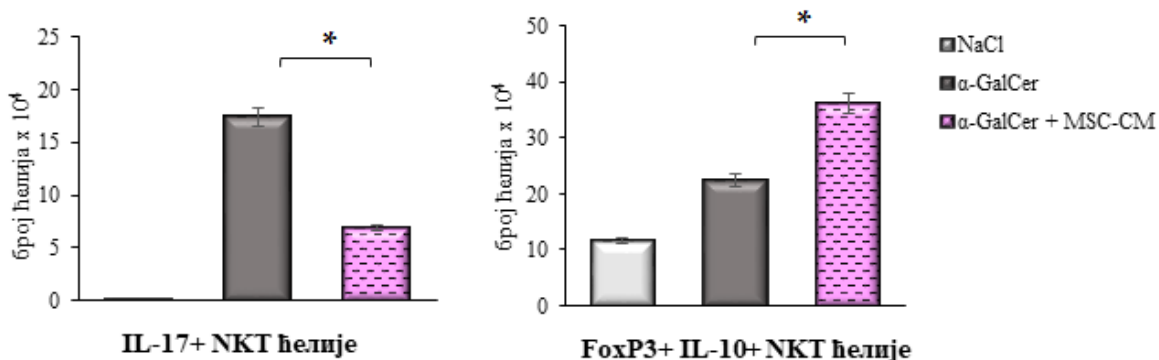




**Фигура 8. Концентрација трансаминаза у серуму мишева након примене  $\alpha$ -GalCer и MSC-CM.** Концентрација AST и ALT у серуму оболелих мишева је била значајно нижа после примене MSC-CM (200 $\mu$ l). Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност  $\pm$  SE (\* $p$ <0,05).

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

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

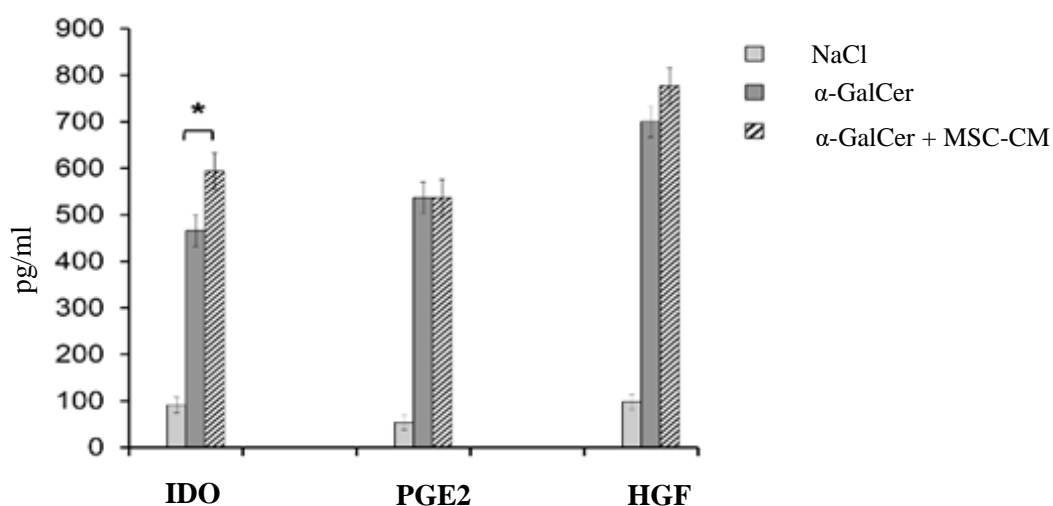


**Фигура 9. Број NKT ћелија у јетри мишева након примене  $\alpha$ -GalCer и MSC-CM.** Број IL-17<sup>+</sup> NKT ћелија је био значајно мањи у оболелих мишева који су примили MSC-CM, док је број FoxP3<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> NKT ћелија био значајно већи у истој експерименталној групи. Измерене вредности из експеримента су приказане као средња вредност  $\pm$  SE (\* $p$ <0,05).

#### 4.1.6. Смањење хепатотоксичности NKT ћелија, посредством MSCs, зависи од IDO

Описано је да су, међу бројним солубилним продуктима које луче MSCs, IDO, PGE2, и HGF најзначајнији медијатори који супримирају продукцију цитокина у ћелијама имунског система.

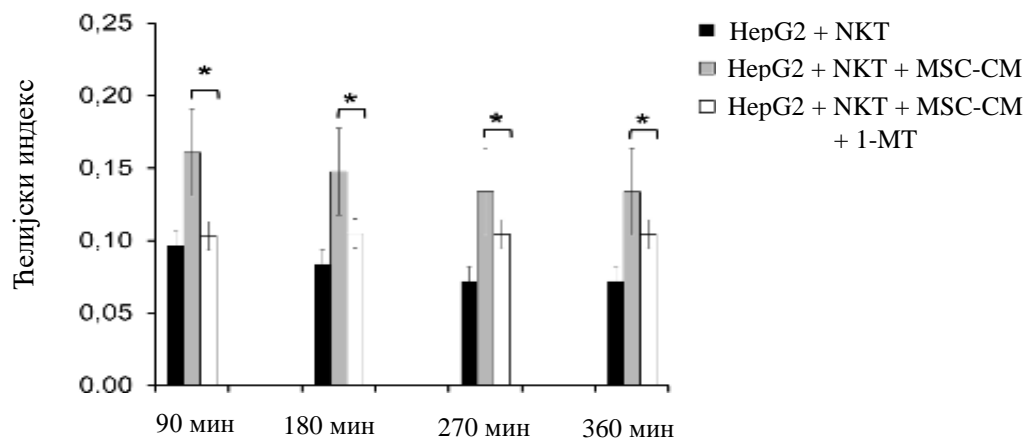
Ниво IDO у серуму је био значајно већи код мишева који су примили MSCs, док није постојала разлика у концентрацијама PGE2 и HGF у серуму, између експерименталних група мишева са акутним хепатитисом, тј оних који су примали MSCs и оних који нису (Графикон 7).



**Графикон 7. MSCs повећава концентрацију солубилних продуката у серуму оболелих мишева.** Концентрација IDO је значајно виша у групи мишева који су примили  $\alpha$ -GalCer и MSCs у односу на серум мишева који су примали само  $\alpha$ -GalCer. Није уочена статистички значајна разлика у концентрацији PGE2 и HGF. Приказане вредности су средње вредности  $\pm$  SE; \*  $p < 0,05$ .

У складу са *in vivo* добијеним резултатима, MSC-CM значајно снижава хепатотоксичност NKT ћелија *in vitro* (Графикон 8), потврђујући да MSCs паракриним путем смањују хепатотоксичност NKT ћелија јетре. Хепатопротективни ефекат MSC-CM се у потпуности укида блокирањем активности IDO. MSC-CM који садржи 1-метил триптофан (1-МТ) који је инхибитор активности IDO, не смањује хепатотоксичност NKT

ћелија јетре, указујући на то да ефекат који мезенхималне матичне ћелије имају на NKT ћелије јетре, зависи од активности ензима IDO-а.



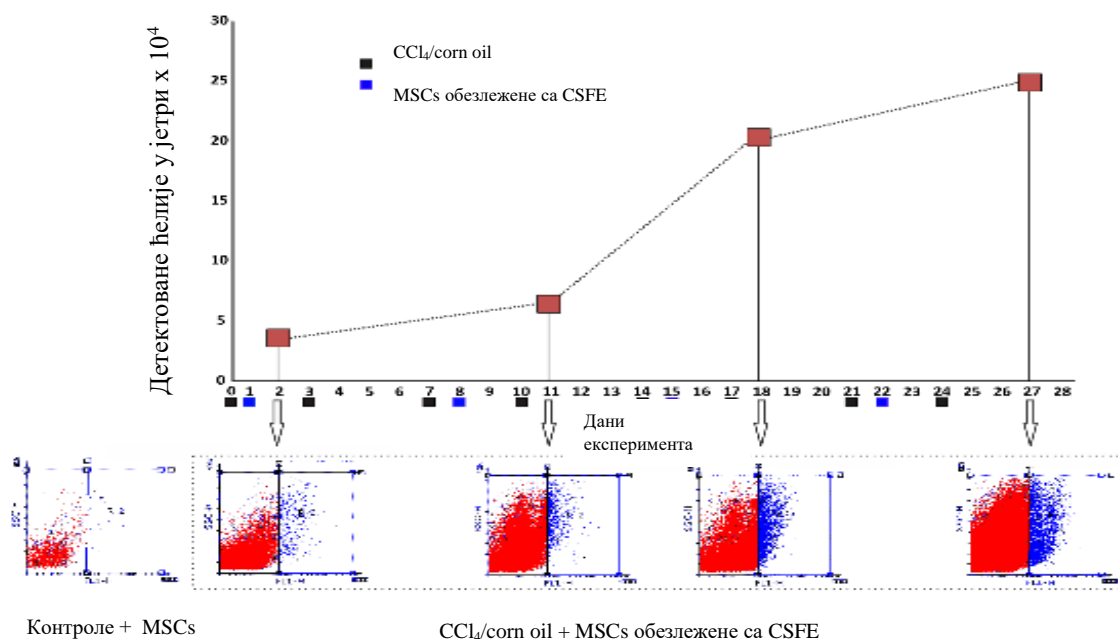
**Графикон 8. Имуносупресивни утицај MSCs на хепатотоксичност NKT ћелија зависи од IDO.** *In vitro* стимулисане NKT ћелије ( $\alpha$ -GalCer; 100 ng/ml) су култивисане у MSC-CM, односно MSC-CM + 1-MT. Присуство 1-MT (1mM) у MSC-CM је прекинуло супресивни ефекат кондиционираног медијума на цитотоксички потенцијал NKT ћелија према HepG2 ћелијама. Приказане вредности су средње вредности  $\pm$  SE; \*  $p < 0,05$ .

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

### 4.2.1. Интравенски апликоване MSCs мигрирају у јетру експерименталних животиња који су примали CCl<sub>4</sub> и смањују фиброзу

MSCs које су апликоване интравенски, мигрирају у јетру. Флуоресцентно обележене MSCs, су изоловане из јетре експерименталних животиња, 2., 11., 18. и 27. дана експеримента. Апсолутан број регистрованих MSCs је израчунат на основу претходно описане формуле ( $n = m_g / m_a \times v_1 / v_2 \times 100\,000 / \underline{x}$ ).

Флуоресцентно обележене MSCs су, прво, детектоване након након 24 часа од интравенске апликације, и њихов апсолутни број (израчунат према формули) је експоненцијално растао након сваке апликације, што је приказано на Фигури 10.



**Фигура 10. Детекција системски апликованих MSCs у јетри мишева којима је фиброза индукована применом CCl<sub>4</sub>. Флуоресцентно (CFSE) обележене MSCs мигрирају у јетру мишева којима је индукована фиброза јетре и њихов број експоненцијално расте током трајања експеримента.**

#### 4.2.2. MSCs значајно редукују фиброзу јетре изазвану CCl<sub>4</sub>

На Слици 3 приказан је макроскопски изглед јетри мишева, контролних и експерименталних група. На јетрама мишева који су примили CCl<sub>4</sub> се уочава већи број регенеративно измењених нодуса који указују на фибротично измењену структуру јетре. За разлику од њих, јетре мишева који су примали и MSCs, показују униформу текстуру, глатке површине, слично јетрама мишева из контролних група, указујући да су макроскопске промене које карактеришу фиброзу јетре значајно смањене код групе мишева који су примали MSCs.

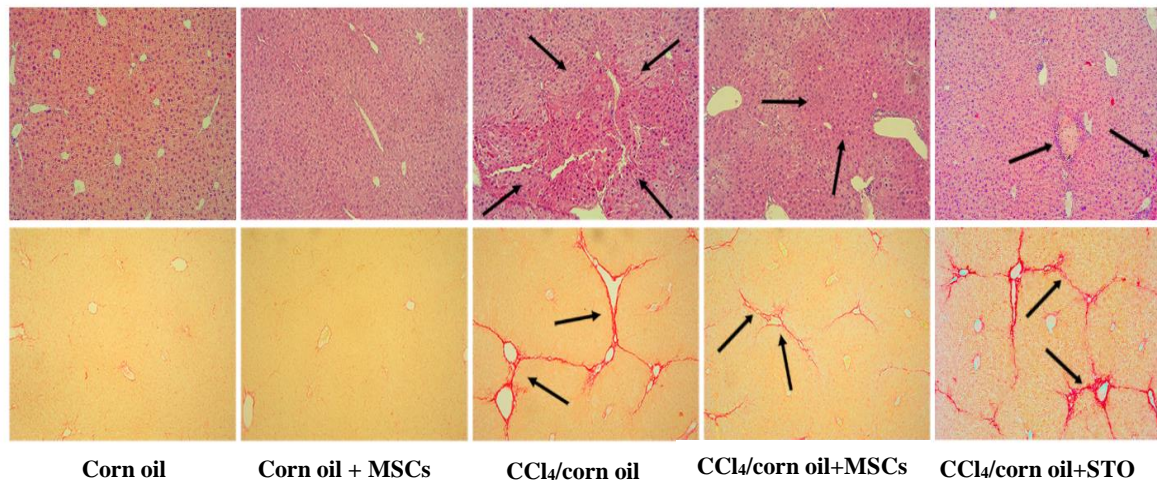


Слика 3: Макроскопски изглед јетри мишева.

Бојење хистолошких исечака хематоксилином и еозином јетри мишева који су примили CCl<sub>4</sub> показује оштећење хепатоцита, централну конгестију у лобусима уз присутну инфилтрацију инфламацијским ћелијама. У централним и интерлобуларним просторима, уочава се некроза појединачних хепатоцита и балон дегенерација ћелија (промене које показују црне стрелице). Описане промене су удружене са фиброзом и инфилтрацијом инфламацијским ћелијама. Карактеристично, физиолошку структуру лобулуса јетре замењују регенеративни чворићи, који су међусобно повезани фиброзним ткивом у виду септи.

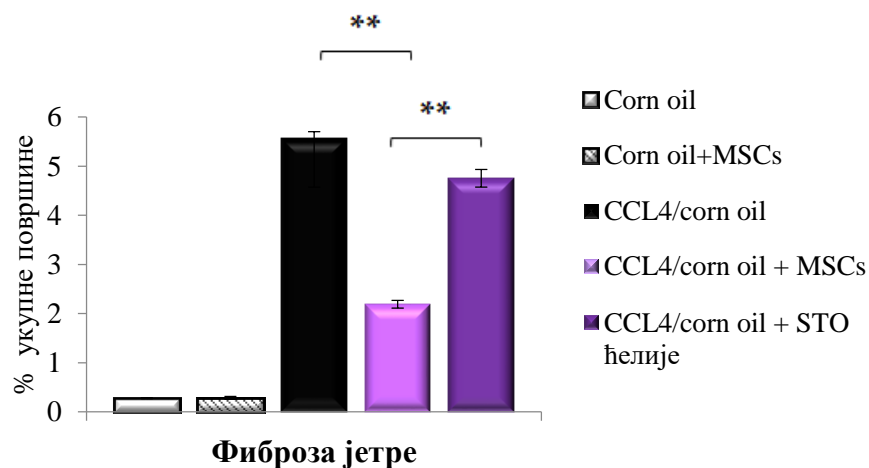
Насупрот променама описаним на хистолошким препаратима јетри мишева који су примили CCl<sub>4</sub>, на хистолошким препаратима јетри мишева који су примали и MSCs уочава се неколико мањих зона некротичног ткива.

Употребом *Sirius red* технике, хистолошки препарати јетри мишева третираних  $\text{CCl}_4$ , показују екстензивно депоновање колагена који доводи до формирања псеудолобулуса (описане промене су показане црним стрелицама) што указује на развој фиброзе јетре.



**Слика 4. Репрезентативни исечци јетре мишева. Стандарно патохистолошко бојење (H&E) и примена *Sirius red* технике, визуелизација депоновања колагена. Увећање  $\times 40$ .**

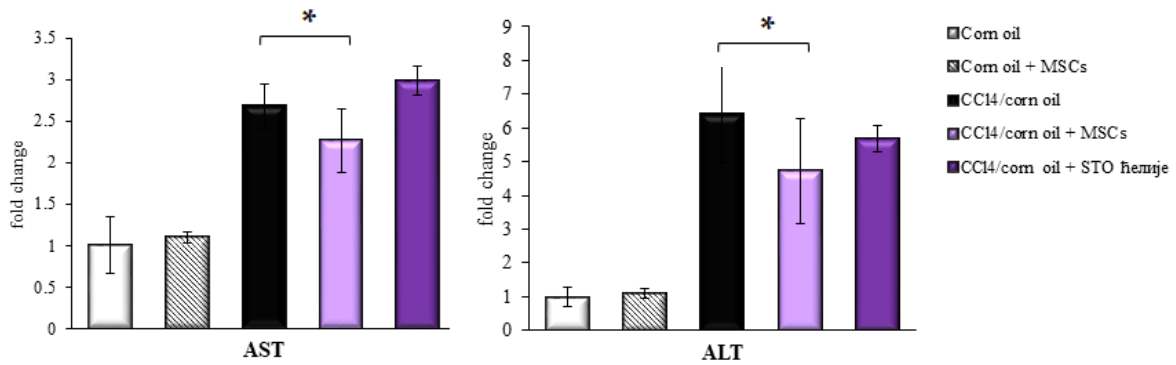
У складу са претходно описаним микроскопским разликама између експерименталних група, израчунат је проценат заступљености фиброзног ткива јетре, који је значајно мањи код мишева који су третирани MSCs ( $p < 0,01$ ) (Графикон 9).



**Графикон 9. MSCs смањују проценат фиброзе јетре. Процент фиброзе јетре је значајно мањи у групи оболелих мишева који су примали MSCs, у односу на групе мишева које су примале само  $\text{CCl}_4$ , односно  $\text{CCl}_4 + \text{STO}$  ћелије. Приказане вредности су средње вредности  $\pm$  SE; \*\*  $p < 0,01$ .**

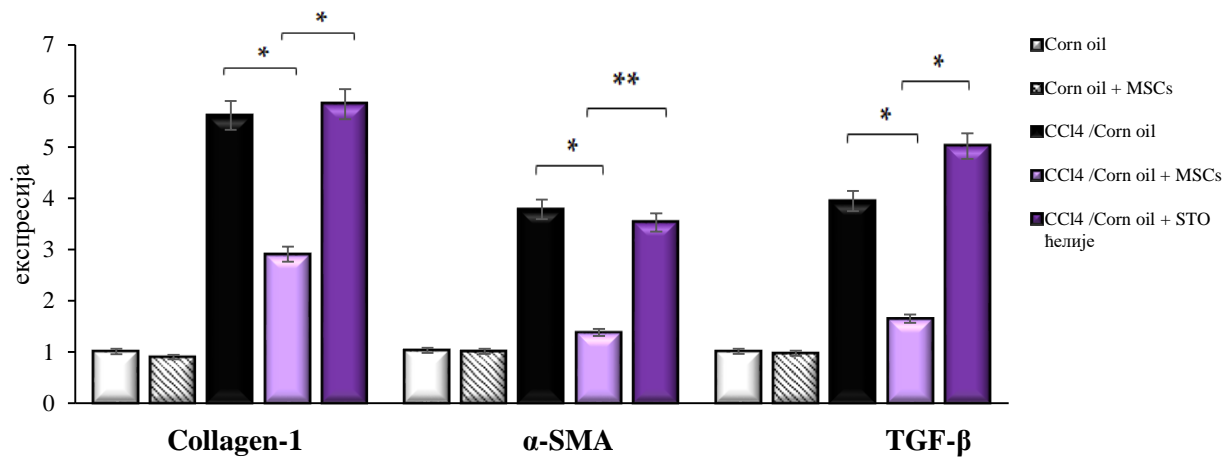


Измерене вредности AST и ALT у серуму су значајно ниже код мишева који су примили MSCs, у односу на мишеве који су третирани само CCl<sub>4</sub> (Фигура 11).



**Фигура 11. Концентрација трансминаза у серуму мишева након примене CCl<sub>4</sub> и MSCs у фибрози јетре.** Концентрација трансминаза (AST и ALT) је статистички значајно мања у серуму мишева који су током примене CCl<sub>4</sub> примали и MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само CCl<sub>4</sub> (средња вредност ± SE, \*p<0,05).

Мерењем експресије гена профиброгених маркера: колагена тип 1, α-SMA и TGF-β који је познат као најзначајнији профибриногени цитокин у развоју фиброзе органа, показано је да су ови маркери значајно снижени у јетри мишева који су третирани MSCs. Ови резултати, добијени квантитативном RT-PCR су у корелацији са претходно описаним макроскопским и микроскопским разликама и разликама у трансминазама у серуму између експерименталних група, што показује да су фиброзне промене јетре, изазване понављаним апликацијама CCl<sub>4</sub>, значајно ублажене применом MSCs (Графикон 10).

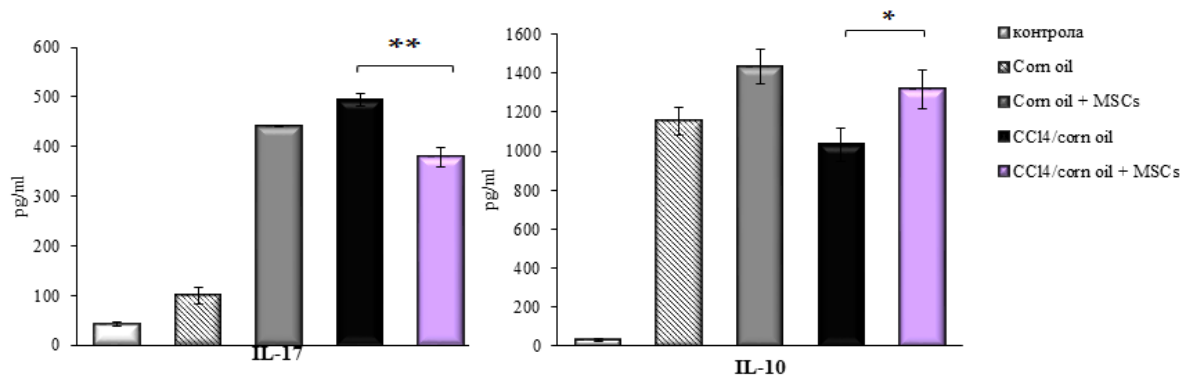


**Графикон 10. RT-PCR анализа експресије гена у хомогенатима јетре након примене CCl<sub>4</sub> и MSCs.** Експресија гена за Collagen-1, α-SMA и TGF-β је значајно снижена у хомогенатима оболелих мишева код којих је фиброза јетре изазвана CCl<sub>4</sub> и који су примили MSCs, у односу на групе мишева који су примили само CCl<sub>4</sub>, односно CCl<sub>4</sub>+STO ћелије. Приказане вредности су средње вредности ± SE; \*\* p<0,01, \*p<0,05.

Обзиром да је показано да примена STO ћелија, под истим условима као и MSCs, није супримирао развој фиброзе, указујући да су описани ефекти у супресији фиброзе последица специфичних хепатопротективних и имуносупресивних карактеристика MSCs.

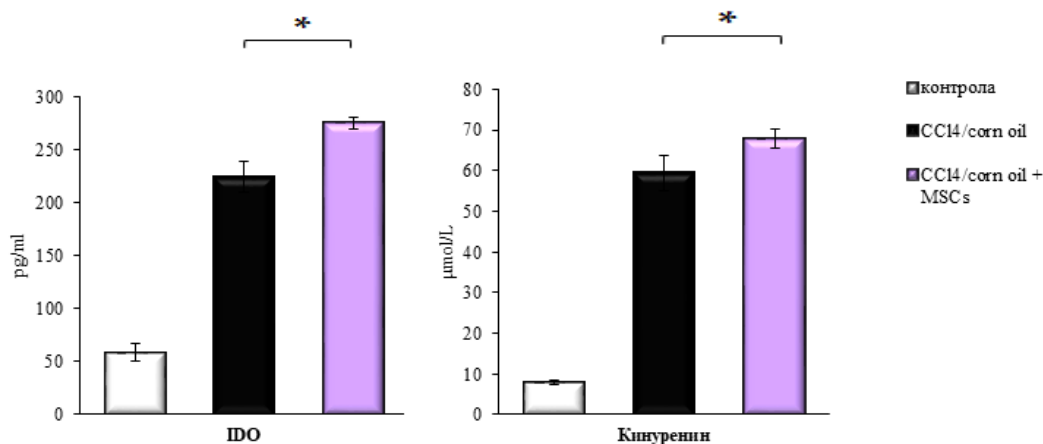
#### 4.2.3. MSCs смањују ниво IL-17 у серуму и инфилтрацију CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита који продукују IL-17 у јетрама мишева третираних CCl<sub>4</sub>

Смањење фиброзе јетре, применом MSCs, је у корелацији са сниженом концентрацијом инфламацијског и профиброгеног IL-17 (p<0,01) и повишеном концентрацијом имуносупресивног и хепатопротективног IL-10 (p<0,05) у серуму мишева који су примали MSCs, што је приказано на Фигури 12.



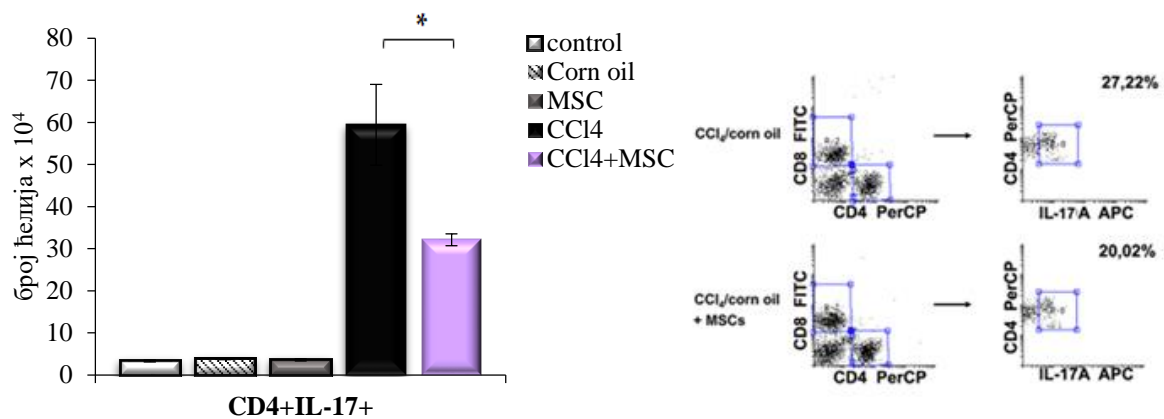
**Фигура 12. MSCs смањују концентрацију IL-17 код мишева којима је изазвана фиброза јетре.** Применом стандардног ELISA теста, показано је да је концентрација IL-17 у серуму значајно виша, а концентрација IL-10 значајно нижа у серуму мишева који су примали само CCl<sub>4</sub>, у поређењу са мишевима који су уз CCl<sub>4</sub> примали и MSCs (средња вредност ± SE, \*\*p<0,01, \*p<0,05).

Поред утицаја на концентрацију IL-17 и IL-10 у серумима мишева, примена MSCs у овом моделу фиброзе јетре је значајно повећала серумску концентрацију IDO-а (p<0,05) и завршног продукта ензимске активности IDO-а – кинуренина (p<0,05) (Фигура 13). Разлика је статистички значајна у односу на серумске концентрације код мишева који су примали само CCl<sub>4</sub>, указујући на значај овог ензима у дејству MSCs на фиброзу јетре која настаје као последица активности IL-17 (Фигура 12).

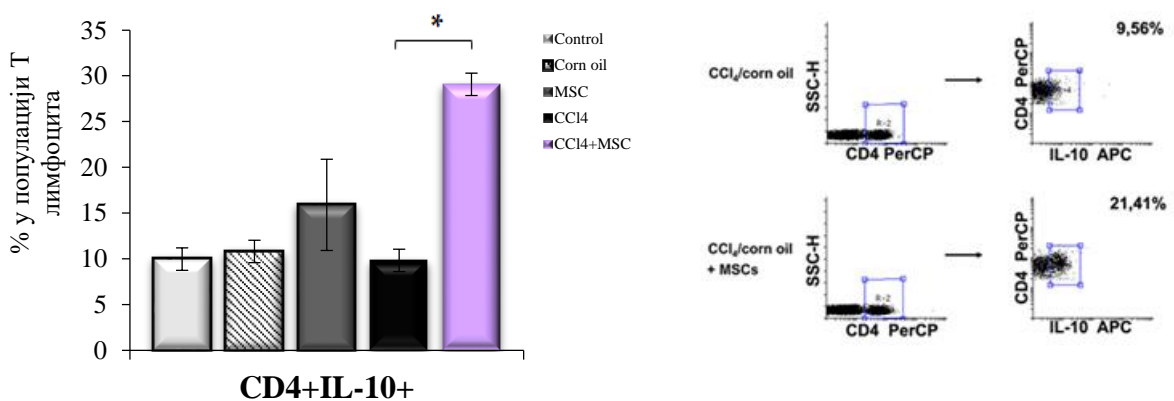


**Фигура 13: MSCs смањују концентрацију IDO и кинуренина код мишева којима је изазвана фиброза јетре.** Применом стандардног ELISA теста, показано је да је серумска концентрација IDO и кинуренина значајно нижа у серуму мишева који су примали само CCl<sub>4</sub>, у поређењу са мишевима који су уз CCl<sub>4</sub> примали и MSCs (средња вредност ± SE, \*p<0,05).

Када је утврђено да примена MSCs утиче на развој фиброзе, поставило се питање и механизма ове модулације. Да би се утврдило на које популације интрахепатичних ћелија делују MSCs, проточном цитометријом, анализиран је фенотип мононуклеарних леукоцита који се налазе у инфилтратима јетре. Интрацелуларно бојење је показало значајно нижи број IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита ( $p < 0,01$ ), односно Th17 субпопулације CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита (Фигура 14), као и значајно већи проценат IL-10- продукујућих CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита ( $p < 0,05$ ) у оболелих мишева који су примали MSCs, у односу на оне који су примали само CCl<sub>4</sub> (Фигура 15).

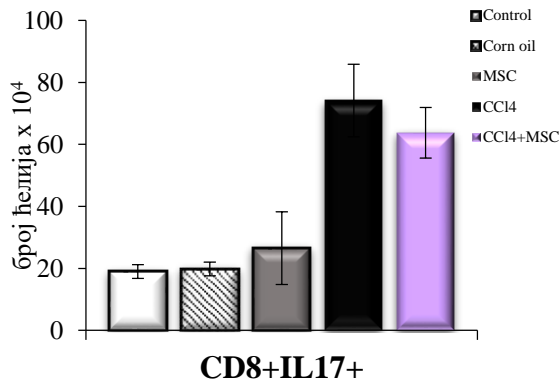


**Фигура 14. Примена MSCs смањује број CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> Т лимфоцита у јетри мишева којима је изазвана фиброза. Број IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита је значајно већи у јетри мишева који су примали само CCl<sub>4</sub>, у поређењу са мишевима који су поред CCl<sub>4</sub> примали и MSCs (средња вредност ± SE, \* $p < 0,05$ ). Приказани су репрезентативни плотови.**



**Фигура 15. Примена MSCs повећава проценат CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Т лимфоцита у јетри мишева којима је изазвана фиброза. Процент CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Т лимфоцита је значајно већи у јетри мишева који су примали CCl<sub>4</sub> + MSCs у поређењу са мишевима који су примали само CCl<sub>4</sub>, (средња вредност ± SE, \* $p < 0,05$ ). Приказани су репрезентативни плотови.**

Насупрот добијеним разликама у вредностима  $CD4^+$  Т лимфоцита између експерименталних група, не постоји статистички значајна разлика у апсолутном броју  $IL-17^+$   $CD8^+$  Т лимфоцита између ових група (Графикон 11), што указује да су  $CD4^+$  Т лимфоцити циљне ћелије преко којих MSCs остварују модулацију производње  $IL-17$  у јетри.



**Графикон 11. Примена MSCs не мења број  $CD8^+$   $IL-17^+$  Т лимфоцита.** Не постоји статистички значајна разлика у апсолутном броју  $CD8^+$   $IL-17^+$  Т лимфоцита, између експерименталне групе оболели мишева и групе оболелих мишева који су примили MSCs. Приказане вредности су средње вредности  $\pm$  SE.

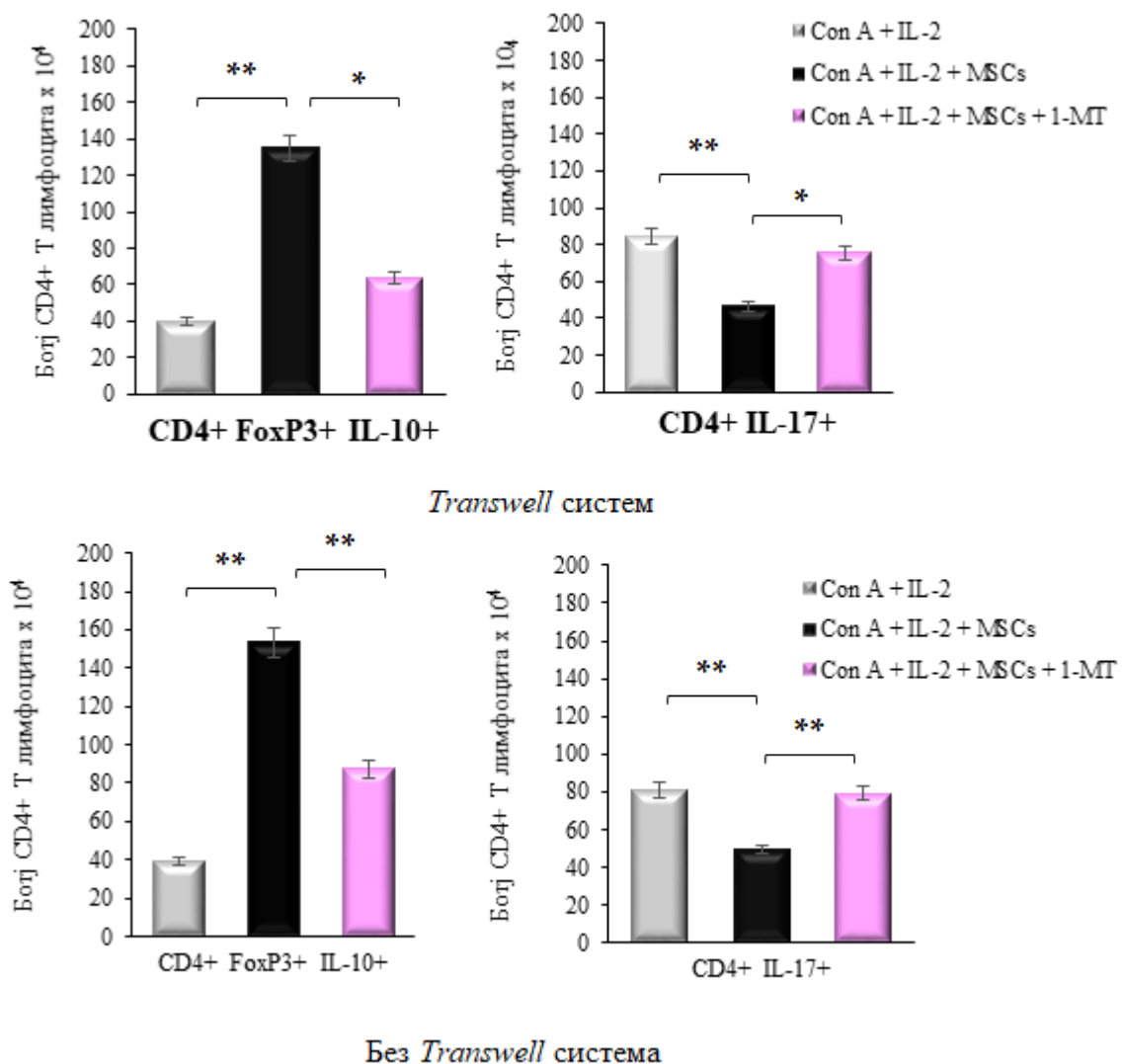
#### 4.2.4. MSCs паракриним механизмом супримирају Th17 лимфоците

Претходним резултатима је показано да MSCs супримирају Th17 субпопулацију  $CD4^+$  Т лимфоцита. Међутим, није познато да ли је директан међућелијски контакт између ове две популације неопходан за описану супресију или MSCs преко својих солубилних молекула супримирају Th17 лимфоците јетре. Зато су MSCs и  $CD4^+$  Т лимфоцити јетре *in vitro* култивисани у директној кокултури или у *transwell* систему, који пермеабилном мембраном физички раздваја ове две ћелијске популације, а омогућава пролаз солубилних молекула.

Резултати добијени проточном цитометријом показују статистички значајно мањи апсолутни број активираних  $CD4^+$  Т лимфоцита који продукују  $IL-17$ , а који су кокултивисани са MSCs у *transwell* систему, у поређењу са стимулираним  $CD4^+$  Т лимфоцитима, култивисаним без MSCs ( $p < 0,01$ ) (Фигура 16). Слично претходно добијеним резултатима, солубилни производи MSCs значајно повећавају апсолутан број Foxp3<sup>+</sup>  $CD4^+$  Т лимфоцита који продукују  $IL-10$  ( $p < 0,01$ ) (Фигура 16). Слични резултати

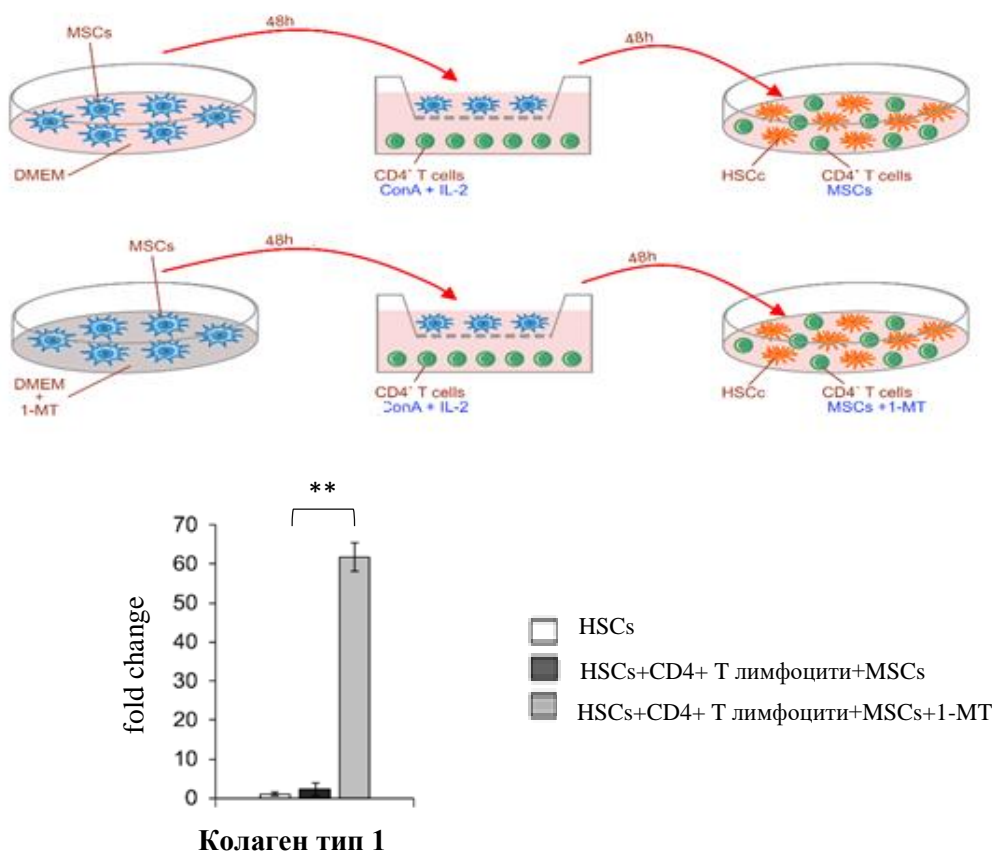
су добијени у експерименту где су MSCs и CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити јетре култивисани у директном контакту, односно без *transwell* система, ( $p < 0,01$ ) (Фигура 16). Добијени резултати показују да MSCs, паракриним механизмом, утичу на повећање броја регулаторних CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> Т лимфоцита (*Tregs*) и супримирају Th17 лимфоците.

Описани феномен у потпуности нестаје у присуству 1-метил триптофана (1-MT), инхибитора ензимске активности IDO, односно постоји значајно повећање броја Th17 лимфоцита, и насупротив томе статистички значајно смањење регулаторних Т лимфоцита који продукују IL-10.



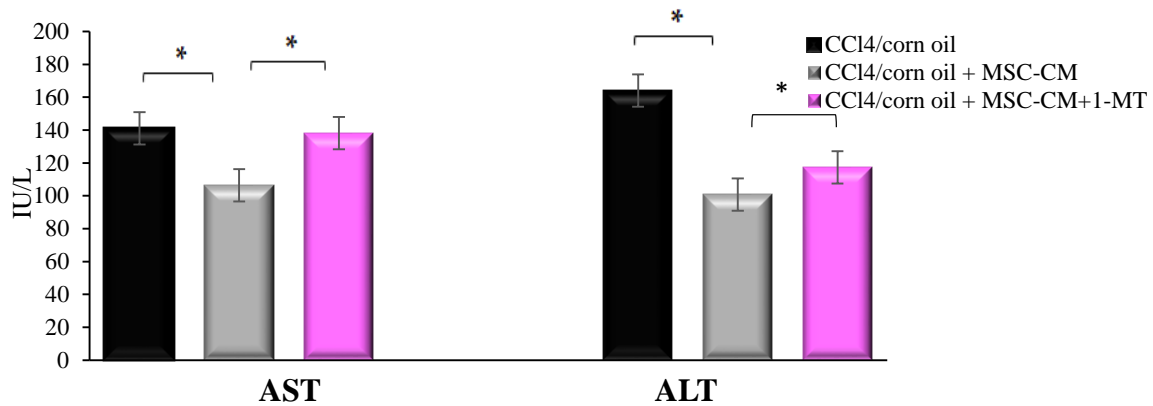
**Фигура 16. Примена 1-MT блокира имуносупресивна својства MSCs на CD4<sup>+</sup> Т лимфоците.** Примена 1-MT значајно повећава број CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> Т лимфоцита, а смањује број CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> Т лимфоцита у *transwell* систему и без њега. Приказане вредности су средње вредности ± SE. \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ .

Да би потврдили добијене резултате, да MSCs преко IDO, супримирају развој фиброзе, изоловали смо стелатне ћелије јетре и кокултивисали са MSCs и активираним CD4<sup>+</sup> Т лимфоцитима у једној групи и са MSCs и активираним CD4<sup>+</sup> Т лимфоцитима уз присуство 1-МТ и у њима је одређена експресија колагена тип 1. Након 48 часова, значајно је била нижа експресија гена за *Collagen-1* ( $p < 0,01$ ) у стелатним ћелијама које су кокултивисане са MSCs и активираним CD4<sup>+</sup> Т лимфоцитима уз присуство 1-МТ, показујући тако да MSCs активношћу IDO-а утичу на активацију и CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита и стелатних ћелија (Фигура 17).



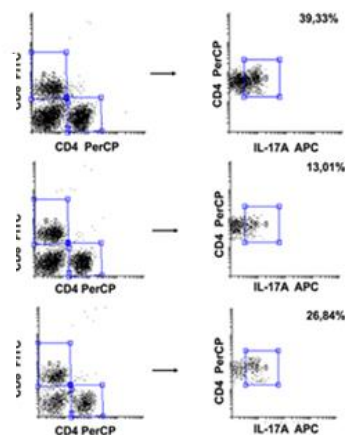
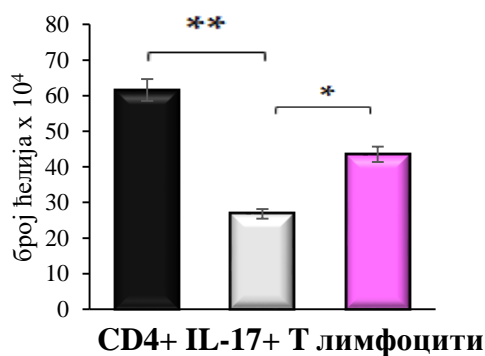
**Фигура 17. Шематски приказ кокултивације CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита са MSCs, односно MSCs+1-МТ у току 48 часова након чега су исте групе култивисане са HSCs. Из добијеног ћелијског узорка, RT-PCR анализом је показано да је вредност колагена 1 у групи HSCs+MSCs+1-МТ значајно већа у односу на групу без 1-МТ. Приказане вредности су средње вредности ± SE. \*\* $p < 0,01$ .**

У складу са резултатима добијеним у *in vitro* експериментима, примена MSC-СМ у анималном моделу значајно смањује концентрацију трансаминаза, АСТ ( $p < 0,05$ ) и АЛТ ( $p < 0,05$ ) у серуму мишева, што је показано на Фигури 18.

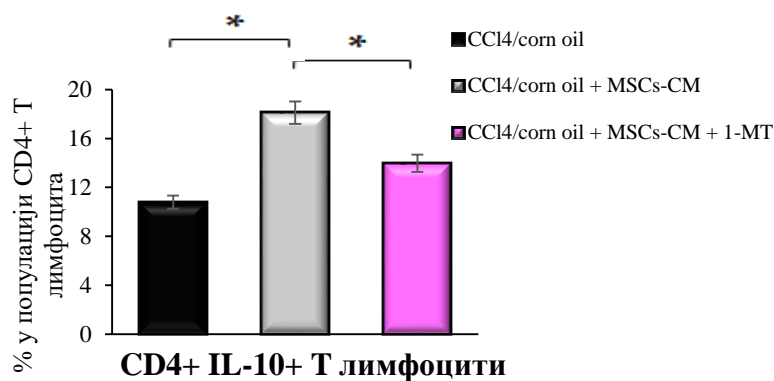


**Фигура 18. Концентрација трансаминаза у серуму мишева након примене CCl<sub>4</sub> и MSCs у фибрози јетре.** Концентрација трансаминаза (AST и АЛТ) је статистички значајно мања у серуму мишева који су током примене CCl<sub>4</sub> примали и MSC-СМ, у поређењу са мишевима који су примили CCl<sub>4</sub>+ MSCs + 1-МТ (ИДО инхибитор) (средња вредност ± SE, \* $p < 0,05$ ).

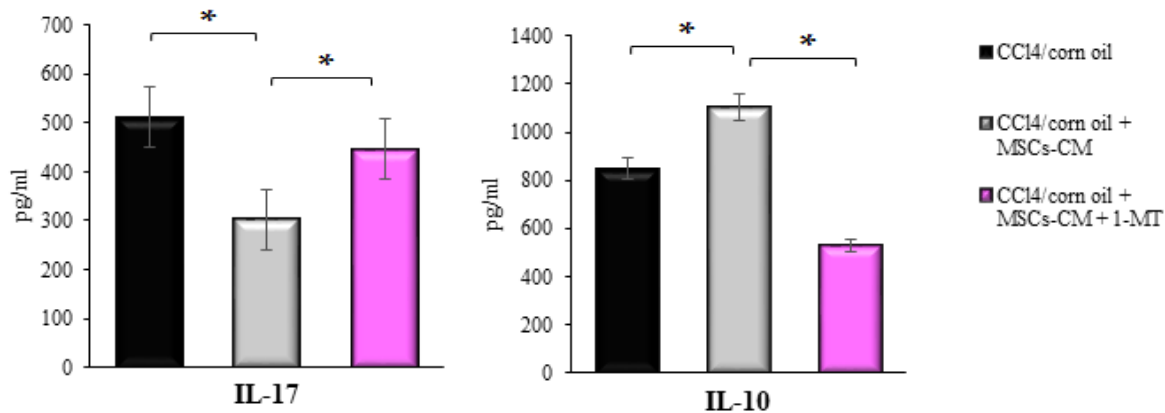
Интрацелуларним бојењем, применом проточне цитометрије је анализиран апсолутан број и проценат CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита, и показано је да примена MSC-СМ значајно смањује број интрахепатичних CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита који продукују IL17 ( $p < 0,01$ ) (Фигура 19) и значајно повећава проценат CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита који продукују IL-10 ( $p < 0,05$ ) код оболелих мишева (Фигура 19), што је у корелацији са смањеном концентрацијом профиброгеног IL-17 ( $p < 0,05$ ) и повећаном концентрацијом хепатопротективног IL-10 ( $p < 0,05$ ) (Фигура 20).







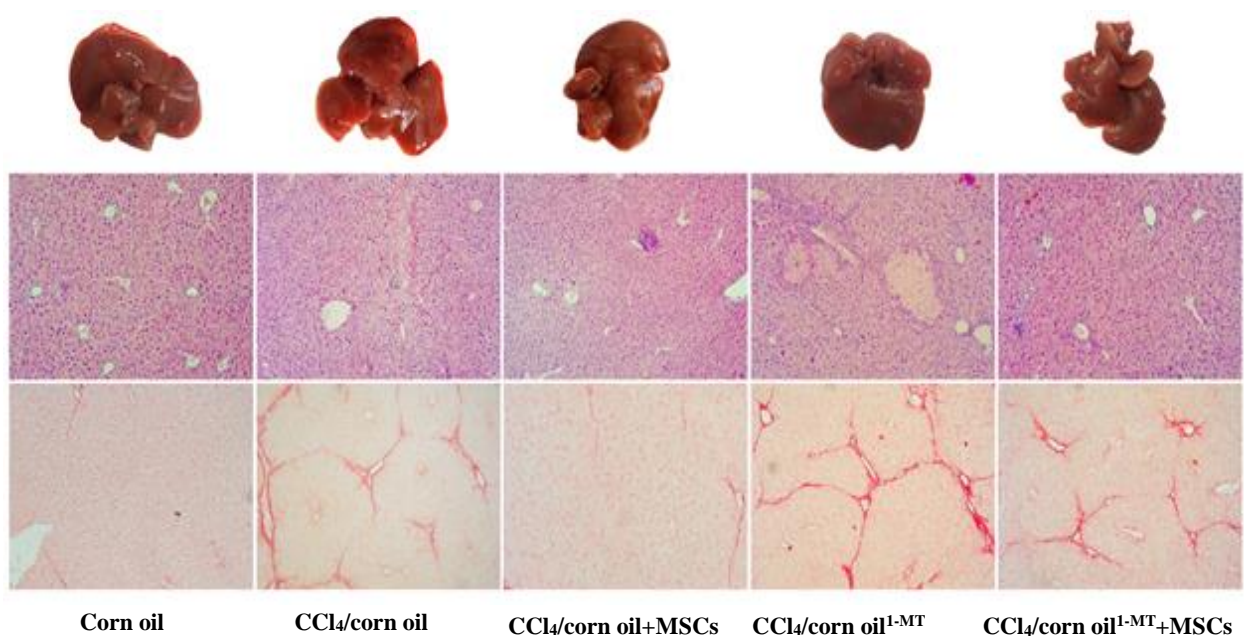
**Фигура 19.** Примена MSCs-CM смањује број CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> Т лимфоцита у јетри мишева којима је изазвана фиброза. Број IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита је значајно виши, док је проценат CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> Т лимфоцита значајно нижи у јетри мишева који су примали CCl<sub>4</sub>+MSCs+1-MT, у поређењу са мишевима који су поред CCl<sub>4</sub> примали и MSCs, односно само CCl<sub>4</sub>, указујући да инхибиција IDO у потпуности блокира имunosупресивни ефекат MSCs (средња вредност ± SE, \*\*p<0,01, \*p<0,05). Приказани су репрезентативни плотови.



**Фигура 20:** MSCs смањују концентрацију IL-17 код мишева којима је изазвана фиброза јетре. Применом стандардног ELISA теста, показано је да је концентрација IL-17 значајно виша а концентрација IL-10 значајно нижа у серуму мишева који су примали CCl<sub>4</sub>+MSCs+1-MT, у поређењу са мишевима који су поред CCl<sub>4</sub> примали и MSCs, указујући да IDO инхибиција у потпуности блокира имunosупресивни ефекат MSCs (средња вредност ± SE, \*p<0,05).

Такође, инхибиција IDO смањује способност MSC-СМ да повећа присуство IL-10<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита (p<0,05, Фигура 19). Уз то, апсолутни број IL-17<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита значајно је повећан у групи оболелих мишева који су примили MSC-СМ и 1-МТ (p<0,05, Фигура 19), што потврђује претходне резултате, да способност MSCs да супримирају инфилтрацију јетре Th17 лимфоцитима зависи од ензима IDO.

#### 4.2.5. Примена 1-МТ *in vivo* погоршава фиброзу јетре



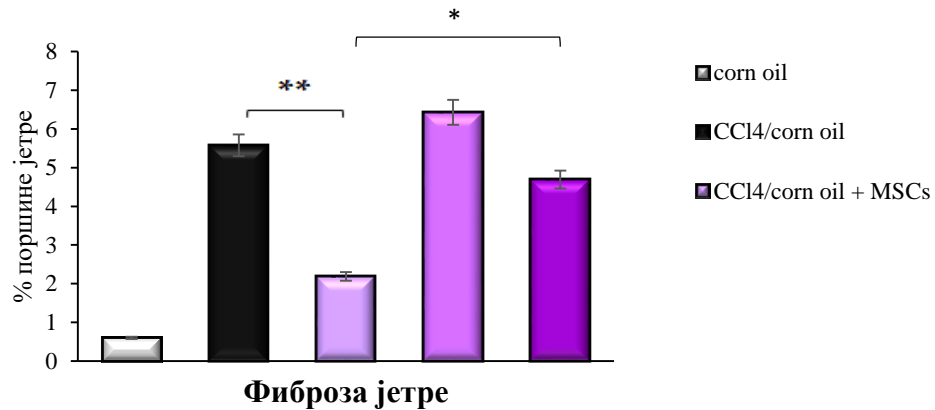
**Слика 5: Макроскопски изглед јетри мишева.**

Репрезентативни исечци јетре мишева. Стандарно патохистолошко бојење (H&E) и примена *Sirius red* технике. Увећање x40.

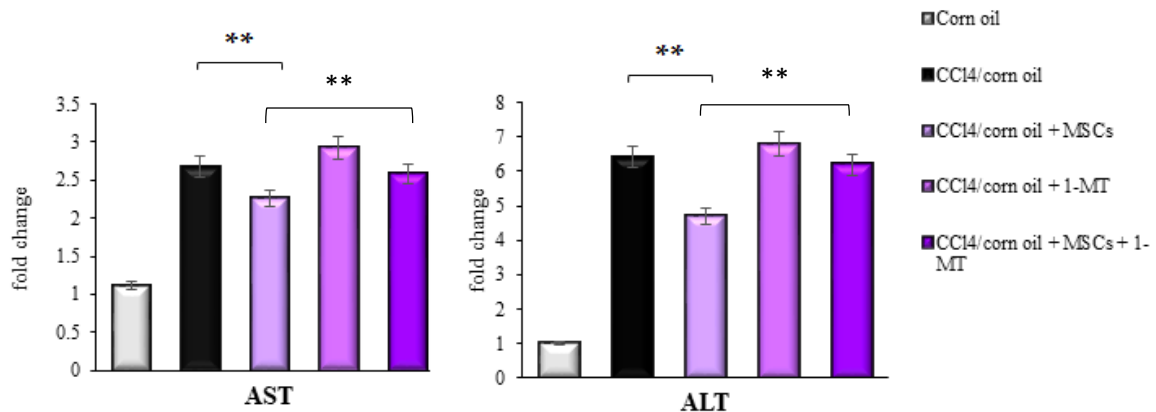
Макроскопским прегледом се уочава да јетра мишева који су примили CCl<sub>4</sub>, MSCs и 1-МТ, изгледа слично јетри CCl<sub>4</sub>-третираних мишева који нису примили MSCs, тј показује ирегуларне контуре са једним или више нодуса на површини (Слика 5).

Бојење хистолошких исечка хематоксилином и еозином јетри мишева који су примили CCl<sub>4</sub>, MSCs и 1-МТ показује израженије оштећење хепатоцита, са пратећим

инфламацијским инфилтратом, некрозом појединачних хепатоцита и формирањем регенеративних фиброзних септи. Ове промене се не запажају у јетрама CCl<sub>4</sub>-третираних мишева који су примили само MSCs (Слика 5). Након примене *Sirius red* технике, уочава се да јетре мишева третираних CCl<sub>4</sub>+MSCs+1-МТ показују екстензивно депоновање колагена који доводи до формирања псеудолобулуса што указује на развој фиброзе јетре, за разлику од мишева који нису пили 1-МТ.



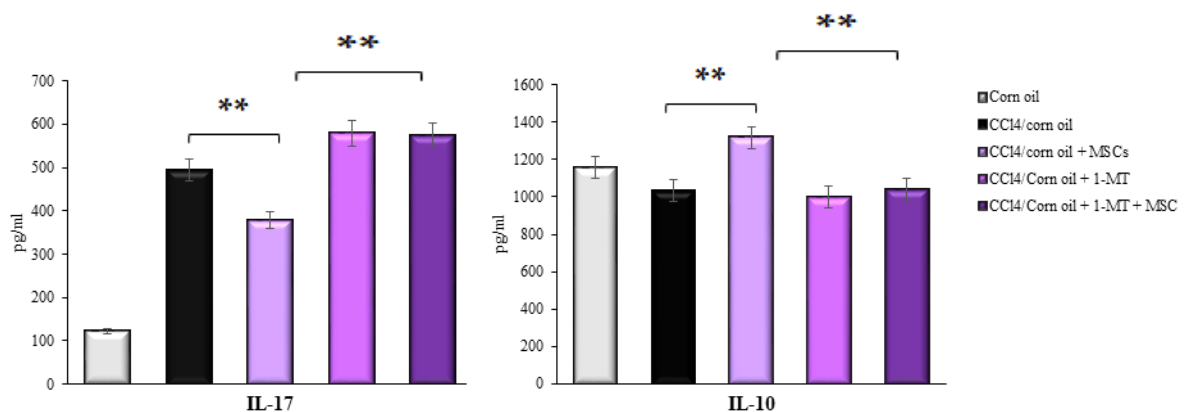
**Графикон 12.** Примена 1-МТ блокира имunosупресивни ефекат MSCs *in vivo*. Процент фиброзе јетре је значајно нижи у групи оболелих мишева који су пили 1-МТ. Приказане вредности су средње вредности ± SE; \*\* p<0,01.



**Фигура 21.** Примена 1-МТ блокира имunosупресивни ефекат MSCs *in vivo*. Концентрације трансаминаза у серуму су значајно нижи у групи оболелих мишева који су пили 1-МТ. Приказане вредности су средње вредности ± SE; \*\* p<0,01.

Постоји статистички значајна разлика у проценту фиброзе између експерименталних група мишева, односно, проценат фиброзе је значајно мањи у групи која је третирана са CCl<sub>4</sub> и MSCs у односу на групу која је примала само CCl<sub>4</sub> (Графикон 12, p<0,01). Такође, постоји статистички значајно мањи проценат фиброзе у експерименталној групи која је поред CCl<sub>4</sub> и MSCs пила 1-MT, у односу на групу која је примила само CCl<sub>4</sub> и MSCs (Графикон 12, p<0,01).

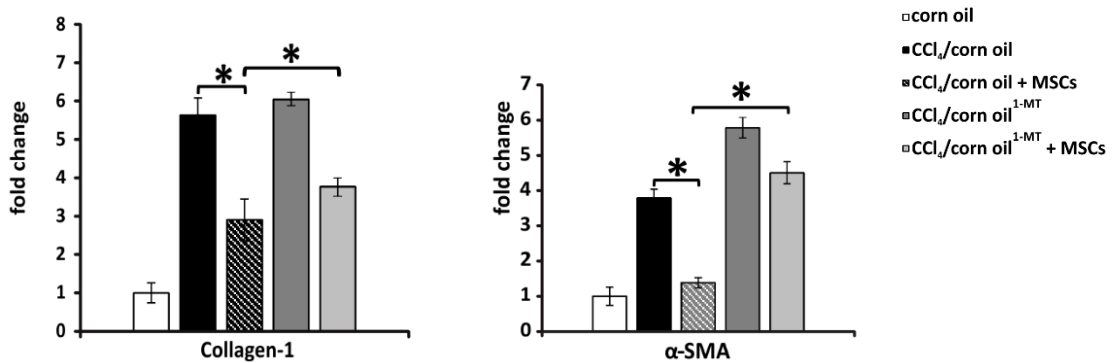
Описане макроскопске и микроскопске разлике између експерименталних група мишева су поткрепљене добијеним вредностима трансаминаза. Наиме, значајна је разлика у вредностима AST и ALT између групе мишева код којих је фиброза јетре изазвана CCl<sub>4</sub> у односу на групу мишева који су примали CCl<sub>4</sub> и MSCs (Фигура 21, p<0,01), као и између група мишева који су примили CCl<sub>4</sub> и MSCs и CCl<sub>4</sub> и MSCs + 1-MT (Фигура 21, p<0,01), односно вредности трансаминаза су значајно мање у групи мишева који су третирани MSCs. Наведени резултати показују да примена IDO инхибитора *in vivo*, поништава имуномодулацијско дејство MSCs и омогућава развој фиброзе у овим експерименталним групама.



**Фигура 22: Примена 1-MT блокира имуносупресивни ефекат MSCs *in vivo*.** Применом стандардног ELISA теста, показано је да је серумска концентрација IL-17 значајно виша и концентрација IL-10 значајно нижа у серуму мишева који су пили 1-MT. Приказане вредности су средње вредности ± SE; \*\* p<0,01.

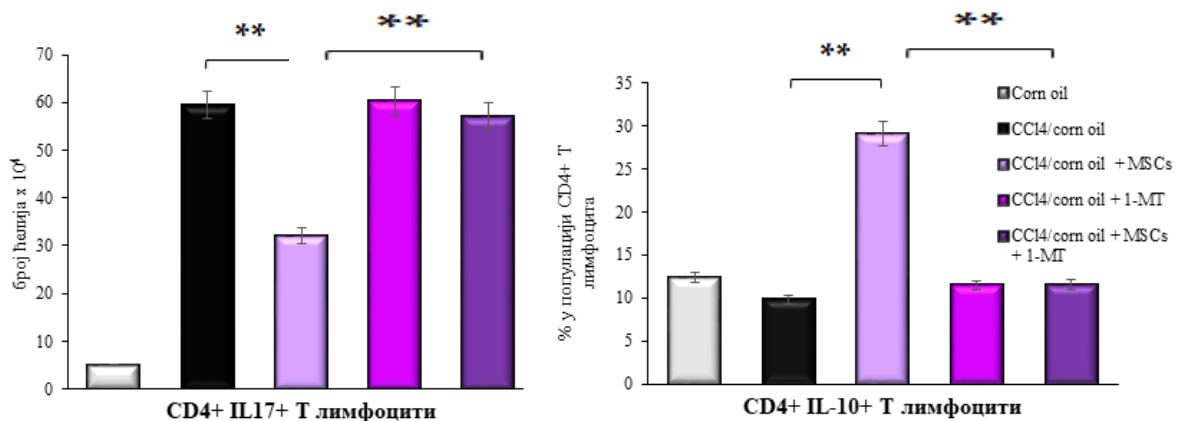
Концентрације цитокина у серуму (IL-17 и IL-10) иду у прилог претходним резултатима. Концентрација IL-17 је значајно мање у експерименталној групи која је примала и MSCs, у односу на групу која је примала само CCl<sub>4</sub> (Фигура 22, p<0,01). Такође концентрација

IL-10 је значајно виша у експерименталној групи мишева код које је применом 1-МТ блокирана активност IDO, у односу на групу мишева код које је изазвана фиброза јетре и који су примали MSCs (Фигура 22,  $p < 0.01$ ).



**Фигура 23:** Примена 1-МТ блокира имunosупресивни ефекат MSCs *in vivo*. Кванитативна експресија гена за Collagen-1 и  $\alpha$ -SMA у серуму мишева који су пили 1-МТ. Приказане вредности су средње вредности  $\pm$  SE; \*  $p < 0.05$ .

Применом RT-PCR је показана статистички значајна разлика између експресије гена за *Collagen-1* и  $\alpha$ -SMA. Вредности *Collagen-1*,  $\alpha$ -SMA су значајно мање у групи која је примала CCl<sub>4</sub> и MSCs, у односу на групу која није третирана са MSCs ( $p < 0.05$ ) и у односу на групу у којој је активност IDO блокирана применом 1-МТ (Фигура 23,  $p < 0.05$ ).

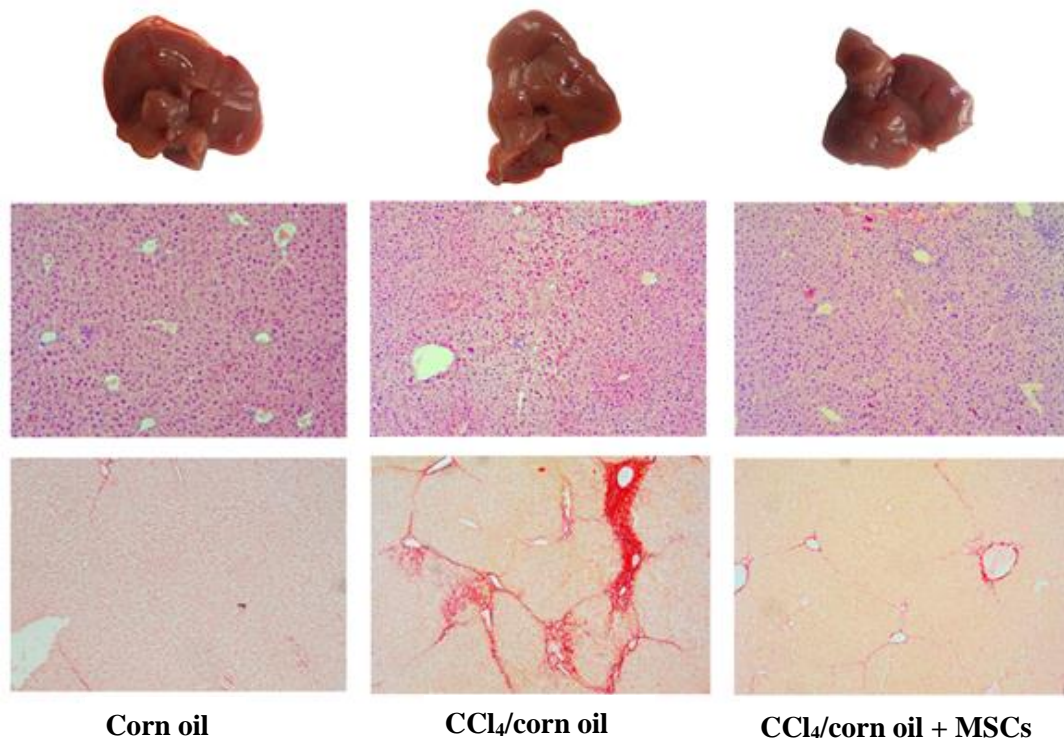


**Фигура 24:** Примена 1-МТ блокира имunosупресивни ефекат MSCs *in vivo*. Апсолутни број CD4<sup>+</sup> IL-17<sup>+</sup> Т лимфоцита је значајно виши, док је проценат CD4<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> Т лимфоцита значајно нижи у јетри мишева који су пили 1-МТ. Приказане вредности су средње вредности  $\pm$  SE; \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

На Фигури 24 је приказана заступљеност CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита који инфилтришу јетру. Број CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> Т лимфоцита је значајно нижи у CCl<sub>4</sub>+MSCs групи мишева, у односу на CCl<sub>4</sub> и CCl<sub>4</sub>+MSCs+1-MT групу (p<0,01). Процент CD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> Т лимфоцита је значајно нижи у CCl<sub>4</sub>+MSCs групи мишева, у односу на CCl<sub>4</sub> и CCl<sub>4</sub>+MSCs+1-MT групу (Фигура 24, p<0,05). Наведени резултати показују да *in vivo* инхибиција IDO, применом 1-MT, поништава имуносупресивне и хепатопротективне ефекте MSCs.

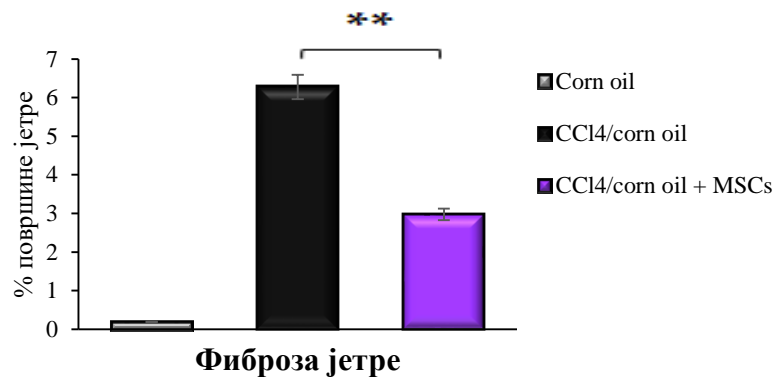
#### 4.2.6. Терапијска примена MSCs смањује фиброзу јетре у развијеној болести

Након што је показано да примена MSCs смањује развој и прогресију фиброзе јетре када се MSCs примењују истовремено са индуковањем фиброзе, имплицирајући да правовремена или превентивна примена MSCs смањује фиброзу јетре, поставило се питање да ли терапијска примена MSCs може редуковати већ развијену фиброзу јетре. Након четири недеље давања CCl<sub>4</sub> по већ описаном протоколу, односно када се фиброза развила, мишеви су наредне 3 недеље примали MSCs, једном недељно.



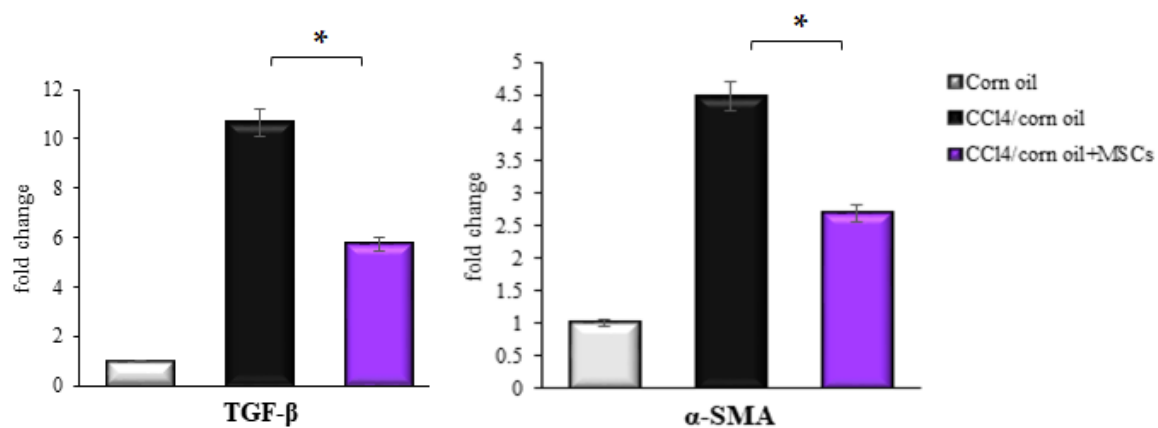
**Слика 6: Макроскопски изглед јетри мишева. Репрезентативни исечци јетре мишева: Стандарно патохистолошко бојење (H&E) и примена *Sirius red* технике, визуелизација депоновања колагена. Увећање x40.**

Макроскопски преглед јетри групе мишева који су, у терапијском режиму, примили MSCs показује да је структура јетри униформнија, без изражених регенеративних нодуса на површини (Слика 6). Микроскопски преглед, тј Н&Е бојење, такође показује да у експерименталној групи мишева који су терапијски примили MSCs показује мање оштећење хепатоцита, са смањеним инфламацијским инфилтратом (Слика 6) као и смањено депоновање колагена. Процент фиброзе је значајно нижи у експерименталној групи мишева који су, у терапијском режиму, примали MSCs (Графикон 13).



**Графикон 13. Терапијска примена MSCs смањује проценат фиброзе.** Процент фиброзе је значајно нижи у групи оболелих мишева који су поред CCl<sub>4</sub> примали MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само CCl<sub>4</sub>. Приказане вредности су средње вредности ± SE; \*\* p<0,01.

На Графикону 14, показани су резултати квалитативне RT-PCR анализе, који показују да је експресија гена за TGF-β и α-SMA значајно нижа у експерименталној групи мишева који су примали MSCs (p<0,05), потврђујући да је терапијска примена MSCs значајно редуковала развијену фиброзу.



**Графикон 14: Терапијска примена MSCs смањује вредност експресије гена за TGF-β и α-SMA.** Експресија ових гена је значајно нижа у групи оболелих мишева који су поред CCl<sub>4</sub> примали MSCs, у поређењу са мишевима који су примили само CCl<sub>4</sub>. Приказане вредности су средње вредности ± SE; \*p<0,05.



## 5. ДИСКУСИЈА

Добијени резултати спроведеног истраживања показују да примена MSCs смањује инфламацију у акутном оштећењу јетре супресијом IL-17-продукујућих NKT ћелија и да смањује фиброзу јетре инхибицијом IL-17-продукујућих CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита.

### 5.1. MSCs редукују акутно оштећење јетре смањењем броја NKT17 ћелија и повећањем присуства регулаторних NKT ћелија у јетри

У акутном оштећењу јетре, NKT ћелије као главне ефекторске ћелије су, у великом броју, присутне у јетри мишева и поред Т лимфоцита, макрофага и дендритских ћелија имају најзначајнију улогу у оштећењу хепатоцита (308-310). У основи акутног оштећења хепатоцита које изазивају NKT ћелије је индукција апоптозе хепатоцита, настала FasL:Fas интеракцијом, активацијом система перфорин/гранзим и продукцијом про-инфламацијских цитокина IFN- $\gamma$ , IL-4 и TNF- $\alpha$  (123).

Субпопулација NKT ћелија која се карактерише продукцијом IL-17 и експресијом транскрипционог фактора ROR $\gamma$ T, и која се означава као NKT17 ћелије, сматра се најзначајнијом популацијом интрахепатичних имунских ћелија која производи IL-17 у патогенези акутног хепатитиса. У патогенези акутног оштећења јетре, IL-17 има значајну улогу (143). Укључен је у мобилизацију, регрутовање и активацију инфламацијских ћелија и доводи до масивне некрозе хепатоцита (146). Када  $\alpha$ -GalCer специфично активира NKT ћелије, покренувши снажан имунски одговор јетре, односно развој акутног хепатитиса код мишева (270), оне брзо продукују IL-17, који потом утиче на појачану инфилтрацију другим инфламацијским ћелијама у јетри (151).

Већи број објављених студија је приказао терапијски ефекат MSCs у акутном хепатитису (249, 250, 311-313), међутим, ефекат MSCs на фенотип и функцију NKT17 ћелија био је непознат. У овом истраживању, показано је да примена MSCs значајно смањује развој акутног хепатитиса, као последица супресије NKT17 ћелија и да није утицала на продукцију IL-17 у Т лимфоцитима и неутрофилима.

Подаци до сада објављених студија показују да се терапијски ефекат MSCs у акутном оштећењу јетре првенствено заснива на њиховим имуномодулацијским својствима (155) које остварују директним контактом са ћелијама имунског система или секрецијом

солубилних фактора (227). Резултати ове студије показују да MSCs, паракриним механизмом смањују цитотоксички потенцијал као и способност NKT ћелија да продукују инфламацијске цитокине, што резултира значајном редукцијом оштећења јетре. Експерименти у којима су MSCs и NKT ћелије кокултивисане у *transwell* систему као и евидентан хепатопротективан ефекат MSC-CM су доказали да директан међућелијски контакт није неопходан за имуносупресивни утицај MSCs на NKT ћелије (Графикон 7, Фигура 9).

Интравенска примена MSCs, као и апликација MSC-CM смањује капацитет NKT ћелија јетре да продукују IL-17, што редукује инфламацијски инфилтрат у акутном хепатитису (Фигура 9, Графикон 6), што показује да MSCs, могу супримирати NKT17 ћелије продукцијом солубилних молекула, односно паракриним механизмом, и да директан контакт између ове две ћелијске популације није неопходан за модулацију IL-17 сигналног пута у акутном хепатитису.

Такође, фармаколошка инхибиција IDO-а у MSC-CM, у којем су култивисане  $\alpha$ -GalCer-ом стимулисане NKT ћелије јетре мишева, у потпуности је инхибирала имуносупресивни ефекат MSC-CM на NKT ћелије *in vitro*. Стимулисане NKT ћелије култивисане у MSC-CM, у којем су блокирани поменути имуносупресивни ензими, биле су токсичније за HepG2 ћелије, у односу на  $\alpha$ -GalCer-ом стимулисаним NKT ћелијама које су култивисане у MSC-CM без присуства IDO инхибитора (Графикон 7).

У акутном хепатитису, изазваном  $\alpha$ -GalCer-ом, у јетри се могу наћи FoxP3<sup>+</sup> регулаторни Т лимфоцити који продукују IL-10 и супримирају инфламацију у јетри (307). У експерименталном моделу акутног хепатитиса, показано је да стимулисане NKT ћелије, мобилишу *Treg* у јетру, који се преко CD103, мембранског молекула везују чврсто за паренхим јетре (314). Th1 лимфоцити, продукцијом IFN- $\gamma$  који повећава експресију CXCL10 у јетри, лиганда за CXCR3 рецептор на *Treg* лимфоцитима (315, 316), повећавају инфлукс FoxP3<sup>+</sup> *Treg* лимфоцита, који продукују имуносупресивне IL-10 и TGF- $\beta$ 1.

Из доступне литературе је познато да, на развој акутног хепатитиса, утичу измене у процентуалној заступљености, односно односу Th17 и регулаторних Т лимфоцита (317) и да поремећај баланса ове две ћелијске популације промовише даљу прогресију акутног хепатитиса (318). У складу са тим, супресија NKT17 ћелија, применом MSCs, била је

праћена повећаним присуством FoxP3<sup>+</sup> NKT регулаторних ћелија које продукују имуносупресивни и хепатопротективни IL-10 (Фигура 7). Наведени резултати указују да корист терапијске примене MSCs у акутном хепатитису у највећој мери зависи од промене односа између NKT17 ћелија и регулаторних NKT ћелија у јетри.

Прогресивне инфламацијске болести су удружене са губитком Th17 лимфоцита и истовременим повећањем популације имуносупресивних регулаторних Т лимфоцита и у периферној крви и инфламираном ткиву (319). IDO, снажан каталитички ензим, стимулише имуносупресивна својства регулаторних Т лимфоцита и истовремено онемогућава конверзију регулаторних лимфоцита у ефекторске Т лимфоците који продукују IL-17 (320). Генетском делецијом или инхибицијом овог ензима, повећава се број Th17 лимфоцита и смањује стварање регулаторног субтипа (320). У хуманој популацији, IDO је кључни имуномодулацијски фактор, који продукују MSCs. У инфламацијском одговору који стимулише поларизацију наивних Т лимфоцита ка Th17 ћелијама, мишије MSCs своје имуносупресивне ефекте остварују путем IDO, тако да се може закључити да је супресија развоја Th17 субсета зависна од функције ензима IDO (317).

У складу са досадашњим сазнањима, резултати ове студије показују да измена односа регулаторних NKT и NKT-17 ћелија, у корист регулаторних ћелија је у вези са повишеном концентрацијом IDO у серуму и да смањење хепатотоксичности NKT ћелија настаје као последица примене MSCs.

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

## 5.2. Мезенхималне матичне ћелије редукују фиброзу јетре смањењем броја Th17 лимфоцита у јетри

Фиброза јетре је процес зарастања ране, са циљем очувања интегритета органа. Иако представља реверзибилни процес, пролонгираним присуством ноксе која је изазвала иницијално оштећење може прогредирати у цирозу, и касније проузроковати настанак хепатоцелуларног карцинома (281). У развоју фиброзе јетре, критичну улогу играју стелатне ћелије јетре које се услед хроничног оштећења или пролонгираног излагања цитокинима, као што су PDGF, TGF- $\beta$ , IL-1, TNF- $\alpha$  активирају, акумулирају на месту оштећења и промовишу акумулацију екстрацелуларног матрикса (170, 190-192).

У развоју фиброзе јетре, Th17 субпопулација Т лимфоцита игра значајну улогу (206-208) продукујући IL-17 који директно стимулише стелатне ћелије да продукују колаген тип 1 и промовишу њихову активацију у миофибробласте јетре, што директно доприноси развоју фиброзе јетре (206). У јетрама пацијената са фиброзом јетре детектује се повећана експресија IL-17, која је у корелацији са бројем циркулишућих Th17 лимфоцита, али и са тежином болести (206). Th17 ћелије продукцијом IL-17 стимулишу стелатне ћелије које под дејством овог цитокина повећавају продукцију колагена 1,  $\alpha$ SMA и TGF- $\beta$ 1 и доприносе развоју фиброзе јетре (205, 206-208).

Познато је да MSCs промовишу експанзију Treg лимфоцита (181). Treg лимфоцити имају значајну улогу у одржавању имунске толеранције у јетри, чему у прилог говори чињеница да се, током акутне фазе запаљења у јетри, апоптозом значајно смањује број ових ћелија и као последица редукције броја интрахепатичких Treg се развија инфламација (321, 322). Продукцијом IL-10 и TGF- $\beta$ , Treg супримирају ефекторске Т лимфоците укључујући и Th17 субпопулацију CD4<sup>+</sup> Т ћелија (185). Показано је да Treg и Th17 субсетови имају супротну улогу у имунском одговору и да баланс између ова два субсета може бити веома значајан за хомеостазу, тј да поремећај односа Treg и Th17 може утицати на развоја хроничне инфламације (323).

MSCs експримирају факторе раста, цитокине и хемокине, који редукују инфламацију јетре и фиброзу, подстичући регенерацију јетре (259). У приказаној студији је најпре показано да MSCs након интравенске апликације у значајном броју мигрирају у ткиво јетре и да њихов број у јетри прогресивно расте, са понављаним апликацијама у регуларним временским интервалима (Фигура 10). Примена MSCs значајно редукује

експериментално изазвану фиброзу јетре, изазвану CCl<sub>4</sub>, што је потврђено макроскопским и микроскопским карактеристикама, где се на површини јетри мишева који су примили CCl<sub>4</sub> уочава већи број фибротично измењених нодуса, за разлику од групе мишева који су примали и MSCs, чији је макроскопски изглед јетри сличан јетрама мишева из контролних група (Слика 3), док микроскопске карактеристике јетри, као и серумске вредности трансминаза, у потпуности одговарају макроскопским разликама између ових група (Слика 4, Графикон 9, Фигура 11).

Добијени резултати ове студије показују да примена MSCs смањује број Th17 лимфоцита у јетри експерименталних животиња, чиме утиче на смањење фиброзе (Фигура 14). Смањена концентрација серумског IL-17 (Фигура 12) и број Th17 субсета у јетри (Фигура 14) је показана у експерименталној групи мишева код којих је фиброза јетре изазвана CCl<sub>4</sub> а код којих је спроведена трансплантација MSCs, као и смањена експресија фактора које продукују стелатне ћелије: колаген 1,  $\alpha$ -SMA и TGF- $\beta$  (Графикон 10).

CD4<sup>+</sup> Т који продукују IL-10, мигрирају у јетру, где супримирају хроничну инфламацију (317). Промене у заступљености CD4<sup>+</sup> Т који продукују IL-17 и CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита који продукују IL-10 могу одредити исход фиброзе јетре (207) а њихов дисбаланс у смеру повећања IL-17-продукујућих Т лимфоцита је обично удружен са развојем инфламације и прогресијом хроничног оштећења јетре (210, 324).

Резултати ове студије показују да супресија Th17 лимфоцита, посредством MSCs повећава концентрацију имunosупресивног IL-10 (Фигура 12), са повећањем процента CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита који продукују IL-10 (Фигура 15), доказујући корист MSCs у фибрози јетре изазваној CCl<sub>4</sub>, у смислу утицаја на однос између CD4<sup>+</sup> Т који продукују IL-17 и CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита који продукују IL-10.

Концентрације IL-10 у контролној, здравој популацији мишева је нижа у односу на контролну групу мишева која је примала *corn oil* или *corn oil* + MSCs, док је проценат CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита који продукују IL-10 слична између две групе. IL-10 могу продуковати CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити, алтернативно активирани макрофаги (M2 субпопулација) и MSCs, које и у одсуству фиброзе стварају овај цитокин, након стимулације факторима који повећавају стварање IL-10 у ћелијама, какво је кукурузно уље, због чега се сматра да је последица повећане концентрације IL-10 у

експерименталној групи мишева који су третирани са кукурузним уљем, последица стимулације макрофага да продукују наведени цитокин (325), и да на добијену разлику не утиче IL-10 ког стварају CD4<sup>+</sup> Т лимфоцити.

Слично дејству MSCs, апликација MSC-СМ значајно редукује фиброзу јетре (Фигура 16). У експериментално изазваној фибрози јетре, MSC-СМ, редукују број интрахепатичних Th17 лимфоцита и повећавају проценат CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита који продукују IL-10 (Фигура 20), снижавају концентрацију IL-17, а повећавају концентрацију IL-10 у серуму експерименталних животиња (Фигура 20), доказујући да MSCs, продукцијом солубилних фактора, модулишу продукцију цитокина у CD4<sup>+</sup> Т лимфоцитима и на тај начин инхибирају развој фиброзе јетре. Познато је да део трансплантираних MSCs може да се трајно задржи у оштећеној јетри где могу диферентовати у миофибробласте, чиме директно утичу на развој фиброзе (325, 326). Овај ризик од неконтролисане диференцијације трансплантираних MSCs у потпуности може бити избегнут уколико се фиброза превенира или лечи применом MSC-СМ.

MSCs редукују пролиферацију стелатних ћелија и синтезу колагена, директним контактом или продукцијом солубилних медијатора (*insulin-like growth factor binding protein-2* (IGFBP-2), *IL-1 receptor antagonist* (IL-1Ra), IL-10, TGF-β). IGFBP-2 регулише *insulin-like growth factor-1* који поседује фибринолитичку активност, док IL-1 Ra, инхибитор про-инфламацијског IL-1, IL-10 и TGF-β делују анти-инфламацијски и имуносупресивно. Уз то, HGF и NGF које, такође, продукују MSCs, подстичу апоптозу стелатних ћелија (261, 262). MSCs регулишу експресију MMPs и TIMPs и на тај начин утичу на ремодулацију оштећеног ткива јетре смањујући депоновање екстрацелуларног матрикса (262-264). На пример, MSCs подстичу експресију MMP-9, за коју је познато да учествује у редукцији фиброзе (328).

Међутим, од свих солубилних молекула, које продукују MSCs, IDO поседује најзначајнију улогу у супресији сигналног пута IL-17 (320). IDO катализује деградацију триптофана до кинуренина, терминалног продукта који индукује експресију транскрипционог фактора FoxP3 у Т лимфоцитима (181) и симултано инхибира пролиферацију ефекторских Т лимфоцита (329).

Као што је већ објашњено у претходним поглављима, у развоју фиброзе јетре, чији инфламацијски одговор усмерава поларизацију Т лимфоцита ка Th17 субпопулацији,

MSCs свој имуносупресивни ефекат остварују дејством IDO и других солубилних молекула (228).

У експерименталном моделу фиброзе јетре, заштитна, имуномодулативна улога IDO-а је тек недавно описана (320). Код мишева који су дефицијентни за IDO, показана је повећана инфилтрација ћелијама имунског система, као и повећана експресија про-инфламацијских цитокина (330). Ензим IDO блокира конверзију регулаторних Т лимфоцита у Th17 субпопулацију и стимулише регулаторне Т лимфоците који продукују IL-10 (330), а његова инхибиција или генетска делеција редукује стварање регулаторних Т лимфоцита и стимулише диференцијацију Th17, *in vitro* и *in vivo* (330).

Сходно описаном, резултати спроведеног истраживања показују да превентивна примена MSCs смањује прогресију фиброзу јетре (Слика 6, Графикон 13). Поред превентивне примене и терапијска примена MSC ефикасно је редуковала већ развијену фиброзу јетре, што је потврђено макроскопским прегледом јетри и микроскопском анализом ткивних исечака, као и упоређивањем процентуалне заступљености фиброзе јетре између ових експерименталних група (Слика 6, Графикон 13). Експресија гена за TGF- $\beta$  и  $\alpha$ -SMA је значајно нижа у експерименталној групи мишева који су примали MSCs (Графикон 14), указујући на могућност терапијске примене MSC у циљу супресије узрапредовале фиброзе јетре.

И терапијска и превентивна примена MSCs редукује фиброзу повећавајући серумски ниво IDO-а и његовог терминалног метаболита кинуренина (Фигура 13) чиме блокира конверзију Tregs у Th17 лимфоците (Фигуре 14 и 15), повећавајући број имуносупресивних Tregs, а смањујући присуство инфламацијских Th17 у јетри. Инхибиција ензима IDO комплетно блокира ефекат MSCs на Th17 лимфоците (Фигура 24) односно повећава инфилтрацију јетре Th17 лимфоцитима и подстиче прогресију фиброзе (Фигура 24). У *in vitro* експериментима, примена IDO инхибитора блокира способност MSCs за супресију Th17 лимфоцита, чиме се поново успоставља интеракција између Th17 лимфоцита и стелатних ћелија током које се посредством IL-17 стелатне ћелије стимулишу да синтетишу колаген тип 1 (Фигура 17). Такође, *in vivo* инхибиција IDO у потпуности инхибира антифиброгене ефекте MSCs (Слика 5, Фигуре 22-24), потврђујући значај активације IDO-а у MSCs за супресију Th17 лимфоцита, стелатних ћелија, односно редукацију фиброзе.

Уз то, MSC-СМ је имао исте ефекте. Примена MSC-СМ индуковала је експанзију регулаторних CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита, који се карактеришу експресијом FoxP3 и продукцијом IL-10. Овај феномен је у потпуности био супримиран применом IDO инхибитора (Фигуре 19 и 20).

Резултати ове студије показују да MSCs, посредством ензима IDO, супримирају експанзију Th17 лимфоцита и њихову инфилтрацију у фиброзно измењене јетре, редукују продукцију IL-17, доприносећи смањењу његове концентрације у серуму, затим промовишу пролиферацију CD4<sup>+</sup> Т лимфоцита који синтетишу хепатопротективни и имуномодулацијски IL-10 креирајући имуносресивну средину у којој стелатне ћелије, у одсуству стимулације IL-17 и под инхибиторним дејством IL-10, смањују продукцију колагена тип 1,  $\alpha$ -SMA и других про-фибротичних молекула, што резултира редукијом фиброзе јетре у мишевима којима су трансплантиране MSCs или MSC-СМ.



## 6. ЗАКЉУЧЦИ

Из свега претходно описаног, могу се извести следећи закључци:

### 1. MSCs редукују акутно оштећење јетре инхибицијом сигналног пута IL-17.

1.1. MSCs, паракриним механизмом, активношћу IDO-а и ослобађањем кинуренина спречавају конверзију хепатопротективних FoxP3<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> NKT ћелија у инфламацијске NKT ћелије које продукују IL-17.

1.2. Примена MSCs значајно смањује акутно оштећење јетре смањујући број и хепатотоксичност NKT ћелија које продукују IL-17, а повећавајући присуство регулаторних и имуносупресивних FoxP3<sup>+</sup> IL-10<sup>+</sup> NKT ћелија у јетри што је праћено смањењем инфламацијског цитокина IL-17, а повећањем хепатопротективног IL-10 у серуму.

### 2. Превентивна и терапијска примена MSCs значајно редукује фиброзу јетре супресијом сигналног пута IL-17.

2.1. Интравенски апликоване MSCs мигрирају у јетру где, активношћу IDO-а, спречавају конверзију имуносупресивних *Tregs* у Th17 лимфоците и на тај начин смањују концентрацију IL-17 у серуму и број интрахепатичних CD4<sup>+</sup> T лимфоцита који продукују IL-17 у јетри.

2.2. MSCs, редукујући присуство Th17 лимфоцита у јетри и супримирајући ослобађање IL-17 из њих, инхибирају продукцију колагена и осталих профиброгених молекула у стелатним ћелијама, које стелатне ћелије синтетишу и ослобађају под дејством IL-17.

2.3. И превентивна и терапијска примена MSCs значајно редукује фиброзу јетре супресијом сигналног пута IL-17.

## СКРАЋЕНИЦЕ

IL	интерлеукин ( <i>interleukin</i> )
ROS	реактивни медијатори кисеоника ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
CD	<i>cluster of differentiation</i>
IFN- $\gamma$	интерферон- $\gamma$ ( <i>interferon-<math>\gamma</math></i> )
NKT ћелије	урођеноубилачки Т лимфоцити ( <i>natural killer T cells</i> )
iNKT	инваријантни урођеноубилачки Т лимфоцити ( <i>invariant natural killer T cells</i> )
NK ћелије	урођеноубилачке ћелије ( <i>natural killer cells</i> )
GM-GCF	фактор стимулације раста моноцита и гранулоцита ( <i>Granulocyte-monocyte colony forming unit</i> )
DCs	дендритске ћелије ( <i>dendritic cells</i> )
Tregs	регулаторни Т лимфоцити ( <i>T regulatory cells</i> )
TLR	рецептор сличан Toll-у ( <i>Toll-like receptor</i> )
TNF- $\alpha$	фактор некрозе тумора- $\alpha$ ( <i>tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i> )
MHC	молекул II класе главни комплекс ткивне подударности ( <i>major histocompatibility complex</i> )
APCs	ћелије које приказују антиген ( <i>antigen-presenting cells</i> )
MMPs	матрикс металопротеиназе ( <i>matrix metalloproteinases</i> )
TIMPs	ткивни инхибитори матрикс металопротеиназа ( <i>tissue inhibitors of metalloproteinase</i> )
IGF	фактор раста сличан инсулину ( <i>insulin-like growth factor</i> )
TGF- $\beta$ 1	трансформишући фактор раста $\beta$ 1 ( <i>transforming growth factor</i> )
PDGF	фактор раста тромбоцита ( <i>platelet-derived growth factor</i> )
ATRA	транс-ретиноична киселина ( <i>All-Trans retinoic acid</i> )
HSCs	стелатне ћелије јетре ( <i>hepatic stellate cells</i> )
$\alpha$ -SMA	глаткомишићни $\alpha$ актин ( <i><math>\alpha</math> smooth muscle actin</i> )
CPA	процент заступљености колагена ( <i>collagen proportional area</i> )
MSCs	мезенхималне матичне ћелије ( <i>mesenchymal stem cells</i> ),
LIF	леукемијски фактор инхибиције ( <i>leukemia inhibitory factor</i> )
HLA-G	хумани леукоцитарни антиген G ( <i>human leukocyte antigen-G</i> )

HO-1	хем оксигеназа 1 ( <i>heme oxygenase 1</i> )
INR	( <i>international normalized ratio</i> )
PD-1	молекул програмиране смрти 1 ( <i>programmed death 1</i> )
FGL-1	протеин сличан фибробластима 1 ( <i>fibroblast like protein-1</i> )
HGF	фактор раста хепатоцита ( <i>hepatocyte growth factor</i> ),
VEGF	фактор раста ендотела ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
NGF	неурални фактор раста ( <i>nerve growth factor</i> )
$\alpha$ -GalCer	$\alpha$ -галактоцерамид
CCl <sub>4</sub>	угљен тетра хлорид
NO	азот оксид
iNOS	индуцибилна азот оксид синтаза
IDO	индоламин 2, 3 деоксигеназа
WT	<i>wild type</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
EDTA	етилен диамин тетра сирћетна киселина ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
MSC-CM	кондиционирани медијум мезенхималних матичних ћелија ( <i>MSC-conditioned medium</i> )
1-MT	1 метил триптофан ( <i>1-methyl tryptophan</i> )
HRP	<i>Streptavidin HorseRadish Peroxidase</i>
PMA	форбол 12-миристат 13-ацетатом ( <i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i> )
SEM	стандардна грешка ( <i>Standard Error/Mean</i> )

## 7. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Abdel-Misih SR, Bloomston M. Liver anatomy. *Surg Clin North Am* 2010; 90(4): 643-653.
2. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* 2014;4(1): 177-197.
3. Christ B, Dahmen U, Herrmann KH, König M, Reichenbach JR, Ricken T et al. Computational Modeling in Liver Surgery. *Front Physiol* 2017; 8:906.
4. Tseng TC, Huang LR. Immunopathogenesis of Hepatitis B Virus. *J Infect Dis* 2017; 16:(Suppl 8): 765-770.
5. Yu M, Zhu Y, Cong Q, Wu C. Metabonomics Research Progress on Liver Diseases. *Can J Gastroenterol Hepatol* 2017; 2017: 8467192.
6. Lemmers A, Moreno C, Gustot T, Maréchal R, Degré D, Demetter P et al. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009; 49(2):646-657.
7. Raj DS, Vennila JJ, Aiyavu C, Panneerselvam K. The he-patoprotective effect of alcoholic extract of *Annona squamosa* leaves on experimentally induced liver in-jury in Swiss albino mice. *Int J Int Bio* 2009; 5(3): 162-166.
8. Rane J, Jadhao R, Bakal RL. Liver diseases and herbal drugs. *JIPBS* 2016; 3(2): 24-36.
9. Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury. *Gastroenterology* 2008; 134(6): 1641-1654.
10. Boberg KM, Chapman RW, Hirschfield GM, Lohse AW, Manns MP, Schruppf E; International Autoimmune Hepatitis Group. Overlap syndromes: the International Autoimmune Hepatitis Group (IAIHG) position statement on a controversial issue. *J Hepatol* 2011; 54(2): 374-385.
11. Girotra M, Soota K, Dhaliwal AS, Abraham RR, Garcia-Saenz-de-Sicilia M, Tharian B. Utility of endoscopic ultrasound and endoscopy in diagnosis and management of hepatocellular carcinoma and its complications: What does endoscopic ultrasonography offer above and beyond conventional cross-sectional imaging? *World J Gastrointest Endosc* 2018; 10(2):56-68.
12. Favelier S, Germain T, Genson PY, Cercueil JP, Denys A, Krausé D et al. Anatomy of liver arteries for interventional radiology. *Diagn Interv Imaging* 2015; 96(6): 537-546.
13. Bugyik E, Renyi-Vamos F, Szabo V, Dezso K, Ecker N, Rokusz A et al. Mechanisms of vascularization in murine models of primary and metastatic tumor growth. *Chin J Cancer* 2016; 35:19.

14. Kumar Y, Sahoo G. Prediction of different types of liver diseases using rule based classification model. *Technol Health Care* 2013; 21(5):417-432.
15. Zhang H, Bernuzzi F, Lleo A, Ma X, Invernizzi P. Therapeutic Potential of IL-17-Mediated Signaling Pathway in Autoimmune Liver Diseases. *Mediators Inflamm* 2015; 2015: 436450.
16. Baekdal M, Ytting H and Larsen FS. Acute Liver Failure. *J Hepatol Gastroint Dis* 2016; 2:3.
17. Bernal W, Wendon J. Acute liver failure. *N Engl J Med* 2013; 369(26): 2525-2534.
18. Privitera G, Agarwal B, Jalan R. Acute liver failure: pathophysiologic basis, and the current and emerging therapies *EMJ Hepatol* 2014; 1:99-107.
19. Lee WM. Acute Liver Failure. *Semin Respir Crit Care Med.* 2012; 33:36-45.
20. Zhou W-C, Zhang Q-B, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2014; 20(23):7312-7324.
21. Sarin SK, Kedarisetty CK, Abbas Z, Amarapurkar D, Bihari C, Chan AC et al; APASL ACLF Working Party. Acute-on-chronic liver failure: consensus recommendations of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2014. *Hepatol Int* 2014; 8(4):453-71.
22. Newton JL, Jones DE. Managing systemic symptoms in chronic liver disease. *J Hepatol* 2012; 56 (Suppl 1):46-55.
23. McPherson S, Lucey MR, Moriarty KJ. Decompensated alcohol related liver disease: acute management. *BMJ* 2016; 352:i124.
24. Kantola T, Ilmakunnas M, Koivusalo AM, Isoniemi H. Bridging therapies and liver transplantation in acute liver failure, 10 years of MARS experience from Finland. *Scand J Surg* 2011; 100(1):8-13.
25. Hessheimer AJ, Nacif L, Flores Villalba E, Fondevila C. Liver transplantation for acute liver failure. *Cir Esp* 2017; 95(4):181-189.
26. Hoofnagle JH, Nelson KE, Purcell RH. Hepatitis E. *N Engl J Med* 2012; 367:1237-1244.
27. Wasley A, Fiore A, Bell BP. Hepatitis A in the era of vaccination. *Epidemiol Rev* 2006; 28:101-111.
28. Rezende G, Roque-Afonso AM, Samuel D, Gigou M, Nicand E, Ferre V et al. Viral and clinical factors associated with the fulminant course of hepatitis A infection. *Hepatology* 2003; 38:613-618.
29. Ichai P, Samuel D. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis in adults. *Liver Transpl* 2008;14:(Suppl 2):67-79.

30. Reuben A, Koch DG, Lee WM. Drug-induced acute liver failure: results of a U.S. multicenter, prospective study. *Hepatology* 2010; 52:2065-2076.
31. Biolato M, Araneo C, Marrone G, Liguori A, Miele L, Ponziani FR et al. Liver transplantation for drug-induced acute liver failure. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21(1 Suppl):37-45.
32. Craig DGN, Bates CM, Davidson JS, Martin KG, Hayes PC, Simpson KJ. Staggered overdose pattern and delay to hospital presentation are associated with adverse outcomes following paracetamol-induced hepatotoxicity. *Br J Clin Pharmacol* 2012; 73:285-294.
33. Björnsson ES. Drug-induced liver injury due to antibiotics. *Scand J Gastroenterol* 2017; 52(6-7):617-623.
34. Alempijevic T, Zec S, Milosavljevic T. Drug-induced liver injury: Do we know everything? *World J Hepatol* 2017; 9(10):491-502.
35. Fisher K, Vuppalanchi R, Saxena R. Drug-Induced Liver Injury. *Arch Pathol Lab Med*. 2015; 139(7):876-887.
36. Henrion J. Hypoxic hepatitis. *Liver Int*. 2012; 32:1039-1052.
37. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiødt FV, Larson A, Davern TJ, Han SH et al; U.S. Acute Liver Failure Study Group. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med* 2002;137(12):947-954.
38. Krawitt EL. Autoimmune hepatitis. *N Engl J Med* 2006; 354:54-66.
39. Shakil AO, Kramer D, Mazariegos GV, Fung JJ, Rakela J. Acute liver failure: clinical features, outcome analysis, and applicability of prognostic criteria. *Liver Transpl* 2000; 6(2):163-169.
40. Eefsen M, Dethloff T, Frederiksen H-J, Hauerberg J, Hansen BA, Larsen FS. Comparison of terlipressin and noradrenalin on cerebral perfusion, intracranial pressure and cerebral extracellular concentrations of lactate and pyruvate in patients with acute liver failure in need of inotropic support. *J Hepatol* 2007; 47:381-3864.
41. Desjardins P, Du T, Jiang W, Peng L, Butterworth R. Pathogenesis of hepatic encephalopathy and brain edema in acute liver failure: role of glutamine redefined. *Neurochem Int* 2012; 60:690-696.
42. Butterworth RF. Hepatic encephalopathy: a central neuroinflammatory disorder? *Hepatology* 2011; 53:1372-1376.
43. Walsh TS, Wigmore SJ, Hopton P, Richardson R, Lee A. Energy expenditure in acetaminophen-induced fulminant hepatic failure. *Crit Care Med* 2000; 28:649-654.

44. Liaskou E, Wilson DV, Oo YH. Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators Inflamm* 2012; 2012:949157.
45. Robinson MW, Harmon C, O'Farrelly C. Liver immunology and its role in inflammation and homeostasis. *Cell Mol Immunol*. 2016; 13(3):267-276.
46. Corazza N, Badmann A, Lauer C. Immune cell-mediated liver injury. *Semin Immunopathol* 2009; 31(2):267-277.
47. Galani IE, Andreakos E. Neutrophils in viral infections: Current concepts and caveats. *J Leukoc Biol* 2015; 98(4):557-64.
48. Bajt ML, Farhood A, Jaeschke H. Effects of CXC chemokines on neutrophil activation and sequestration in hepatic vasculature. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 281(5):G1188–G1195.
49. Lim JJ, Grinstein S, Roth Z. Diversity and Versatility of Phagocytosis: Roles in Innate Immunity, Tissue Remodeling, and Homeostasis. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7:191.
50. Yamashiro S, Kamohara H, Wang JM, Yang D, Gong WH, Yoshimura T. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J Leukoc Biol* 2001; 69(5):698–704.
51. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol* 2004; 75(1):39–48.
52. Levy O. Antimicrobial proteins and peptides: anti-infective molecules of mammalian leukocytes. *J Leukoc Biol* 2004; 76(5): 909–925.
53. Selsted ME, Ouellette AJ. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature Immunology* 2005; 6 (6): 551–557.
54. Kennedy AD, Deleo FR. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res* 2009; 43(1–3):25–61.
55. Bonder CS, Ajuebor MN, Zbytnuik LD, Kubes P, Swain MG. Essential role for neutrophil recruitment to the liver in concanavalin A-induced hepatitis. *J Immunol* 2004; 172(1): 45–53.
56. Jaeschke H. Neutrophil-mediated tissue injury in alcoholic hepatitis. *Alcohol* 2002; 27(1): 23–27.
57. Czepielewski RS, Jaeger N, Marques PE, Antunes MM, Rigo MM, Alvarenga DM et al. GRPR antagonist protects from drug-induced liver injury by impairing neutrophil chemotaxis and motility. *Eur J Immunol* 2017; 47(4): 646-657.
58. Gujral JS, Farhood A, Jaeschke H. Oncotic necrosis and caspase-dependent apoptosis during galactosamine-induced liver injury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 190(1):37–46.

59. Puengel T, Krenkel O, Kohlhepp M, Lefebvre E, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Differential impact of the dual CCR2/CCR5 inhibitor cenicriviroc on migration of monocyte and lymphocyte subsets in acute liver injury. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184694.
60. Jakubzick CV, Randolph GJ, Henson PM. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol* 2017 Jun; 17(6):349-362.
61. Imhof BA, Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nat Rev Immunol* 2004; 4(6):432–444.
62. Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol* 2017; 17(5):306-321.
63. Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* 2006; 26(10):1175–1186.
64. Morita A, Itoh Y, Toyama T, Fujii H, Nishioji K, Kirishima T, Makiyama A, Yamauchi N, Okanoue T. Activated Kupffer cells play an important role in intra-hepatic Th1-associated necro-inflammation in Concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatol Res* 2003; 27(2):143–150.
65. Alvarenga DM, Mattos MS, Araújo AM, Antunes MM, Menezes GB. Neutrophil biology within hepatic environment. *Cell Tissue Res* 2018; 371(3):589-598.
66. Ju C, Tacke F. Hepatic macrophages in homeostasis and liver diseases: from pathogenesis to novel therapeutic strategies. *Cell Mol Immunol* 2016;13(3):316-27.
67. Heymann F, Peusquens J, Ludwig-Portugall I, Kohlhepp M, Ergen C, Niemietz P et al. Liver inflammation abrogates immunological tolerance induced by Kupffer cells. *Hepatology* 2015; 62:279–291.
68. Xu L, Yin W, Sun R, Wei H, Tian Z. Kupffer cell-derived IL-10 plays a key role in maintaining humoral immune tolerance in hepatitis B virus-persistent mice. *Hepatology* 2014; 59(2):443-52.
69. Abraham SN, John ALS. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. *Nat Rev Immunol* 2010; 10(6):440–452.
70. Jarido V, Kennedy L, Hargrove L, Demieville J, Thomson J, Stephenson K et al. The emerging role of mast cells in liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2017; 313(2):G89-G101.
71. Francis H, Meininger CJ. A review of mast cells and liver disease: what have we learned? *Dig Liver Dis* 2010; 42(8):529–536.



72. Ishii M, Iwai M, Harada Y, Morikawa T, Okanoue T, Kishikawa T, Tsuchihashi Y, Hanai K, Arizono N. A role of mast cells for hepatic fibrosis in primary sclerosing cholangitis. *Hepatol Res* 2005;31(3):127-131.
73. Francis H, Alpini G, DeMorrow S. Recent advances in the regulation of cholangiocarcinoma growth. *Am J Physiol Physiol* 2010; 299(1):G1–G9.
74. Hida S, Tadachi M, Saito T, Taki S. Negative control of basophil expansion by IRF-2 critical for the regulation of Th1/Th2 balance. *Blood* 2005; 106(6):2011–2017.
75. Kim S, Prout M, Ramshaw H, Lopez AF, LeGros G, Min B. Cutting edge: basophils are transiently recruited into the draining lymph nodes during helminth infection via IL-3, but infection-induced Th2 immunity can develop without basophil lymph node recruitment or IL-3. *J Immunol* 2010; 184 (3):1143–1147.
76. Kouroumalis E, Notas G. Primary biliary cirrhosis: From bench to bedside. *World J Gastrointest Pharmacol Ther* 2015; 6(3):32-58.
77. Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity. *The New Eng J of Med* 2006; 354 (7):731–739.
78. Landi A, Weismuller TJ, Lankisch TO, Santer DM, Tyrrell DL, Manns MP et al. Differential serum levels of eosinophilic eotaxins in primary sclerosing cholangitis, primary biliary cirrhosis, and autoimmune hepatitis. *J Interferon Cytokine Res* 2014;34(3):204-214.
79. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:189–220.
80. Caligiuri M. A. Human natural killer cells. *Blood* 2008; 112(3):461–469.
81. Hokeness KL, Kuziel WA, Biron CA, Salazar-Mather TP. Monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 interactions are required for IFN- $\alpha/\beta$ -induced inflammatory responses and antiviral defense in liver. *Cell Mol Immunol* 2005; 174(3):1549–1556.
82. Guidotti LG, Iannacone M. Effector CD8 T cell trafficking within the liver. *Mol Immunol* 2013; 55(1):94-99.
83. Moreno-Cubero E, Larrubia JR. Specific CD8(+) T cell response immunotherapy for hepatocellular carcinoma and viral hepatitis. *World J Gastroenterol* 2016; 22(28):6469-6483.
84. Smyk-Pearson S, Tester IA, Klarquist J, Palmer BE, Pawlowsky JM, Golden-Mason L et al. Spontaneous recovery in acute human hepatitis C virus infection: functional T-cell thresholds and relative importance of CD4 help. *J Virol* 2008; 82:1827–1837.

85. Webster GJ, Reignat S, Maini MK, Whalley SA, Ogg GS, King A et al. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 2000; 32:1117–1124.
86. Iannacone M. Hepatic effector CD8+ T-cell dynamics. *Cell Mol Immunol* 2015; 12(3):269-272.
87. Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: Insights from transgenic knockout models. *World J Gastroenterol: WJG* 2013; 19(11):1683-1698.
88. Chang KM. Regulatory T cells and the liver: a new piece of the puzzle. *Hepatology* 2005; 41:700-702.
89. Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, Gotto J, Williams R, Maini MK et al. Modulation of the CD8+-T-cell response by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005; 79(6):3322-3228.
90. Wu Z, Han M, Chen T, Yan W, Ning Q. Acute liver failure: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Liver Int* 2010; 30(6): 782-794.
91. Wei HX, Chuang YH, Li B, Wei H, Sun R, Moritoki Y, Gershwin ME, Lian ZX, Tian Z. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells protect against T cell-mediated fulminant hepatitis in a TGF-beta-dependent manner in mice. *J Immunol* 2008 ;181(10):7221-7229.
92. Wang X, Ning Q. Immune mediated liver failure. *EXCLI Journal* 2014; 13:1131-1144.
93. Viale R, Ware R, Maricic I, Chaturvedi V, Kumar V. NKT Cell Subsets Can Exert Opposing Effects in Autoimmunity, Tumor Surveillance and Inflammation. *Curr Immunol Rev* 2012; 8(4):287-296.
94. Chen J, Wei Y, He J, Cui G, Zhu Y, Lu C et al. Natural killer T cells play a necessary role in modulating of immune-mediated liver injury by gut microbiota. *Sci Rep* 2014; 4:7259.
95. Kumar V. NKT-cell subsets: promoters and protectors in inflammatory liver disease. *J Hepatol* 2013; 59(3):618-620.
96. Ridgway WM, Gershwin ME. Prometheus unbound: NKT cells inhibit hepatic regeneration. *Hepatology* 2014; 60:1133-1135.
97. Spada FM, Koezuka Y, Porcelli SA. CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J Exp Med* 1998; 188(8): 1529-1534.
98. Brossay L, Jullien D, Cardell S, Sydora BC, Burdin N, Modlin RL et al. Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells. *J Immunol* 1997; 159(3): 1216-1224.

99. Arrenberg P, Halder R, Kumar V. Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *J Cell Physiol* 2009; 218(2):246-250.
100. Liao CM, Zimmer MI, Wang CR. The functions of type I and type II natural killer T cells in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2013; 19:1330-1338.
101. Matsuda JL, Naidenko OV, Gapin L, Nakayama T, Taniguchi M, Wang CR. Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* 2000; 192(5):741-754.
102. Benlagha K, Weiss A, Beavis A, Teyton L, Bendelac A. In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *J Exp Med* 2000; 191(11):1895-1903.
103. Lynch L, Michelet X, Zhang S, Brennan PJ, Moseman A, Lester C et al. Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. *Nat Immunol* 2015; 16(1):85-95.
104. Yu KOA, Porcelli SA. The diverse functions of CD1d-restricted NKT cells and their potential for immunotherapy. *Immunol Lett* 2005; 100:42-55.
105. Pellicci DG, Patel O, Kjer-Nielsen L, Pang SS, Sullivan LC, Kyparissoudis K et al. Differential recognition of CD1d-alpha-galactosyl ceramide by the V beta 8.2 and V beta 7 semi-invariant NKT T cell receptors. *Immunity* 2009; 31(1):47-59.
106. Halder RC, Aguilera C, Maricic I, Kumar V. Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT cells prevents inflammatory liver disease. *J Clin Invest* 2007; 117:2302-2312.
107. Arrenberg P, Halder R, Dai Y, Maricic I, Kumar V. Oligoclonality and innate-like features in the TCR repertoire of type II NKT cells reactive to a beta-linked self-glycolipid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(24):10984-10989.
108. Chun T, Page MJ, Gapin L, Matsuda JL, Xu H, Nguyen H et al. CD1d-expressing Dendritic Cells but Not Thymic Epithelial Cells Can Mediate Negative Selection of NKT Cells. *J Exp Med* 2003; 197:907-918.
109. Van Kaer L, Parekh V, Wu L. Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity. *Cell Tissue Res* 2011; 343:43-55.
110. Darmoise A, Teneberg S, Bouzonville L, Brady RO, Beck M, Kaufmann SH et al. Lysosomal  $\alpha$ -Galactosidase Controls the Generation of Self Lipid Antigens for Natural Killer T Cells. *Immunity* 2010; 33:216-228.

111. Cerundolo V, Silk JD, Masri SH, Salio M. Harnessing invariant NKT cells in vaccination strategies. *Nat Rev Immunol* 2009; 9:28-38.
112. Girardi E, Zajonc DM. Molecular basis of lipid antigen presentation by CD1d and recognition by natural killer T cells. *Immunol Rev* 2012; 250:167-179.
113. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:297-336.
114. Berzins SP, Smyth MJ, Baxter AG. Presumed guilty: natural killer T cell defects and human disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11:131-142.
115. Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol* 2013; 13:101.
116. Swain MG. Hepatic NKT cells: friend or foe? *Clin Sci (Lond)* 2008; 114: 457-466.
117. Swain MG. Natural Killer T Cells within the Liver: Conductors of the Hepatic Immune Orchestra. *Dig Dis Sci* 2010; 28:7-13.
118. Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000; 192:921-930.
119. Adler M, Taylor S, Okebugwu K, Yee H, Fielding C, Fielding G et al. Intrahepatic natural killer T cell populations are increased in human hepatic steatosis. *World J Gastroenterol* 2011; 17:1725-1731.
120. Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol* 2007;19(3):354-64.
121. Zimmerman MA, Martin A, Yee J, Schiller J, Hong JC. Natural Killer T Cells in Liver Ischemia–Reperfusion Injury. *J Clin Med* 2017; 6(4):41.
122. Wallace KL, Marshall MA, Ramos SI, Lannigan JA, Field JJ, Strieter RM et al. NKT cells mediate pulmonary inflammation and dysfunction in murine sickle cell disease through production of IFN-gamma and CXCR3 chemokines. *Blood* 2009; 114(3):667-76.
123. Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(10):5498-5503.
124. Schrumph E, Tan C, Karlsen TH, Sponheim J, Björkström NK, Sundnes O et al. The biliary epithelium presents antigens to and activates natural killer T cells. *Hepatology* 2015; 62(4):1249-1259.
125. Bandyopadhyay K, Marrero I, Kumar V. NKT cell subsets as key participants in liver physiology and pathology. *Cell Mol Immunol* 2016; 13(3):337-346.

126. Li J, Zhu X, Liu F, Cai P, Sanders C, Lee WM, Uetrecht J. Cytokine and autoantibody patterns in acute liver failure. *J Immunotoxicol* 2010;7(3):157-64.
127. Wasmuth HE, Kunz D, Yagmur E, Timmer-Stranghöner A, Vidacek D, Siewert E et al. Patients with acute on chronic liver failure display "sepsis-like" immune paralysis. *J Hepatol* 2005; 42(2):195-201.
128. Nagaki M, Iwai H, Naiki T, Ohnishi H, Muto Y, Moriwaki H. High levels of serum interleukin-10 and tumor necrosis factor-alpha are associated with fatality in fulminant hepatitis. *J Infect Dis* 2000; 182(4):1103-1108.
129. Lian LH, Jin X, Wu YL, Cai XF, Lee JJ, Nan JX. Hepatoprotective effects of *Sedum sarmentosum* on D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced murine fulminant hepatic failure. *J Pharmacol Sci* 2010; 114(2):147-157.
130. Tokushige K, Yamaguchi N, Ikeda I, Hashimoto E, Yamauchi K, Hayashi N. Significance of soluble TNF receptor-I in acute-type fulminant hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(8):2040-2046.
131. Shimizu Y, Margenthaler JA, Landeros K, Otomo N, Doherty G, Flye MW. The resistance of P. acnes--primed interferon gamma-deficient mice to low-dose lipopolysaccharide-induced acute liver injury. *Hepatology* 2002; 35(4):805-814.
132. Nicoletti F, Zaccone P, Xiang M, Magro G, Di Mauro M, Di Marco R et al. Essential pathogenetic role for interferon (IFN-) $\gamma$  in concanavalin A-induced T cell-dependent hepatitis: exacerbation by exogenous IFN- $\gamma$  and prevention by IFN- $\gamma$  receptor-immunoglobulin fusion protein. *Cytokine* 2000; 12(4):315-323.
133. Jin X, Zimmers TA, Perez EA, Pierce RH, Zhang Z, Koniaris LG. Paradoxical effects of short-and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair. *Hepatology* 2006; 43:474-484.
134. Kovalovich K, Li W, DeAngelis R, Greenbaum LE, Ciliberto G, Taub R. Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL. *J Biol Chem* 2001;276(28):26605-13.
135. Klein C, Wüstefeld T, Assmus U, Roskams T, Rose-John S, Müller M et al. The IL-6-gp130-STAT3 pathway in hepatocytes triggers liver protection in T cell-mediated liver injury. *J Clin Invest* 2005; 115:860–869.
136. Berry PA, Antoniadis CG, Hussain MJ, McPhail MJ, Bernal W, Vergani D et al. Admission levels and early changes in serum interleukin-10 are predictive of poor outcome in acute liver failure and decompensated cirrhosis. *Liver Int* 2010; 30:733–740.

137. Song Y, Yang JM. Role of interleukin (IL)-17 and T-helper (Th)17 cells in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 493(1):1-8.
138. Coquet JM, Chakravarti S, Kyparissoudis K, McNab FW, Pitt LA, McKenzie BS, Berzins SP, Smyth MJ, Godfrey DI. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(32):11287-11292.
139. Shen F, Gaffen SL. Structure-function relationships in the IL-17 receptor: implications for signal transduction and therapy. *Cytokine* 2008; 41(2):92-104.
140. Gu C, Wu L, Li X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. *Cytokine* 2013; 64(2):477-485.
141. Eljaafari A, Robert M, Chehimi M, Chanon S, Durand C, Vial G et al. Adipose Tissue-Derived Stem Cells From Obese Subjects Contribute to Inflammation and Reduced Insulin Response in Adipocytes Through Differential Regulation of the Th1/Th17 Balance and Monocyte Activation. *Diabetes* 2015; 64(7):2477-2488.
142. Cho ML, Kang JW, Moon YM, Nam HJ, Jhun JY, Heo SB et al. STAT3 and NF-kappaB signal pathway is required for IL-23-mediated IL-17 production in spontaneous arthritis animal model IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *J Immunol* 2006; 176(9):5652-5661.
143. Lafdil F, Miller AM, Ki SH, Gao B. Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases. *Cell Mol Immunol* 2010; 7(4):250–254.
144. Ye Y, Xie X, Yu J, Zhou L, Xie H, Jiang G et al. Involvement of Th17 and Th1 effector responses in patients with Hepatitis B. *J Clin Immunol* 2010; 30:546–555.
145. Furuya S, Kono H, Hara M, Hirayama K, Sun C, Fujii H. Interleukin 17A plays a role in lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced fulminant hepatic injury in mice. *J Surg Res* 2015; 199:487-493.
146. Yan S, Wang L, Liu N, Wang Y, Chu Y. Critical role of interleukin-17/interleukin-17 receptor axis in mediating Con A-induced hepatitis. *Immunol Cell Biol* 2012; 90:421-428.
147. You Q, Cheng L, Reilly TP, Wegmann D, Ju C. Role of neutrophils in a mouse model of halothane-induced liver injury. *Hepatology* 2006; 44(6):1421–1431.
148. Puel A, Döffinger R, Natividad A, Chrabieh M, Barcenás-Morales G, Picard C et al. Autoantibodies against IL-17A, IL-17F, and IL-22 in patients with chronic mucocutaneous candidiasis and autoimmune polyendocrine syndrome type I. *J Exp Med* 2010;207(2):291-7.

149. Rowan AG, Fletcher JM, Ryan EJ, Moran B, Hegarty JE, O'Farrelly C et al. Hepatitis C virus-specific Th17 cells are suppressed by virus-induced TGF-beta. *J Immunol* 2008; 181(7): 4485-4494.
150. Zhang JY, Zhang Z, Lin F, Zou ZS, Xu RN, Jin L, Fu JL, Shi F, Shi M, Wang HF, Wang FS. Interleukin-17-producing CD4(+) T cells increase with severity of liver damage in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2010;51(1):81-91.
151. Wondimu Z, Santodomingo-Garzon T, Le T, Swain MG. Protective role of interleukin-17 in murine NKT cell-driven acute experimental hepatitis. *Am J Pathol* 2010; 177(5): 2334-2346.
152. European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J Hepatol* 2012; 56(3): 671-685.
153. Schuppan D, Afdhal NH. Liver cirrhosis. *Lancet* 2008; 371(9615): 838-851.
154. Bunchorntavakul C, Reddy KR. Acute Liver Failure. *Clin Liver Dis* 2017; 21(4):769-792.
155. Volarevic V, Nurkovic J, Arsenijevic N, Stojkovic M. Concise review: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis. *Stem Cells* 2014; 32(11):2818-2823.
156. Brenner C, Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Decoding cell death signals in liver inflammation. *J Hepatol* 2013; 59(3):583-594.
157. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005; 115(2):209–218.
158. Novo E, Cannito S, Paternostro C, Bocca C, Miglietta A, Parola M. Cellular and molecular mechanisms in liver fibrogenesis. *Arch Biochem Biophys* 2014; 548:20-37.
159. Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol* 2014; 14(3):181-194.
160. Nallagangula KS, Nagaraj SK, Venkataswamy L, Chandrappa M. Liver fibrosis: a compilation on the biomarkers status and their significance during disease progression. *Future Sci OA* 2017; 4(1):FSO250.
161. Poilil Surendran S, George Thomas R, Moon MJ, Jeong YY. Nanoparticles for the treatment of liver fibrosis. *Int J Nanomedicine* 2017; 12:6997–7006.
162. Pinzani M. Liver fibrosis. *Semin Immunopathol* 1999; 21(4):475-90.
163. Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible? *Gut* 2000; 46(4):443-6.
164. Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(2):G245-9.

165. Ebrahimi H, Naderian M, Sohrabpour AA. New Concepts on Pathogenesis and Diagnosis of Liver Fibrosis. *Middle East J Dig Dis* 2016; 8(3):166–178.
166. Friedman, Scott L. Liver fibrosis - from bench to bedside. *J Hepatol* 2003; 38(Suppl 1):38–53.
167. Deng H, Qi X, Peng Y, Li J, Li H, Zhang Y et al. Diagnostic Accuracy of APRI, AAR, FIB-4, FI, and King Scores for Diagnosis of Esophageal Varices in Liver Cirrhosis: A Retrospective Study. *Med Sci Monit* 2015; 21:3961-77.
168. El-Serag HB, Mason AC. Risk factors for the rising rates of primary liver cancer in the United States. *Arch Intern Med* 2000; 160:3227–3230.
169. Hernaez R, Solà E, Moreau R, Ginès P. Acute-on-chronic liver failure: an update. *Gut* 2017; 66(3):541-553.
170. Xu R, Zhang Z, Wang F-S. Liver fibrosis: mechanisms of immune-mediated liver injury. *Cell Mol Immunol* 2012;9(4):296-301.
171. Jenne CN, Kubes P. Immune surveillance by the liver. *Nat Immunol* 2013; 14: 996–1006.
172. Pradere JP, Kluwe J, De MS, Jiao JJ, Gwak GY, Dapito DH et al. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology* 2013; 58: 1461–1473.
173. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 2005; 115:56–65.
174. Rivera CA, Bradford BU, Hunt KJ, Adachi Y, Schrum LW, Koop DR et al. Attenuation of CCl<sub>4</sub>-induced hepatic fibrosis by GdCl<sub>3</sub> treatment or dietary glycine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002; 281:G200–G207.
175. Taimr P, Higuchi H, Kocova E, Rippe RA, Friedman S, Gores GJ. Activated stellate cells express the TRAIL receptor-2/death receptor-5 and undergo TRAIL-mediated apoptosis. *Hepatology* 2003; 37:87–95.
176. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell* 2008; 134:657–667.
177. Radaeva S, Sun R, Jaruga B, Nguyen VT, Tian Z, Gao B. Natural killer cells ameliorate liver fibrosis by killing activated stellate cells in NKG2D - dependent and tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-dependent manners. *Gastroenterology* 2006; 130:435–452.



178. Bonecchi R, Facchetti F, Dusi S, Luini W, Lissandrini D, Simmelink M et al. Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *J Immunol* 2000; 164:3862–3869.
179. de Lalla C, Galli G, Aldrighetti L, Romeo R, Mariani M, Monno A et al. Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis progression in chronic viral hepatitis. *J Immunol* 2004; 117:3417–3425.
180. Oo YH, Weston CJ, Lalor PF, Curbishley SM, Withers DR, Reynolds GM. Distinct roles for CCR4 and CXCR3 in the recruitment and positioning of regulatory T cells in the inflamed human liver. *J Immunol* 2010; 184(6):2886-2898.
181. Jeffery HC, Braitch MK, Brown S, Oo YH. Clinical Potential of Regulatory T Cell Therapy in Liver Diseases: An Overview and Current Perspectives. *Front Immunol* 2016; 7:334.
182. Lu L, Lan Q, Li Z, Zhou X, Gu J, Li Q et al. Critical role of all-trans retinoic acid in stabilizing human natural regulatory T cells under inflammatory conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(33):E3432-40.
183. Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science* 2007; 317(5835):256-260.
184. Mucida D, Pino-Lagos K, Kim G, Nowak E, Benson MJ, Kronenberg M et al. Retinoic acid can directly promote TGF-beta-mediated Foxp3(+) Treg cell conversion of naive T cells. *Immunity* 2009; 30(4):471-2; author reply 472-3.
185. Abe M, Hiasa Y, Onji M. T Helper 17 Cells in Autoimmune Liver Diseases. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013:607073.
186. Hammerich L, Heymann F, Tacke F. Role of IL-17 and Th17 Cells in Liver Diseases. *Clin Dev Immunol* 2011; 2011:345803.
187. Dong C. Regulation and pro-inflammatory function of interleukin-17 family cytokines. *Immunol Rev* 2008; 226(1):80–86.
188. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007;8(9):950-7.
189. Acosta-Rodriguez E V, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007; 8(9):942–949.

190. Parola M, Marra F, Pinzani M. Myofibroblast - like cells and liver fibrogenesis: Emerging concepts in a rapidly moving scenario. *Mol Aspects Med* 2008; 29(1-2): 58-66.
191. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017; 14(7):397-411.
192. Waisako K, Jiang C, Zhang M, Cong M, Moore-Morris TJ, Park TJ et al. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(32): 3297-3330.
193. Lindquist JN, Marzluft WF, Stefanovic B. Fibrogenesis III. Posttranscriptional regulation of type I collagen. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(3):G471-476.
194. Casini A, Ceni E, Salzano R, Biondi P, Parola M, Galli A et al. Neutrophil-derived superoxide anion induces lipid peroxidation and stimulates collagen synthesis in human hepatic stellate cells: role of nitric oxide. *Hepatology* 1997; 25(2): 361-367.
195. Viñas O, Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Berenguer C, Enrich C et al. Human hepatic stellate cells show features of antigen-presenting cells and stimulate lymphocyte proliferation. *Hepatology* 2003; 38(4):919-929.
196. Maher JJ. Interactions between hepatic stellate cells and the immune system. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3):417-426.
197. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006; 10(1):76-99.
198. Sugimoto R, Enjoji M, Nakamuta M, Ohta S, Kohjima M, Fukushima M et al. Effect of IL-4 and IL-13 on collagen production in cultured LI90 human hepatic stellate cells. *Liver Int* 2005; 25(2):420-428.
199. Shimamura T, Fujisawa T, Husain SR, Kioi M, Nakajima A, Puri RK. Novel role of IL-13 in fibrosis induced by nonalcoholic steatohepatitis and its amelioration by IL-13R-directed cytotoxin in a rat model. *J Immunol* 2008; 181: 4656-4665.
200. Hammerich L, Tacke F. Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from experimental mouse models. *Clin Exp Gastroenterol* 2014; 7: 297-306.
201. Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Uitto J. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest* 1994; 94:2489-2492.
202. Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7:793-807.

203. Louis H, Van Laethem JL, Wu W, Quertinmont E, Degraef C, Van den Berg K et al. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. *Hepatology* 1998; 28(6): 1607-1615.
204. Shek FW, Benyon RC. How can transforming growth factor beta be targeted usefully to combat liver fibrosis? *Eur J Gastroentero Hepatol* 2004; 16:123-126.
205. Meng F, Wang K, Aoyama T, Grivennikov SI, Paik Y, Scholten D et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 2012; 143(3): 765-766.
206. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007; 26(3): 371-381.
207. Sun XF, Gu L, Deng WS, Xu Q. Impaired balance of T helper 17/T regulatory cells in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *World J Gastroenterol* 2014; 20:2062.
208. Tan Z, Qian X, Jiang R, Liu Q, Wang Y, Chen C et al. IL-17 A plays a critical role in the pathogenesis of liver fibrosis through hepatic stellate cell activation. *J Immunol* 2013; 191(4):1835-1844.
209. Tang Y, Bian Z, Zhao L, Liu Y, Liang S, Wang Q et al. Interleukin-17 exacerbates hepatic steatosis and inflammation in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Exp Immunol* 2011; 166(2): 281-290.
210. Shen X, Peng Y, Li H. The Injury-Related Activation of Hedgehog Signaling Pathway Modulates the Repair-Associated Inflammation in Liver Fibrosis. *Front Immunol* 2017; 8: 1450.
211. Bravo AA, Sheth SG, Chopra S. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001; 344(7): 495-500.
212. Afdhal NH, Nunes D. Evaluation of liver fibrosis: a concise review. *Am J Gastroenterol* 2004; 99(6):1160-1674.
213. Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seeff LB. American Association for the Study of Liver Diseases. Diagnosis, management and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology* 2009; 49:1335-1374.
214. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis. *J Hepatol* 1995; 22(6): 696-699.
215. Giannakeas N, Tsiouras MG, Tzallas AT, Kyriakidi K, Tsianou ZE, Manousou P et al. A clustering based method for collagen proportional area extraction in liver biopsy images. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 2015; 2015: 3097-3100.

216. D'Ambrosio R, Aghemo A, Rumi MG, Ronchi G, Donato MF, Paradis V et al. A morphometric and immunohistochemical study to assess the benefit of a sustained virological response in hepatitis C virus patients with cirrhosis. *Hepatology* 2012; 56(2): 532-543.
217. Neuman MG, Cohen LB, Nanau RM. Hyaluronic acid as a non-invasive biomarker of liver fibrosis. *Clin Biochem* 2016; 49(3): 302-315.
218. Walsh KM, Timms P, Campbell S, MacSween RN, Morris AJ. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and tissue inhibitors of metalloproteinases -1 and -2 (TIMP-1 and TIMP-2) as noninvasive markers of liver disease in chronic hepatitis C: comparison using ROC analysis. *Dig Dis Sci* 1999; 44(3): 624-630.
219. Rosso C, Caviglia GP, Abate ML, Vanni E, Mezzabotta L, Touscoz GA et al. Cytokeratin 18-Aspartate<sup>396</sup> apoptotic fragment for fibrosis detection in patients with non-alcoholic fatty liver disease and chronic viral hepatitis. *Dig Liver Dis* 2016; 48(1): 55-61.
220. Wai CT, Greenon JK, Fontana RJ, Kalbfleisch JD, Marrero JA, Conjeevaram HS et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38(2):518-526.
221. Bataller R, Brenner DA. Hepatic stellate cells as a target for the treatment of liver fibrosis. *Semin Liver Dis* 2001; 21(3):437-451.
222. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; 25:2739-2749.
223. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8:315-317.
224. Volarevic V, Al-Qahtani A, Arsenijevic N, Pajovic S, Lukic ML. Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) and IL-1Ra producing mesenchymal stem cells as modulators of diabetogenesis. *Autoimmunity* 2010; 43:255-263.
225. Gazdic M, Volarevic V, Arsenijevic N, Stojkovic M. Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem Cell Rev* 2015; 11(2):280-287.
226. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R et al. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 2005; 35(5):1482-1490.
227. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 2013; 13(4):392-402.

228. Raffaghello L, Bianchi G, Bertolotto M, Montecucco F, Busca A, Dallegri F et al. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem Cells* 2008; 26(1):151–162.
229. Cassatella MA, Mosna F, Micheletti A, Lisi V, Tamassia N, Cont C et al. Toll-like receptor-3-activated human mesenchymal stromal cells significantly prolong the survival and function of neutrophils. *Stem Cells* 2011; 29(6):1001-1011.
230. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009; 15(1):42-49.
231. Nauta AJ, Fibbe EW. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 2007; 110(10): 3499-3506.
232. Nasef A, Chapel A, Mazurier C, Bouchet S, Lopez M, Mathieu N et al. Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells. *Gene Expr* 2007; 13(4-5):217-226.
233. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Ex Cell Res* 2005; 305(1):33–41.
234. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005; 105(4):1815–1822.
235. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002; 99(10):3838–3843.
236. Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'huillie A et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 2009; 27(8): 1954-1962.
237. Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T et al. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 2007; 109(1):228–234.
238. Shi Y, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol* 2012; 33(3):136-143.
239. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004; 103(12):4619–4621.

240. Ling W, Zhang J, Yuan Z, Ren G, Zhang L, Chen X et al. Mesenchymal stem cells use IDO to regulate immunity in tumor microenvironment. *Cancer Res* 2014; 74(5):1576-1587.
241. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 2006; 24(1):74–85.
242. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; 24(6):386–398.
243. Prigione I, Benvenuto F, Bocca P, Battistini L, Uccelli A, Pistoia V. Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and gammadelta T cells or invariant natural killer T cells. *Stem Cells* 2009; 27(3):693-702.
244. Gazdic M, Simovic Markovic B, Vucicevic L, Nikolic T, Djonov V et al. Mesenchymal stem cells protect from acute liver injury by attenuating hepatotoxicity of liver NKT cells in iNOS and IDO dependent manner. *J Tissue Eng Regen Med* 2018; 12(2):e1173-e1185.
245. Guo Y, Chen B, Chen LJ, Zhang CF, Xiang C. Current status and future prospects of mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *J Zhejiang Univ Sci B* 2016; 17(11): 831-841.
246. Lou G, Chen Z, Zheng M, Liu Y. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a new therapeutic strategy for liver diseases. *Exp Mol Med* 2017; 49(6):e346.
247. van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology* 2008; 47(5):1634–1643.
248. Xagorari A, Siotou E, Yiangou M, Tsolaki E, Bougiouklis D, Sakkas L et al. Protective effect of mesenchymal stem cell conditioned medium on hepatic cell apoptosis after acute liver injury. *Int J Clin Exp Pathol* 2013; 6(5): 831-840.
249. Kubo N, Narumi S, Kijima H, Mizukami H, Yagihashi S, Hakamada K et al. Efficacy of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells for fulminant hepatitis in mice induced by concanavalin A. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27(1):165-172.
250. Zhu X, He B, Zhou X, Ren J. Effects of transplanted bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in animal models of acute hepatitis. *Cell Tissue Res* 2013; 351(3): 477–486.
251. Sun K, Xie X, Xie J, Jiao S, Chen X, Zhao X et al. Cell-based therapy for acute and chronic liver failures: distinct diseases, different choices. *Sci Rep* 2014; 4:6494.

252. Eom YW, Shim KY, Baik SK. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis. *Korean J Intern Med* 2015; 30(5):580-589.
253. Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion* 2014; 54(5):1418-1437.
254. Najjar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, De Bruyn C, Bron D, Toungouz M et al. Immune-related antigens, surface molecules and regulatory factors in human-derived mesenchymal stromal cells: the expression and impact of inflammatory priming. *Stem Cell Rev* 2012; 8(4):1188-1898.
255. Haddad R, Saldanha-Araujo F. Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: what do we know so far? *Biomed Res Int* 2014; 2014:216806.
256. Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2007; 2(9):e941.
257. Castro-Manrreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res* 2015; 2015:394917.
258. Kupcova Skalnikova H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie* 2013; 95(12):2196-2211.
259. Usunier B, Benderitter M, Tamarat R, Chapel A. Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough. *Stem Cells Int* 2014; 2014:340257.
260. Parekkadan B, van Poll D, Megeed Z, Kobayashi N, Tilles AW, Berthiaume F et al. Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363(2):247-252.
261. Lin N, Hu K, Chen S, Xie S, Tang Z, Lin J et al. Nerve growth factor-mediated paracrine regulation of hepatic stellate cells by multipotent mesenchymal stromal cells. *Life Sci* 2009; 85(7-8):291-295.
262. Semedo P, Correa-Costa M, Antonio Cenedeze M, Maria Avancini Costa Malheiros D, Antonia dos Reis M, Shimizu MH et al. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem Cells* 2009; 27(12):3063-3073.
263. Rabani V, Shahsavani M, Gharavi M, Piryaee A, Azhdari Z, Baharvand H. Mesenchymal stem cell infusion therapy in a carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model affects matrix metalloproteinase expression. *Cell Biol Int* 2010; 34(6): 601-605.

264. Wu Y, Huang S, Enhe J, Ma K, Yang S, Sun T et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell attenuates skin fibrosis development in mice. *Int Wound J* 2014; 11(6): 701-710.
265. Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure. *Int J Exp Pathol* 2000;81(2):145-157.
266. Ryska M, Kieslichová E, Pantoflíček T, Ryska O, Zazula R, Skibová J et al. Devascularization surgical model of acute liver failure in minipigs. *Eur Surg Res* 2004; 36(3):179-184.
267. Frühauf NR, Oldhafer KJ, Westermann S, Sotiropoulos GC, Kaiser GM. Acute hepatic failure in swine: hepatectomy versus vascular occlusion. *J Invest Surg* 2004; 17(3):163-71.
268. Wan XL, Lu YF, Xu SF, Wu Q, Liu J. Oleanolic acid protects against the hepatotoxicity of D-galactosamine plus endotoxin in mice. *Biomed Pharmacother* 2017; 93:1040-1046.
269. Wang HX, Liu M, Weng SY, Li JJ, Xie C, He HL et al. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 2012; 18(2):119-125.
270. Biburger M, Tiegs G. Alpha-galactosylceramide-induced liver injury in mice is mediated by TNF-alpha but independent of Kupffer cells. *J Immunol* 2005; 175(3):1540-1550.
271. Liao CC, Day YJ, Lee HC, Liou JT, Chou AH, Liu FC. Baicalin Attenuates IL-17-Mediated Acetaminophen-Induced Liver Injury in a Mouse Model. *PLoS One* 2016; 11(11): e0166856.
277. Boll M, Weber LW, Becker E, Stampfl A. Mechanism of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity. Hepatocellular damage by reactive carbon tetrachloride metabolites. *Z Naturforsch C* 2001; 56(7-8): 649-659.
273. Penny C, Vuilleumier S, Bringel F. Microbial degradation of tetrachloromethane: mechanisms and perspectives for bioremediation. *FEMS Microbiol Ecol* 2010; 74(2):257-275.
274. Sato A, Nakashima H, Nakashima M, et al. Involvement of the TNF and FasL Produced by CD11b Kupffer Cells/Macrophages in CCl<sub>4</sub>-Induced Acute Hepatic Injury. *PLoS ONE* 2014; 9(3):e92515.
275. De Groot H, Littauer A, Hugo-Wissemann D, Wissemann P, Noll T. Lipid peroxidation and cell viability in isolated hepatocytes in a redesigned oxystat system: evaluation of the hypothesis that lipid peroxidation, preferentially induced at low oxygen partial pressures, is decisive for CCl<sub>4</sub> liver cell injury. *Arch Biochem Biophys* 1988; 264(2):591-599.
276. Constandinou C, Henderson N, Iredale JP. Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med* 2005; 117:237-250.



277. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 2003; 33(2):105-136.
278. Starkel P, Leclercq IA. Animal models for the study of hepatic fibrosis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2011; 25(2):319-333.
279. Martínez AK, Maroni L, Marzioni M, Ahmed ST, Milad M, Ray D et al. Mouse models of liver fibrosis mimic human liver fibrosis of different etiologies. *Curr Pathobiol Rep* 2014; 2(4):143-153.
280. Domenicali M, Caraceni P, Giannone F, Baldassarre M, Lucchetti G, Quarta C et al. A novel model of CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis with ascites in the mouse. *J Hepatol* 2009; 51(6):991-999.
281. Zhang C-Y, Yuan W-G, He P, Lei J-H, Wang C-X. Liver fibrosis and hepatic stellate cells: Etiology, pathological hallmarks and therapeutic targets. *World J Gastroenterol* 2016; 22(48):10512-10522.
282. Hung JT, Huang JR, Yu AL. Tailored design of NKT-stimulatory glycolipids for polarization of immune responses. *J Biomed Sci* 2017; 24(1):22.
283. Simoni Y, Diana J, Ghazarian L, Beaudoin L, Lehuen A. Therapeutic manipulation of natural killer (NK) T cells in autoimmunity: are we close to reality? *Clin Exp Immunol* 2013; 171(1):8-19.
284. Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *J Leukoc Biol* 2009; 86(3):513-528.
285. Wolf BJ, Choi JE, Exley MA. Novel Approaches to Exploiting Invariant NKT Cells in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 2018; 9:384.
286. Matsumoto H, Kawamura T, Kobayashi T, Kanda Y, Kawamura H, Abo T. Coincidence of autoantibody production with the activation of natural killer T cells in alpha-galactosylceramide-mediated hepatic injury. *Immunology* 2011; 133(1):21-28.
287. Wang H, Feng D, Park O, Yin S, Gao B. Invariant NKT cell activation induces neutrophil accumulation and hepatitis: opposite regulation by IL-4 and IFN- $\gamma$ . *Hepatology* 2013; 58(4):1474-1485.
288. Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One* 2014; 9(9): e107001.
289. Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med* 2009;41(5): 315-324.

290. Zhang X, Yang Y, Zhang L, Lu Y, Zhang Q, Fan D et al. Mesenchymal stromal cells as vehicles of tetravalent bispecific Tandab (CD3/CD19) for the treatment of B cell lymphoma combined with IDO pathway inhibitor D-1-methyl-tryptophan. *J Hematol Oncol* 2017;10(1):56.
291. Cheeseman KH, Albano EF, Tomasi A, Slater TF. Biochemical studies on the metabolic activation of halogenated alkanes. *Environ Health Perspect* 1985; 64:85-101.
292. Huang JR, Tsai YC, Chang YJ, Wu JC, Hung JT, Lin KH, Wong CH, Yu AL.  $\alpha$ -Galactosylceramide but not phenyl-glycolipids induced NKT cell anergy and IL-33-mediated myeloid-derived suppressor cell accumulation via upregulation of *egr2/3*. *J Immunol* 2014; 192:1972-1981
293. Volarevic V, Simovic Markovic B, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, et al. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol* 2014; 00:1-13.
294. Mitra A, Satelli A, Yan J, Xueqing X, Gagea M, Hunter CA et al. IL-30 (IL27p28) attenuates liver fibrosis through inducing NKG2D-*rae1* interaction between NKT and activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology* 2014;60(6):2027-39.
295. Strick-Marchand H, Masse G, Weiss M, Di Santo J. Lymphocytes support oval cell dependent liver regeneration. *J of Immunol* 2008; 181:2764 -2771.
296. Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K et al. Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues. *J Histochem Cytochem* 2014; 62(10):751-758.
297. Blom KG, Qazi M, Matos JB, Nelson BD, DePierre JW, Abedi-Valugerdi M et al. Isolation of murine intrahepatic immune cells employing a modified procedure for mechanical disruption and functional characterization of the B, T and natural killer T cells obtained. *Clin Exp Immunol* 2008; 155:320–329.
298. Pala P, Hussel T, Openshaw PJM. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Meth* 2000; 243: 107-124
299. Ruster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Müller S, Seifried E. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 2006;108(12):3938-44.
300. Henschler R, Fehervizyova Z, Bistrrian R, Seifried E. A mouse model to study organ homing behaviour of haemopoietic progenitor cells reveals high selectivity but low efficiency of multipotent progenitors to home into haemopoietic organs. *Br J Haematol* 2004; 126: 111.

301. Wang S, Zhang X, Ju Y, Zhao B, Yan X, Hu J et al. MicroRNA-146a feedback suppresses T cell immune function by targeting Stat1 in patients with chronic hepatitis B. *J Immunol* 2013; 191: 293-301.
302. Krampera M, Galipeau J, Shi Y, Tarte K, Sensebe L. MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy* 2013; 15:1054-1061.
303. Rouse M, Nagarkatti M, Nagarkatti PS. The role of IL-2 in the activation and expansion of regulatory T-cells and the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunobiology* 2013; 218: 674.
304. de la Rosa M, Rutz S, Dorninger H, Scheffold A. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2480.
305. Bartneck M, Warzecha KT, Tag CG, Sauer-Lehnen S, Heymann F, Trautwein C et al. Isolation and time lapse microscopy of highly pure hepatic stellate cells. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2015; 2015: 417023.
306. Riccalton-Banks L, Bhandari R, Fry J, Shakesheff KM. A simple method for the simultaneous isolation of stellate cells and hepatocytes from rat liver tissue. *Mol Cell Biochem* 2003; 248 (1-2): 97-102.
307. Yu MC, Chen CH, Liang X, et al. Inhibition of T-cell responses by hepatic stellate cells via B7-H1-mediated T-cell apoptosis in mice. *Hepatology* 2004; 40:1312.
308. Johnston B, Kim CH, Soler D, Emoto M, Butcher EC. Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR alpha beta NKT cell subsets. *J Immunol* 2003; 171(6): 2960-2969.
309. Subramanian M, Kini R, Madasu M, Ohta A, Nowak M, Exley M et al. Extracellular adenosine controls NKT-cell-dependent hepatitis induction. *Eur J Immunol* 2014;44(4): 1119-1129.
310. Nagy L. Would eating carrots protect your liver? A new role involving NKT cells for retinoic acid in hepatitis. *Eur J Immunol* 2012; 42(7): 1677-1680.
311. Ryu KH, Kim SY, Kim YR, Woo SY, Sung SH, Kim HS, Jung SC, Jo I, Park JW. Tonsil-derived mesenchymal stem cells alleviate concanavalin A-induced acute liver injury. *Exp Cell Res* 2014; 326:143-154.

312. Higashimoto M, Sakai Y, Takamura M, Usui S, Nasti A, Yoshida K et al. Adipose tissue derived stromal stem cell therapy in murine ConA-derived hepatitis is dependent on myeloid-lineage and CD4<sup>+</sup> T-cell suppression. *Eur J Immunol* 2013; 43:2956-2968.
313. Zhang Y, Cai W, Huang Q, Gu Y, Shi Y, Huang J et al. Mesenchymal stem cells alleviate bacteria-induced liver injury in mice by inducing regulatory dendritic cells. *Hepatology* 2014; 59:671-682.
314. Erhardt A, Biburger M, Papadopoulos T, Tiegs G. IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology* 2007; 45:475-485.
315. Lalor PF, Shields P, Grant A, Adams DH. Recruitment of lymphocytes to the human liver. *Immunol Cell Biol* 2002; 80:52-64.
316. Shields PL, Morland CM, Salmon M, Qin S, Hubscher SG, Adams DH. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol* 1999; 163:6236-6243.
317. Santodomingo-Garzon T, Han J, Le T, Yang Y, Swain MG. Natural killer T cells regulate the homing of chemokine CXC receptor 3-positive regulatory T cells to the liver in mice. *Hepatology* 2009; 49(4): 1267-76.
318. Cheng X, Shan YY, Luo YW. Dynamic change in Th17/regulatory T cell ratio in peripheral blood of patients with acute hepatitis B and its significance. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2016; 24(8): 565-568.
319. Favre D, Mold J, Hunt PW, Kanwar B, Loke P, Seu L et al. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Sci Transl Med* 2010; 2(32): 32ra36.
320. Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, Mileti E, Fallarino F, Puccetti P et al. Gut CD103<sup>+</sup> dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* 2010; 59(5): 595-604.
321. Choi YS, Lee J, Lee HW, Chang DY, Sung PS, Jung MK et al. Liver injury in acute hepatitis A is associated with decreased frequency of regulatory T cells caused by Fas-mediated apoptosis. *Gut* 2015; 64:1303-1313.
322. Lu L, Feng M, Gu J, Xia Z, Zhang H, Zheng S et al. Restoration of intrahepatic regulatory T cells through MMP-9/13-dependent activation of TGF- $\beta$  is critical for immune homeostasis following acute liver injury. *J Mol Cell Biol* 2013; 5: 369-379.

323. Sakaguchi. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses *Annu Rev Immunol* 2004; 22:531–562.
324. Gu L, Deng WS, Sun XF, Zhou H, Xu Q. Rapamycin ameliorates CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis in mice through reciprocal regulation of the Th17/Treg cell balance. *Mol Med Rep* 2016; 14(2): 1153-1161.
325. Petursdottir DH, Hardardottir I. Dietary fish oil increases the number of splenic macrophages secreting TNF- $\alpha$  and IL-10 but decreases the secretion of these cytokines by splenic T cells from mice. *J Nutr* 2007; 137(3): 665-670.
326. di Bonzo LV, Ferrero I, Cravanzola C, Mareschi K, Rustichell D, Novo E et al. Human mesenchymal stem cells as a two-edged sword in hepatic regenerative medicine: engraftment and hepatocyte differentiation versus profibrogenic potential. *Gut* 2008; 57(2): 223-231.
327. Baertschiger RM, Serre-Beinier V, Morel P, Bosco D, Peyrou M, Clément S et al. Fibrogenic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells in injured liver. *PLoS One* 2009; 4(8): e6657.
328. Higashiyama R, Inagaki Y, Hong YY, Kushida M, Nakao S, Niioka M et al. Bone marrow-derived cells express matrix metalloproteinases and contribute to regression of liver fibrosis in mice. *Hepatology* 2007; 45(1): 213-222.
329. Pallotta MT, Orabona C, Volpi C, Vacca C, Belladonna ML, Bianchi R et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat Immunol* 2011; 12: 870-878.
330. Ogiso H, Ito H, Ando T, Arioka Y, Kanbe A, Ando K et al. The Deficiency of Indoleamine 2,3-Dioxygenase Aggravates the CCl<sub>4</sub>-Induced Liver Fibrosis in Mice. *PLoS One* 2016; 11(9): e0162183.

## ПРИЛОГ

### 8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

**Редни број:**

**РБ**

**Идентификациони број:**

**ИБР**

**Тип документације:**

Монографска публикација

**ТД**

**Тип записа:**

Текстуални штампани материјал

**ТЗ**

**Врста рада:**

Докторска дисертација

**ВР**

**Аутор:**

Неда Милосављевић

**АУ**

**Ментор/коментор**

др сци.мед. Владислав Воларевић,  
ванредни професор

**МН**

**Наслов рада:**

Утицај мезенхималних матичних  
ћелија на сигнални пут IL-17 у  
моделима акутног хепатитиса и  
фиброзе јетре

**НР**

**Језик публикације:**

Српски (ћирилица)

**ЈП**

**Језик извода:**

Српски/енглески

**ЈИ**

<b>Земља публикавања:</b>	Србија
<b>ЗП</b>	
<b>Уже географско подручје:</b>	Србија
<b>УГП</b>	
<b>Година:</b>	2018.
<b>ГО</b>	
<b>Издавач:</b>	Ауторски репринт
<b>ИЗ</b>	
<b>Место и адреса:</b>	34000 Крагујевац, Србија, Светозара
<b>МС</b>	Марковића 69.
<b>Физички опис рада:</b>	Дисертација има 149 страна, садржи 8
<b>ФО</b>	поглавља, 24 фигуре, 14 графикана, 4
	табеле, 6 слика и 330 референци
<b>Научна област:</b>	Медицина
<b>Научна дисциплина:</b>	Имунологија, инфекција и
<b>ДИ</b>	инфламација
<b>Предметна одредница/кључне</b>	
<b>речи:</b>	Мезенхималне матичне ћелије, IL-17,
<b>ПО</b>	акутни хепатитис, фиброза јетре
<b>УДК</b>	
<b>Чува се:</b>	У Библиотеци Факултета медицинских
<b>ЧУ</b>	наука у Крагујевцу, 34000 Крагујевац,
	Србија, Светозара Марковића 69
<b>Важна напомена:</b>	
<b>МН</b>	
<b>Извод:</b>	
<b>ИД</b>	

Мезенхималне матичне ћелије (MSCs), паракриним механизмима, редукују акутно оштећење и фиброзу јетре. С обзиром да утицај мезенхималних матичних ћелија (MSCs) на IL-17 сигнални пут у акутном хепатитису и фибрози јетре није познат, анализирани су молекулски механизми одговорни за MSCs-зависну модулацију IL-17 у овим болестима.

У експерименталним моделима акутног хепатитиса изазваним  $\alpha$ -галактоцерамидом ( $\alpha$ GalCer) и угљен тетра хлоридом ( $CCl_4$ ), MSCs су редуковале хепатотоксичност NKT ћелија паракриним механизмом који зависи од активности индоламин 2, 3-диоксигеназе (IDO). Смањена концентрација инфламацијског IL-17 и повећана концентрација имуносупресивног IL-10, мањи број IL-17-продукујућих NKT ћелија (NKT17) и веће присуство IL-10-продукујућих FoxP3+NKT ћелија (NKTreg) уочени су у јетрама оболелих мишева који су примили MSCs. Примена кондиционираног медијума MSCs (MSC-CM) значајно је редуковала акутни хепатитис узрокујући конверзију хепатотоксичних NKT17 у имуносупресивне NKTreg. Примена 1-метил триптофана (1-MT), фармаколошког инхибитора IDO-а, у потпуности је супримирала имуномодулаторне ефекте MSC-CM.

У моделу  $CCl_4$ -индуковане фиброзе јетре, MSCs су значајно редуковале фиброзу јетре смањењем серумске концентрације IL-17 и повећањем концентрације имуносупресивних IL-10, IDO и кинуренина. MSCs су значајно смањиле број интрахепатичних Th17 лимфоцита и повећале проценат CD4+IL-10+ Т ћелија. Слично као и MSCs, и MSC-CM значајно је редуковао број Th17 лимфоцита у јетри, смањио концентрацију IL-17 у серуму и поспешео експанзију CD4+FoxP3+IL-10+ регулаторних Т лимфоцита. Примена 1-MT у потпуности је супримирала хепатопротективни и имуномодулацијски ефекат MSC-CM.

Најважнији закључак ове докторске дисертације је да MSCs, активношћу IDO-а, редукују акутни хепатитис индукујући конверзију хепатотоксичних NKT17 ћелија у имуносупресивне NKTreg, док у фибрози јетре инхибирају ослобађање IL-17 из Th17 лимфоцита и повећавају присуство имуносупресивних IL-10-продукујућих Tregs у јетри, доприносећи значајном смањењу фиброзе.

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

**Датум прихватања теме од** 06.09.2017. године

**стране ННВ:**

**ДП**

**Датум одбране:**

**ДО**



**Чланови комисије:**

**КО**

Председник:

Проф. др Миодраг Лукић, редовни  
професор – емеритус Универзитета у  
Крагујевцу за ужу научну област  
Микробиологија и имунологија

Члан:

Проф. др Данило Војводић, редовни  
професор Медицинског факултета  
Војномедицинске академије Универзитета  
одбране у Београду, за ужу научну област  
Имунологија

Члан:

Доц. др Александар Арсенијевић, доцент  
Факултета медицинских наука  
Универзитета у Крагујевцу, за ужу научну  
област Онкологија

## 8.2. KEY WORDS DOCUMENTATION

### UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC

**Accession number:**

ANO

**Identification number:**

INO

**Documentation type:**

DT

Monographic publication

**Type of record:**

TR

Textual printed material

**Contents code:**

CC

PhD thesis

**Author:**

AU

Neda Milosavljevic

**Menthor/co-mentor:**

MN

Professor Vladislav Volarevic, MD PhD,  
Associate proffesor

**Title:**

TI

Mesenchymal stem cells-mediated  
modulation of IL-17 signaling in acute  
hepatitis and liver fibrosis models

**Language of text:**

LT

Serbian (Cyrillic)

**Language of abstract:**

Serbian/English

**Country of publication:**

CP

Serbia

**Locality of publication:**

LP

Serbia

**Publication year:**

PY

2018.

<b>Publisher:</b>	Author reprint
<b>PU</b>	
<b>Publication place:</b>	34000 Kragujevac, Serbia, Svetozara
<b>PP</b>	Markovica N° 69
<b>Physical description:</b>	Thesis contains 149 pages, 8 chapters, 24
<b>PD</b>	figures, 14 graphs, 4 tables, 6 pictures, and 330 citations
<b>Scientific field:</b>	
<b>SF</b>	Medicine
<b>Scientific discipline:</b>	
<b>SD</b>	Immunology, infection and inflammation
<b>Subject/key words:</b>	Mesenchymal stem cells, IL-17, acute
<b>SKW</b>	hepatitis, liver fibrosis
<b>UDC</b>	
<b>Holding data:</b>	Library of Faculty of Medical Sciences, Kragujevac, 34000 Kragujevac, Serbia, Svetozara Markovica 69
<b>Note:</b>	
<b>N</b>	
<b>Abstract:</b>	
<b>AB</b>	

Interleukin 17 (IL-17) plays an important role in the pathogenesis of acute hepatitis and liver fibrosis. Due to immunomodulatory characteristics, mesenchymal stem cells (MSCs) reduce acute and chronic liver failure, however, the molecular mechanism by which MSCs suppress inflammation in these diseases is still unknown

To evaluate effects of MSCs on IL-17 signaling, in acute hepatitis and liver fibrosis, we used carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)- and alphagalactoceramide ( $\alpha$ -GalCer)- induced acute hepatitis and CCl<sub>4</sub>- induced liver fibrosis.

In acute hepatitis experimental models, MSCs attenuate hepatotoxicity of NKT cells in paracrine, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-dependent manner. Liver intracellular staining and cytokine serum measuring showed decreased concentration of inflammatory IL-17,

increasing immunosuppressive IL-10, reduced number of IL-17 producing NKT (NKT17) cells and increased number of FoxP3+ IL-10 producing NKT regulatory (NKTreg) cells in the injured livers of MSC-treated mice. Injection of MSC conditioned medium (MSC-CM) resulted with increased NKTreg/NKT17 ratio in the liver and attenuated hepatitis *in vivo* and significantly reduced hepatotoxicity of NKT cells *in vitro*. This phenomenon was completely abrogated in the presence of IDO inhibitor, 1-methyltryptophan.

In liver fibrosis experimental model, MSCs significantly attenuated CCl<sub>4</sub>-induced liver fibrosis by decreasing serum levels of inflammatory IL-17, increasing immunosuppressive IL-10, IDO and kynurenine. MSCs reduce number of IL-17 producing Th17 cells and increasing percentage of CD4+IL-10+ T cells. Injection of MSC-CM decrease number of Th17 cells in the liver and serum levels of IL-17. MSC-CM promoted expansion of CD4+FoxP3+IL-10+ T regulatory cells and suppressed proliferation of Th17 cells. In the presence of IDO inhibitor, 1-methyltryptophan, this immunomodulatory phenomenon was completely abrogated.

In conclusion, MSCs in acute hepatitis, decrease NKT production of IL-17, while in liver fibrosis reduces number of IL-17 producing CD4+ T cells, thus reducing hepatocyte damage.

### **Keywords**

Mesenchymal stem cells, IL-17, acute hepatitis, liver fibrosis

**Accepted by the Scientific Board on:** 06.09.2017.

**ASB**

**Defended on:**

**DE**

**Thesis defended board**

**(Degree/name/surname/title/faculty)**

**DB**

President:

Professor Miodrag L. Lukić, MD PhD, Professor  
Emeritus, University of Kragujevac

Member:

Professor Danilo Vojvodić, MD PhD, Full  
professor of Immunology, Military Medical  
Academy at Ministry of Defence Belgrade

Member:

Ass. Prof. dr Aleksandar Arsenijević, MD PhD,  
Assistant professor of Oncology, Faculty of  
Medical Sciences, University of Kragujevac

## БИОГРАФИЈА

Неда Милосављевић је рођена 28.08.1986. године у Краљеву. Основну школу и Гимназију, друштвено-језички смер, завршила је као носилац дипломе „Вук Караџић“. Медицински факултет Универзитета у Крагујевцу уписала је 2005/2006. године, а дипломирала 2012. године, са просечном оценом 9,03. Након дипломирања обавила је лекарски стаж и положила стручни испит.

Школске 2012/2013. године уписала је Докторске академске студије на Факултету медицинских наука у Крагујевцу, изборно подручје Имунологија, инфекција и инфламација. Усмени докторски испит је положила у јулу 2016. године.

Од фебруара 2013. волонтирала у Центру за онкологију и радиологију, КЦ Крагујевац. Од августа 2016. запослена у Центру за онкологију и радиологију, КЦ Крагујевац. Специјализацију из Радијационе онкологије уписала у априлу 2017. године.

Укључена је у научно-истраживачки рад у Центру за молекулску медицину и истраживање матичних ћелија на Факултету медицинских наука у Крагујевцу.

## БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Milosavljevic N<sup>#</sup>**, Gazdic M<sup>#</sup>, Simovic Markovic B, Arsenijevic A, Nurkovic J, Dolicanin Z, Djonov V, Lukic ML, Volarevic V. Mesenchymal stem cells attenuate acute liver injury by altering ratio between interleukin 17 producing and regulatory natural killer T cells. *Liver Transpl* 2017; 23(8):1040-1050.
2. **Milosavljevic N**, Gazdic M, Simovic Markovic B, Arsenijevic A, Nurkovic J, Dolicanin Z, Jovicic N, Jeftic I, Djonov V, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Mesenchymal stem cells attenuate liver fibrosis by suppressing Th17 cells – an experimental study. *Transpl Int* 2018; 31(1):102-115.
3. Simovic Markovic B<sup>#</sup>, **Milosavljevic N<sup>#</sup>**, Arsenijevic A, Gazdic M, Arsenijevic N, Lukic ML, Volarevic V. Bacterial flora plays important role in acute dextran sulphate sodium-induced colitis but is not involved in Gal-3 dependent modulation of colon inflammation. *Ser J Exp Clin Res* 2017; 18(3):213-220.

**ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Неда Милосављевић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Утицај мезенихмалних матичних ћелија на сигнални пут IL-17 у  
моделима акутног хепатитиса и фиброзе јетре

која је одбрањена на Факултету медицинских наука,  
Универзитета у Крагујевцу представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог истраживачког рада*.

*Овом Изјавом такође потврђујем:*

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

У Крагујевцу, \_\_\_\_\_ године,

\_\_\_\_\_  
потпис аутора



**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

Ја, Неда Миљосављевић,

дозвољавам

не дозвољавам

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

Утицај мезенихмалних матичних ћелија на сигнални пут ПЛ-17 у  
моделима акутног хепатитиса и фиброзе јетре

која је одбрањена на Факултету медицинских наука,

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

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>

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

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

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

У Крагујевцу \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ године,

---

попис аутора

---

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

# Mesenchymal Stem Cells Attenuate Acute Liver Injury by Altering Ratio Between Interleukin 17 Producing and Regulatory Natural Killer T Cells

Neda Milosavljevic,<sup>1\*</sup> Marina Gazdic,<sup>2\*</sup> Bojana Simovic Markovic,<sup>1</sup> Aleksandar Arsenijevic,<sup>1</sup> Jasmin Nurkovic,<sup>3</sup> Zana Dolicanin,<sup>3</sup> Valentin Djonov,<sup>4</sup> Miodrag L. Lukic,<sup>1</sup> and Vladislav Volarevic<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Microbiology and Immunology, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research and <sup>2</sup>Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia; <sup>3</sup>Department of Biomedical Sciences, State University of Novi Pazar, Novi Pazar, Serbia; and <sup>4</sup>Institute of Anatomy, University of Bern, Bern, Switzerland

Mesenchymal stem cells (MSCs) are, due to immunomodulatory characteristics, considered as novel agents in the treatment of immune-mediated acute liver failure. Although it is known that MSCs can regulate activation of T lymphocytes, their capacity to modulate function of neutrophils and natural killer T (NKT) cells, major interleukin (IL) 17-producing cells in acute liver injury, is still unknown. By using 2 well-established murine models of neutrophil and NKT cell-mediated acute liver failure (induced by carbon tetrachloride and  $\alpha$ -galactosylceramide), we investigated molecular and cellular mechanisms involved in MSC-mediated modulation of IL17 signaling during acute liver injury. Single intravenous injection of MSCs attenuate acute hepatitis and hepatotoxicity of NKT cells in a paracrine, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-dependent manner. Decreased levels of inflammatory IL17 and increased levels of immunosuppressive IL10 in serum, reduced number of interleukin 17-producing natural killer T (NKT17) cells, and increased presence of forkhead box P3 + IL10-producing natural killer T regulatory cells (NKTregs) were noticed in the injured livers of MSC-treated mice. MSCs did not significantly alter the total number of IL17-producing neutrophils, CD4+, and CD8+ T lymphocytes in the injured livers. Injection of mesenchymal stem cell-conditioned medium (MSC-CM) resulted with an increased NKTreg/NKT17 ratio in the liver and attenuated hepatitis in vivo and significantly reduced hepatotoxicity of NKT cells in vitro. This phenomenon was completely abrogated in the presence of IDO inhibitor, 1-methyltryptophan. In conclusion, the capacity of MSCs to alter NKT17/NKTreg ratio and suppress hepatotoxicity of NKT cells in an IDO-dependent manner may be used as a new therapeutic approach in IL17-driven liver inflammation.

**Liver Transplantation 23 1040–1050 2017 AASLD.**

Received January 21, 2017; accepted April 27, 2017.

Interleukin (IL) 17 plays an important role in the pathogenesis of immune-mediated liver diseases.<sup>(1)</sup> Plasma levels of IL17 were significantly increased in patients

suffering from alcoholic liver diseases, whereas IL17-producing T lymphocytes and neutrophils contributed to the inflammatory infiltrates in the livers of patients with alcoholic cirrhosis and hepatitis.<sup>(2)</sup> IL17 was shown as a key regulator in hepatic injury caused by neutrophil-induced inflammatory responses.<sup>(3)</sup> An increased hepatic expression of IL17 and elevated serum levels of IL17 correlated with the severity of hepatocyte damage and with the presence of IL17-expressing CD4+ T and CD3+NK1.1+ natural killer T (NKT) cells in the T cell model of acute liver failure.<sup>(4)</sup> Overexpression of IL17 resulted in massive hepatocyte necrosis, whereas blockage of IL17 signaling significantly ameliorated acute hepatitis, indicating that blockade of the IL17/IL17R signaling pathway

*Abbreviations:* 1-MT, 1-methyl-DL-tryptophan;  $\alpha$ -GalCer,  $\alpha$ -galactosylceramide; ALT, alanine aminotransferase; APC, allophycocyanin; AST, aspartate aminotransferase; CCl<sub>4</sub>, carbon tetrachloride; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FBS, fetal bovine serum; FOXP3, forkhead box P3; H & E, hematoxylin-eosin; HepG2, liver hepatocellular carcinoma cells; HGF, hepatocyte growth factor; IDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; IFN $\gamma$ , interferon gamma; IL, interleukin; Ly6-G, lymphocyte antigen 6 complex locus G; MNC, mononuclear cell; MSC, mesenchymal stem cell; MSC-CM, mesenchymal stem cell-conditioned medium; NKp46, natural killer protein 46; NKT, natural killer T; NKT17, interleukin 17-producing natural killer T; NKTreg, natural killer T regulatory; PGE<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>; ROR $\gamma$ T, RAR-related orphan receptor gamma T; SEM, standard error of the mean; T<sub>H</sub>, T helper; TCR $\gamma\delta$ ,

may represent a novel therapeutic approach in fulminant hepatitis.<sup>(4)</sup>

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult stem cells that can be found in almost all postnatal organs, including the liver.<sup>(5)</sup> MSCs can alter immune response through cell-to-cell contact or through the production of soluble factors.<sup>(6)</sup> Because of their immunomodulatory characteristics and because of their potential for differentiation into hepatocytes, MSCs may be considered novel therapeutic agents in the treatment of acute liver failure. Although it is well known that MSCs can regulate proliferation, activation, and effector function of T lymphocytes, professional antigen-presenting cells (dendritic cells, macrophages, B lymphocytes), and natural killer cells,<sup>(5,6)</sup> their capacity to modulate the function of neutrophils and NKT cells, major IL17-producing effector cells in acute liver injury, is still unknown.

By using 2 well-established murine models of neutrophil- and NKT cell-mediated acute liver failure (induced by carbon tetrachloride [CCl<sub>4</sub>] and  $\alpha$ -galactosylceramide [ $\alpha$ -GalCer]), we investigated molecular and cellular mechanisms involved in MSC-mediated modulation of IL17 signaling during the pathogenesis of acute liver injury.

We provide the evidence that a single intravenous injection of MSCs attenuate acute hepatitis in a paracrine, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-dependent manner and that this effect was accompanied with decreased serum levels of IL17 and increased serum levels of IL10, reduced

number of IL17-producing NKT cells, and an increased presence of forkhead box P3 (FOXP3) + IL10-producing NKT regulatory cells in the liver.

## Materials and Methods

### CELLS

Murine MSCs isolated from bone marrow of C57BL/6 mice were purchased from Gibco (Catalog Number S10502-01). The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 IU/mL of penicillin G, and 100  $\mu$ g/mL of streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. MSCs from passage 6 were used throughout these experiments. Human liver hepatocellular carcinoma cell line, liver hepatocellular carcinoma cells (HepG2) (ATCC HB-8065), were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator.

### GENERATION OF MESENCHYMAL STEM CELL-CONDITIONED MEDIUM

MSCs were seeded at a density of 10,000 cells/cm<sup>2</sup>. In order to collect the mesenchymal stem cell-conditioned medium (MSC-CM), MSCs were first cultured in serum-containing complete medium and incubated at 37°C in a humid atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. At 80% confluence, the cells were washed twice with 1  $\times$  phosphate-buffered saline (Invitrogen, Carlsbad, CA), and the medium was then changed to serum-free medium. After 48 hours, the media were collected, centrifuged at 13,000g at 4°C for 10 minutes, and stored at -80°C until used.<sup>(7)</sup>

### PHARMACOLOGICAL INHIBITION OF IDO

MSCs were cultured for 48 hours in culture medium containing 1 mM of 1-methyl-DL-tryptophan (1-MT; Sigma-Aldrich), an inhibitor of IDO enzymatic activity.<sup>(8)</sup>

### ANIMALS

The 8-10-week-old male wild-type C57BL/6 mice were used for induction of acute liver injury. Mice were maintained in animal breeding facilities at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac,

*T-cell receptor gamma delta; TNF $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$ ; Treg, regulatory T cell.*

*Address reprint requests to Vladislav Volarevic, Ph.D., Department of Microbiology and Immunology, Center for Molecular Medicine and Stem Cell Research, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, 69 Svetozara Markovica Street, 34000 Kragujevac, Serbia. Telephone: +38134306800; FAX: +38134306600. Ext. 112; E-mail: drvolarevic@yahoo.com*

*\*These authors contributed equally to the work.*

*This study was supported by the "Start Up for Science" grant entitled "The role of mesenchymal stem cells in acute liver injury" funded by Phillip Morris and Center for Leadership Development, Swiss National Science Foundation project (SCOPES IZ73Z0\_152454/1), Serbian Ministry of Science (ON175069, ON175103), and Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac (MP01114).*

*Copyright © 2017 by the American Association for the Study of Liver Diseases.*

*View this article online at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).*

*DOI 10.1002/lt.24784*

Kragujevac, Serbia. All procedures were performed in accordance with the guidelines for the *Principles of Laboratory Animal Care* and the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, and all animals received humane care according to the criteria outlined in the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (National Institutes of Health publication 86-23, 1985 revision). All experiments were approved by the Animal Ethical Review Board of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia. Mice were housed in a temperature-controlled environment with a 12-hour light-dark cycle and were administered with standard laboratory chow and water ad libitum. We used 10 mice per group.

### INDUCTION OF ACUTE LIVER INJURY AND LIVER NECROSIS

Solution of  $\text{CCl}_4$  (Sigma-Aldrich) and corn oil (Sigma-Aldrich) in ratio 1:1 and dose  $2 \mu\text{L/g}$  body weight is applied intraperitoneally in a single dose.<sup>(9)</sup> All control mice were injected with corn oil only.

Alternatively, mice were given a single intravenous injection of  $\alpha$ -GalCer ( $50 \mu\text{g/kg}$ ) dissolved in  $200 \mu\text{L}$  of saline.<sup>(10)</sup> Control animals received saline only.

Serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransaminase (ALT) were measured 24 hours after  $\text{CCl}_4$ /corn oil treatment<sup>(9)</sup> or 16 hours after intravenous injection of  $\alpha$ -GalCer.<sup>(10)</sup>

### ADMINISTRATION OF MSCs

Also,  $5 \times 10^5$  MSCs were intravenously injected into mice immediately after  $\text{CCl}_4$  or  $\alpha$ -GalCer administration.

### HISTOLOGICAL ANALYSES AND SEMIQUANTITATIVE ASSESSMENT OF LIVER INJURY

Histological analysis and semiquantitative determination of liver injury were performed as previously described.<sup>(11)</sup> Briefly, the isolated livers were fixed in 10% phosphate-buffered formalin, embedded in paraffin, and consecutive  $4\text{-}\mu\text{m}$  tissue sections were cut at various depths and mounted on slides. Sections were stained with hematoxylin-eosin (H & E) and examined under low-power ( $100\times$ ) light microscopy (Zeiss Axioskop 40, Jena, Germany) equipped with digital camera.

The area of necrosis was quantified using the Autodesk AutoCAD 2009 software application for design and drafting. Liver tissue sections were photographed, and each photograph of the tissue sample was imported into a newly created Autodesk AutoCAD 2009.dwg file. Using the “polyline” tool, “polyline” regions were drawn around the whole sample (marked with A) and around each of the necrotic areas in the photograph (marked with B). Then, the surface areas of the drawn regions were determined. First, the surface area of the A region was determined, and then the surface areas of each of the B regions (one by one) were determined. The surface area of each drawn region is presented as a unitless number in the Autodesk AutoCAD program. After all of the photographs from a whole liver tissue section were examined, the percentage of necrotic area was calculated by using the formula:  $N = Bt \times 100/At$ , where N is the percentage (%) of necrotic area in the whole tissue section, At (A total) is the sum of the sample surface areas in the whole tissue section ( $At = A1 + A2 + \dots + An$ , where n is the number of photographs), Bt (B total) is the sum of the necrotic surface areas in the whole tissue section ( $Bt = B1 + B2 + \dots + Bm$ , where m is the number of marked necrotic fields).<sup>(11)</sup>

### MEASUREMENTS OF CYTOKINES IN SERUM

Commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) sets (R&D Systems, Minneapolis, MN) were used to measure concentration of IL17, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), and IL10 cytokines according to the manufacturer’s instructions. Blood samples were collected 24 hours after  $\text{CCl}_4$  administration and 2 hours after  $\alpha$ -GalCer injection from abdominal aorta during the euthanasia procedure. Serum was separated by centrifugation and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

### MEASUREMENTS OF MSC-DERIVED IMMUNOSUPPRESSIVE FACTORS

IDO content of serum was determined using an ELISA kit (NeoBioLab) according to the manufacturer’s instructions. Levels of hepatocyte growth factor (HGF) and prostaglandin  $\text{E}_2$  ( $\text{PGE}_2$ ) in the serum were measured using ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer’s instructions.

## ISOLATION OF HEPATIC MONONUCLEAR CELLS AND FLOW-CYTOMETRIC ANALYSIS

The isolation of liver-infiltrating mononuclear cells (MNCs) was conducted as previously described.<sup>(12)</sup> Hepatic MNCs were screened for various cell surface and intracellular markers with flow cytometry 24 hours after CCl<sub>4</sub>/corn, and 2 hours after  $\alpha$ -GalCer injection. Briefly, isolated MNCs were incubated with murine anti-mouse CD3, CD4, CD49b, CD8, CD25, CD45, lymphocyte antigen 6 complex locus G (Ly6-G), and CD11b monoclonal antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate, phycoerythrin, peridinin chlorophyll protein, or allophycocyanin (APC; all from BD Biosciences, San Jose, CA) following the manufacturer's instructions. MNCs derived from the liver were concomitantly stained for the intracellular content of IL17 and IL10 by using the fixation/permeabilization kit and conjugated anti-mouse monoclonal antibodies (BD Bioscience). For intracellular cytokine staining, cells were stimulated with 50 ng/mL of phorbol 12-myristate 13-acetate and 500 ng/mL of ionomycin for 5 hours, and GolgiStop (BD Biosciences) was added. Cells were fixed in Cytofix/Cytoperm, permeated with 0.1% saponin, and stained with fluorescent antibodies. Intracellular staining for FOXP3 was performed using the BD Bioscience fixation/permeabilization buffer kit following the manufacturer's instructions. After incubation, the cells were washed twice with phosphate-buffered saline containing 0.01% sodium azide followed by fixation in 200  $\mu$ l of fixative solution (10 g/L of paraformaldehyde, 1% cacodylic acid, 6.65 g/L of sodium chloride, 0.01% sodium azide). Flow cytometric analysis was conducted on a BD Biosciences FACSCalibur and analyzed by using the Flowing software analysis program.

## ISOLATION OF NKT CELLS

NKT cells were isolated from hepatic MNCs by magnetic cell sorting (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), according to manufacturer's instructions. Single-cell suspensions of MNCs derived from the liver were labeled with a cocktail of biotin-conjugated monoclonal anti-mouse antibodies against natural killer protein 46 (NKp46), CD45R, CD8a, CD115, and T-cell receptor gamma delta (TCR $\gamma$  $\delta$ ) and microBeads conjugated to monoclonal anti-biotin antibody (Miltenyi Biotec). The labeled cells were subsequently depleted by separation over a MACS Column

(Miltenyi Biotec), which was placed in the magnetic field of a MACS Separator (Miltenyi Biotec). In the second step, the NK1.1<sup>+</sup> NKT cells were labeled with monoclonal anti-mouse NK1.1 antibody conjugated to APC and microBeads conjugated to monoclonal anti-mouse anti-APC antibody and positively selected using MACS Column (Miltenyi Biotec) and MACS Separator (Miltenyi Biotec). Purity of isolated NKT cells was checked by FACS analysis. Isolated NKT cells were then used in the coculture experiments and cytotoxicity assay as purified NKT cells.

## CO-CULTURE OF MSCs AND NKT CELLS

NKT cells, in vitro stimulated with  $\alpha$ -GalCer (100 ng/mL), were cultured alone and physically separated from MSCs using a 0.4- $\mu$ m porous transwell system (Corning Incorporated, Life Sciences, France). Control cultures of NKT cells without  $\alpha$ -GalCer stimulation were also included in all experiments. For contact-independent cocultures, NKT cells were placed in the lower chamber (24 wells) and MSCs were seeded in the transwell inserts, at ratio 10:1.<sup>(13)</sup> After 48 hours of culture, activated NKT cells were harvested for flow cytometry analysis or cytotoxicity assay.

## CYTOTOXICITY ASSAY

HepG2 cells ( $4 \times 10^4$  HepG2 cell/well) were used as targets for NKT cells isolated from  $\alpha$ -GalCer+MSC-treated mice and  $\alpha$ -GalCer-treated mice, as well as for NKT cells isolated from livers of  $\alpha$ -GalCer-,  $\alpha$ -GalCer+MSC-CM-, and  $\alpha$ -GalCer+MSC-CM+1-MT-treated mice that were restimulated with  $\alpha$ -GalCer in complete medium,  $\alpha$ -GalCer in MSC-CM, or  $\alpha$ -GalCer in MSC-CM+1-MT, respectively. An effector to target ratio (E:T ratio) of 10:1 was used.<sup>(14)</sup> The E-plate 16 wells were placed in the xCELLigence RTCA DP (ACEA Biosciences, San Diego, CA), and impedance measurements were recorded for 6 hours at 37 $^\circ$  and 5% CO<sub>2</sub>. NKT cell-mediated death of tumor cells was monitored in real time and was indicated by a decrease in cell index. Data were analyzed with RTCA Software, version 1.2 (Acea Biosciences, San Diego, CA).

## STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed using SPSS, version 20.0 (IBM, Armonk, NY). Data are presented as means  $\pm$  standard error of the mean (SEM). Statistical

significance was determined by Student *t* test and, where appropriate, using Mann-Whitney U test. Statistical significance was assumed at  $P < 0.05$ .

## Results

### SINGLE INJECTION OF MSCs EFFICIENTLY ATTENUATED CCL<sub>4</sub>-INDUCED ACUTE LIVER INJURY, LIVER INFILTRATION OF INFLAMMATORY CELLS, AND SERUM LEVELS OF IL17

Intravenous injection of MSCs significantly attenuated CCL<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity, as determined by liver enzyme tests (Fig. 1A), macroscopic analysis, and histology (Fig. 1B). Serum AST ( $P = 0.002$ ) and ALT levels ( $P = 0.002$ ) were significantly lower in CCL<sub>4</sub>+MSCs-treated mice compared with mice that received CCL<sub>4</sub> only (Fig. 1A). Macroscopically, livers of CCL<sub>4</sub>-treated mice appeared larger and with a pale and irregular surface indicative of severe hepatocellular damage. CCL<sub>4</sub>-induced macroscopic changes were significantly attenuated in MSC-treated animals. Livers obtained from CCL<sub>4</sub>- and MSC-treated mice had a smooth surface with uniform and soft textures, similar to the livers of control animals (Fig. 1B, upper panel).

Histological analysis confirmed these findings (Fig. 1B, middle panel). Liver sections in CCL<sub>4</sub>-treated mice showed widespread areas of necrosis characterized by standard morphologic criteria (ie, loss of architecture, vacuolization, karyolysis, and increased eosinophilia). Extensive liver damage in CCL<sub>4</sub>-treated mice was characterized by massive coagulative necrosis and cytoplasmic swelling of the majority of hepatocytes. On the contrary, there were only several solitary areas of necrotic tissue in CCL<sub>4</sub>-treated mice that received MSCs resulting in a significantly reduced total size of the necrotic areas (Fig. 1B, lower panel left;  $P = 0.002$ ).

CCL<sub>4</sub>-induced hepatocyte damage was accompanied with extensive infiltration of leukocytes within liver lobules and around the central veins and portal tracts, indicating the ongoing inflammatory process. As it is shown in Fig. 1B (lower panel right), infiltration of CD45+ leukocytes in the liver was significantly reduced in CCL<sub>4</sub>-treated mice that received MSCs (Fig. 1B, lower panel right;  $P = 0.04$ ).

A diminished inflammatory injury in CCL<sub>4</sub>+MSCs-treated mice correlated with the production of IL17 (Fig. 1C). Serum levels of IL17 were significantly lower

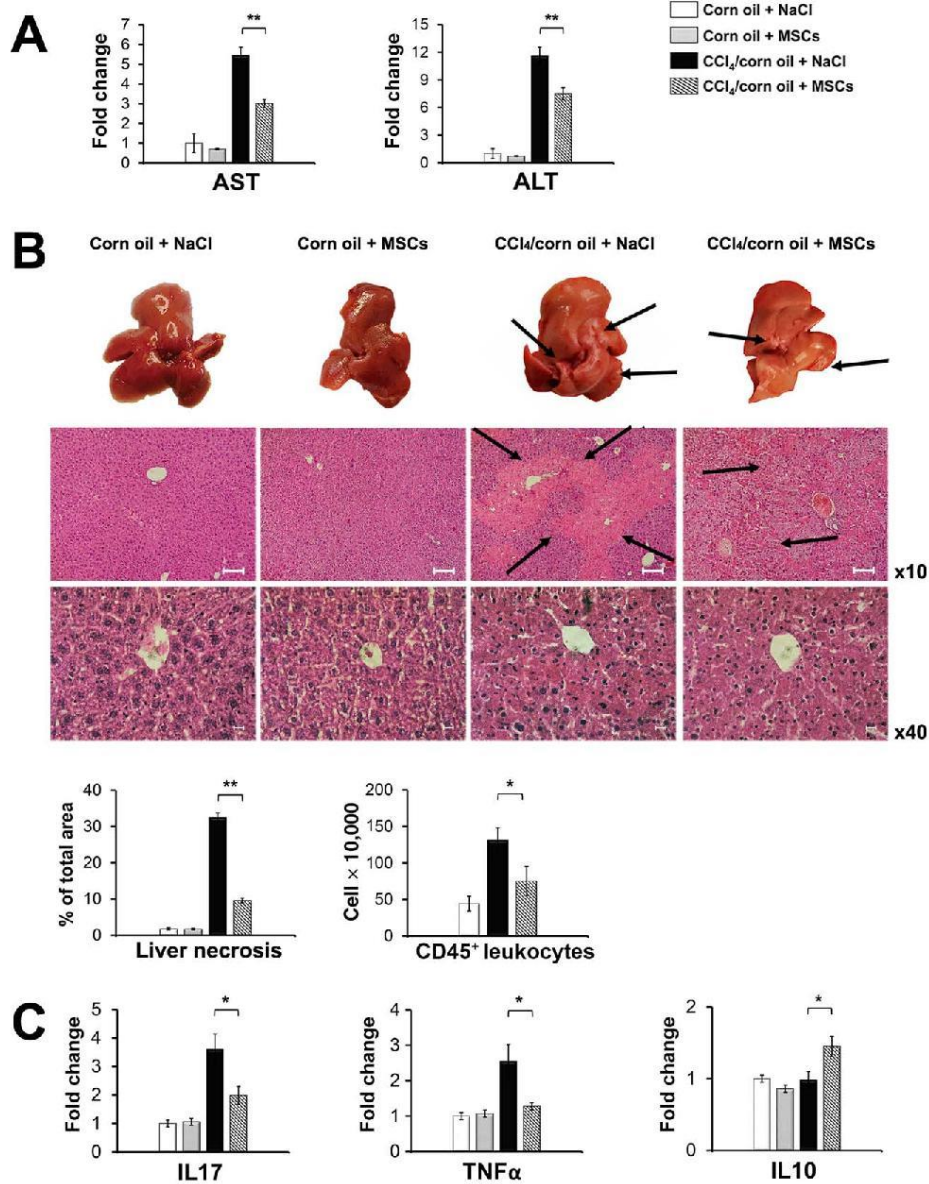
in CCL<sub>4</sub>-treated mice that received MSCs compared with CCL<sub>4</sub>-only treated animals ( $P = 0.047$ ). This was associated with lower levels of hepatotoxic TNF $\alpha$  ( $P = 0.03$ ) and significantly higher levels of immunosuppressive and hepatoprotective IL10 ( $P = 0.04$ ) in sera of CCL<sub>4</sub>+MSCs mice (Fig. 1C).

### MSCs SIGNIFICANTLY REDUCE THE NUMBER OF IL17-PRODUCING NKT CELLS, BUT DID NOT ALTER THE PRESENCE OF IL17-PRODUCING NEUTROPHILS, CD4<sup>+</sup>, AND CD8<sup>+</sup> T LYMPHOCYTES IN THE LIVER OF CCL<sub>4</sub>-TREATED MICE

In order to dissect out cellular target of MSC-dependent modulation of IL17-driven inflammation in the CCL<sub>4</sub>-induced liver injury, flow cytometry analysis of liver-infiltrated leukocytes was performed. Intracellular staining of hepatic-infiltrating neutrophils and MNCs obtained from CCL<sub>4</sub>-treated mice revealed that the vast majority of IL17-producing inflammatory cells in the injured livers were NKT cells. Accordingly, MSC-mediated attenuation of IL17 production in CCL<sub>4</sub>-induced liver damage was mainly a consequence of MSC-dependent down-regulated production of IL17 in the liver NKT cells. There was a significantly lower number of IL17-producing (CD3 + CD49b+) NKT cells ( $P = 0.04$ ) in CCL<sub>4</sub>+MSC-treated mice compared with animals treated with CCL<sub>4</sub> only (Fig. 2A). On the contrary, there was no significant difference in the total number of liver infiltrating IL17-producing (CD45 + Ly6-G+) neutrophils (Fig. 2B), CD4<sup>+</sup>, and CD8<sup>+</sup> (CD3 + CD49b-) T lymphocytes between CCL<sub>4</sub> and CCL<sub>4</sub>+MSC treated mice (Fig. 2C,D).

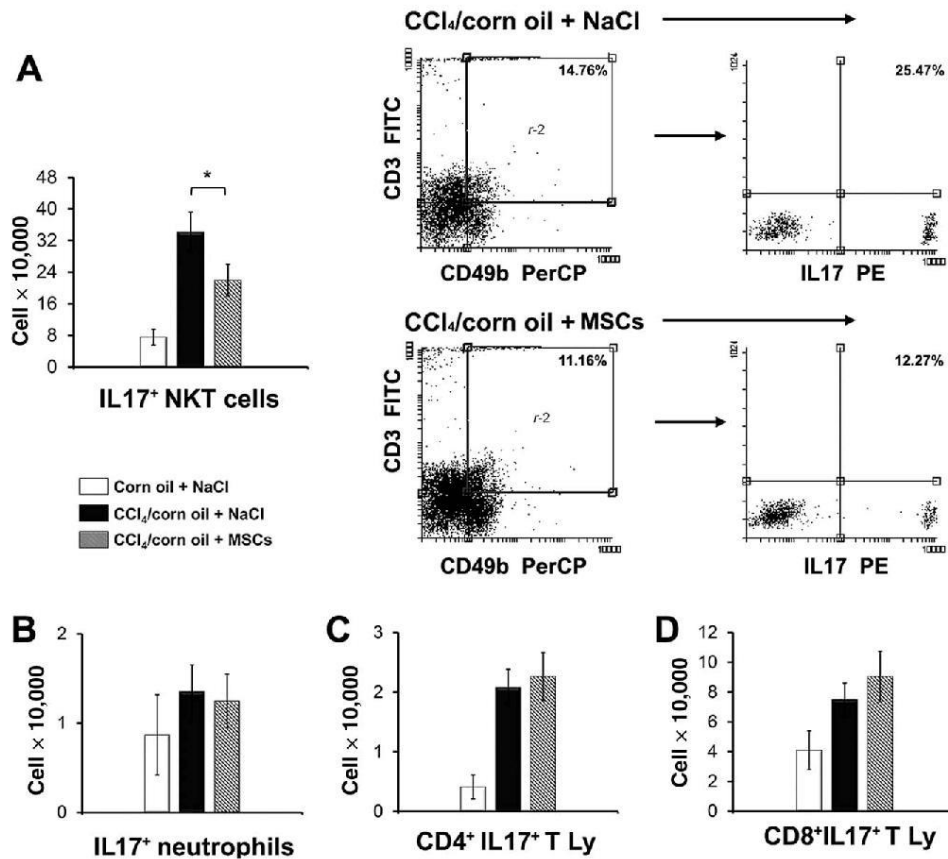
### IN NKT-CELL DEPENDENT MODEL OF ACUTE LIVER FAILURE, MSCs REDUCED TOTAL NUMBER OF IL17 + NKT CELLS AND INCREASED PRESENCE OF FOXP3 + IL10+NKT CELLS

Because we have demonstrated that MSCs significantly attenuate IL17-driven acute liver inflammation mainly by affecting production of IL17 in NKT cells, we further investigated this phenomenon in  $\alpha$ -GalCer-induced liver injury, a well-established model



**FIG. 1.** MSCs ameliorate CCl<sub>4</sub>-induced acute liver injury. (A) Serum AST and ALT levels, (B) Macroscopic appearance of the liver and representative H & E-stained mouse livers (upper panel; magnification  $\times 10$  and  $\times 40$ ). Semiquantitative determination of liver injury estimated by Autodesk AutoCAD 2009 software (lower panel left) and total number of CD45<sup>+</sup>leukocytes in the liver (lower panel right) as determined by flow cytometry. (C) The level of cytokines in serum. Data presented as mean  $\pm$  SEM; n = 10 mice per group. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .



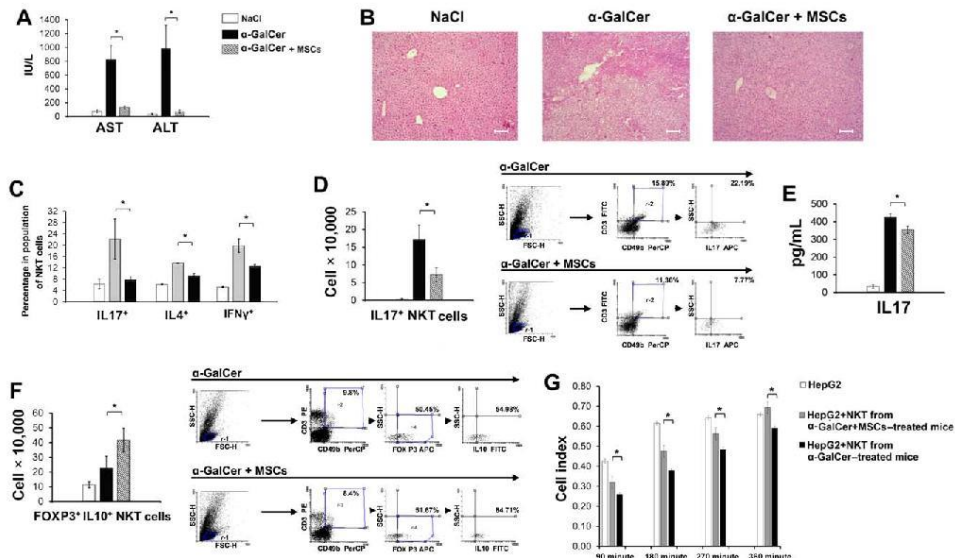


**FIG. 2.** MSCs reduce influx of IL17-producing NKT cells in the liver of CCl<sub>4</sub>-treated mice. (A) Total numbers of liver infiltrating IL17-producing CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup> NKT cells with representative dot plots; total numbers of liver infiltrating IL17-producing (B) CD45<sup>+</sup>Ly6-G<sup>+</sup> neutrophils, (C) CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and (D) CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells in CCl<sub>4</sub> and CCl<sub>4</sub>+MSC-treated mice. Data presented as mean ± SEM; n = 10 mice per group. \**P* < 0.05.

of acute liver failure that is mediated by  $\alpha$ -GalCer-activated liver NKT cells.<sup>(10)</sup>

A single intravenous administration of MSCs significantly reduced NKT-cell dependent liver damage, as confirmed by liver enzyme tests and histological analysis. As it is shown in Fig. 3A, MSCs significantly decreased serum levels of ALT (*P* = 0.04) and AST (*P* = 0.01) in  $\alpha$ -GalCer-treated mice that correlated with markedly reduced necrosis of hepatocytes (Fig. 3B).

Intracellular staining revealed that MSC treatment managed to significantly reduce production of all inflammatory cytokines (IL17, interferon gamma [IFN $\gamma$ ], IL4) in liver NKT cells and that most of the NKT cells produce IL17 (Fig. 3C). Accordingly, MSCs attenuated the total number of liver-infiltrating IL17-producing NKT cells (*P* = 0.02; Fig. 3D) and down-regulated serum levels of IL17 (*P* = 0.04; Fig. 3E).



**FIG. 3.** MSC treatment attenuates the presence of hepatotoxic IL17<sup>+</sup> NKT cells and increases the presence of protective FOXP3<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> NKT cells in NKT cell-dependent model of acute liver failure. (A) Serum AST and ALT levels and (B) representative H & E-stained mouse livers. (C) Percentage of IL17<sup>+</sup>, IL4<sup>+</sup>, and IFN $\gamma$ <sup>+</sup> producing cells in the population of NKT cells; (D) Total number of IL17<sup>+</sup> producing NKT cells in liver with representative dot plots; (E) Serum levels of IL17; (F) Total number of liver-infiltrating IL10<sup>+</sup>-producing FOXP3<sup>+</sup> regulatory NKT cells with representative dot plots; (G) The results obtained by xCELLigence system showed less cytotoxic activity of liver NKT cells isolated from mice treated with  $\alpha$ -GalCer and MSCs. Data presented as mean  $\pm$  SEM; n = 10 mice group. \* $P$  < 0.05.

Interestingly, a reduced number of IL17-producing NKT cells in the livers of  $\alpha$ -GalCer+MSC-treated mice was accompanied with a significantly higher number of FOXP3<sup>+</sup> IL10<sup>+</sup> regulatory NKT cells ( $P$  = 0.04; Fig. 3E), indicating that MSC-mediated beneficial effects were related to the MSC-dependent modulation of the balance between interleukin 17-producing natural killer T (NKT17) and regulatory NKT cells within the liver.

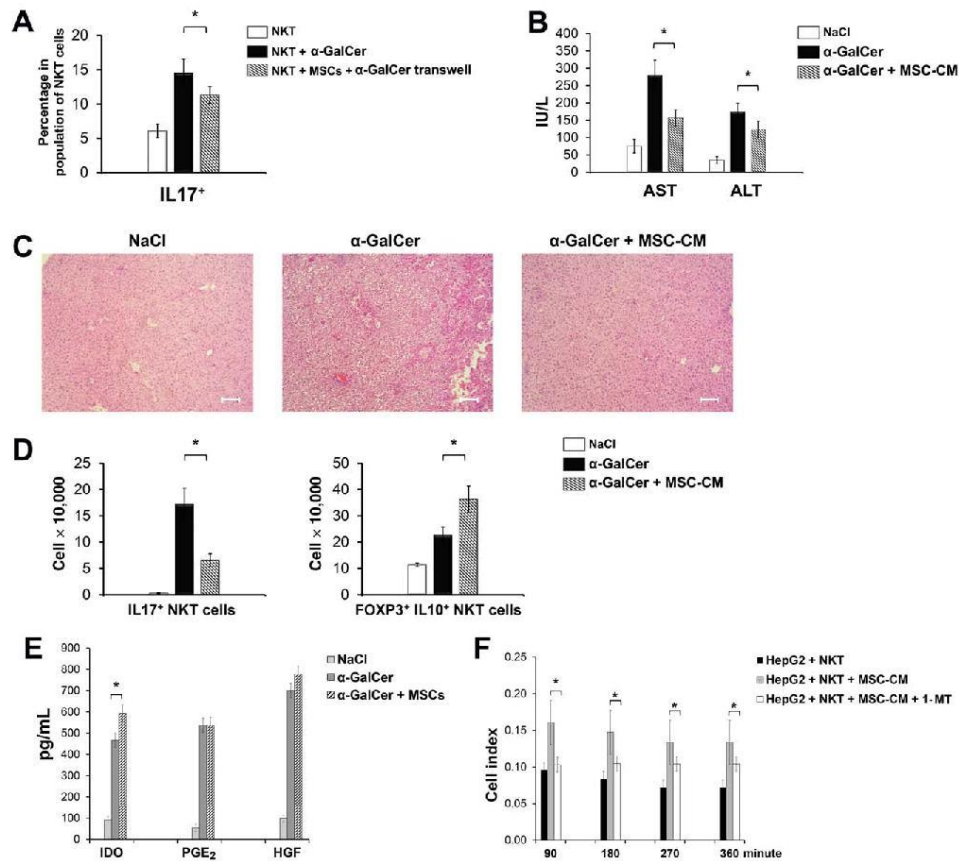
### MSCs SIGNIFICANTLY REDUCED HEPATOTOXICITY OF LIVER NKT CELLS

In order to further demonstrate that MSC-mediated suppression of IL17 production in NKT cells correlate with their capacity to directly induce damage of hepatocytes, we analyzed the cytotoxicity of NKT cells in vitro by using the xCELLigence system for monitoring

real-time cytotoxicity. As it is shown in Fig. 3G, NKT cells isolated from  $\alpha$ -GalCer+MSC-treated mice were significantly ( $P$  = 0.03) less cytotoxic against HepG2 cells than NKT cells isolated from animals treated with  $\alpha$ -GalCer only, indicating that MSC treatment managed to significantly reduce hepatotoxic potential of liver NKT cells as well.

### MSCs AFFECT THE CAPACITY OF NKT CELLS TO PRODUCE IL17 IN PARACRINE MANNER

In order to investigate whether cell-to-cell contact was required for MSC-dependent suppression of IL17 production in NKT cells and their attenuated hepatotoxicity, cocultures were performed in a transwell system where MSCs and liver NKT cells were separated by a membrane permeable to soluble molecules.



**FIG. 4.** MSCs affect the capacity of NKT cells to produce IL17 in an IDO-dependent manner. (A) Percentage of IL17-producing NKT cells cocultured with MSCs in transwell systems; (B) serum AST and ALT levels; (C) representative H & E-stained liver samples; (D) total number of liver infiltrating IL17-producing NKT cells; and (E) IL10-producing FOXP3 + regulatory NKT obtained from control,  $\alpha$ -GalCer, and  $\alpha$ -GalCer+MSC-CM treated mice; (F) Serum levels of IDO, PGE<sub>2</sub>, and HGF in  $\alpha$ -GalCer, and  $\alpha$ -GalCer + MSC treated mice. (G) Cytotoxic potential of NKT cells against the HepG2 hepatocyte cells in vitro as determined by xCELLigence system. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM of 10 mice per group and are pooled from 2 independent experiments. \* $P < 0.05$ .

Intracellular staining revealed that in vitro  $\alpha$ -GalCer-activated NKT cells cultured with MSCs in a transwell system expressed significantly ( $P = 0.02$ ) lower amounts of IL17 (Fig. 4A), indicating that MSCs reduce production of IL17 in NKT cells in paracrine manner.

To directly demonstrate that soluble factors were responsible for the MSC-mediated inhibition of IL17

production in NKT cells in vivo, mice were intravenously given MSC-CM and effects were similar to those observed after injection of MSCs. Intravenous injection of MSC-CM significantly down-regulated serum levels of AST ( $P = 0.02$ ) and ALT ( $P = 0.01$ ; Fig. 4B) and reduced hepatocyte damage (Fig. 4C) in  $\alpha$ -GalCer-treated mice. Additionally, MSC-CM managed to significantly attenuate the total number of

liver IL17-producing NKT cells (Fig. 4D) and significantly ( $P=0.04$ ) increased the presence of FOXP3+IL10 + regulatory NKT cells in the liver of  $\alpha$ -GalCer-treated mice (Fig. 4E), confirming that MSCs affect production of IL17 and IL10 as well as expression of FOXP3 in NKT cells in paracrine manner.

### MSC-MEDIATED ATTENUATION OF NKT CELL HEPATOTOXICITY IS IDO-DEPENDENT

Because there is growing evidence that among MSC-derived soluble factors, IDO, PGE<sub>2</sub>, and HGF are main mediators of MSC-mediated inhibition of cytokine production in immune cells,<sup>(15-17)</sup> these immunosuppressive factors were measured in the sera of MSC-treated mice with acute liver injury (Fig. 4F). Serum levels of IDO were significantly ( $P=0.03$ ) higher in  $\alpha$ -GalCer+MSC-treated mice, although there was no difference in the levels of PGE<sub>2</sub> and HGF between MSC-treated and non-treated animals with acute liver failure.

In line with results obtained *in vivo*, MSC-CM also significantly ( $P=0.03$ ) attenuated hepatotoxicity of NKT cells *in vitro* (Fig. 4G), confirming that MSCs attenuated hepatotoxicity of NKT cells in a paracrine manner. Importantly, blockade of IDO activity completely abrogated the hepatoprotective capacity of MSC-CM. MSC-CM that contained IDO inhibitor (1-MT) did not manage to attenuate cytotoxicity of liver NKT cells against HepG2 cells, suggesting that MSC-mediated attenuation of NKT cell hepatotoxicity is IDO-dependent.

## Discussion

NKT cells, the most abundantly present in the murine liver,<sup>(18-20)</sup> are the major effector cells in the pathogenesis of acute liver failure. The population of IL17-producing NKT cells, characterized by expression of transcriptional factor RAR-related orphan receptor gamma T (ROR $\gamma$ T), are known as NKT17 cells and are considered a major IL17-producing population of cells in the pathogenesis of acute hepatitis. Additionally, IL17 signaling is important for neutrophil, CD4+, and CD8 + T cell-mediated hepatotoxicity as well. In line with these findings, we showed that MSC-mediated attenuation of acute hepatitis, followed by down-regulated serum levels of IL17, were mainly a consequence of MSC-mediated suppression of IL17 production in liver NKT cells, whereas the

capacity of neutrophils and T lymphocytes for IL17 secretion was not altered by MSC therapy.

NKT cells, activated with  $\alpha$ -GalCer, rapidly produce IL17 that in turn affect infiltration of other immune cells in the liver.<sup>(21)</sup> Accordingly, transplantation of MSCs as well as injection of MSC-CM managed to attenuate the capacity of liver NKT cells to produce IL17, which was followed by reduced infiltration of inflammatory cells in the CCl<sub>4</sub>-injured and  $\alpha$ -GalCer-injured livers (Figs. 1B, 3C, and 4D). These findings indicate that MSCs may suppress NKT17 cells in a paracrine manner and that cell-to-cell contact was not required for their modulation of the IL17 pathway in the liver.

During  $\alpha$ -GalCer-induced liver injury, IL10-producing FOXP3 + regulatory T cells (Tregs) have been recruited to the liver where they suppress hepatic inflammation and immune response.<sup>(22)</sup> It is well known that dynamic changes in the frequencies of T helper (T<sub>h</sub>) 17 and Tregs significantly affect outcome of acute hepatitis<sup>(23)</sup> and that an imbalance of the Treg/T<sub>h</sub>17 ratio is usually linked to the progression of hepatitis.<sup>(24)</sup> Herewith, we showed that MSC-dependent suppression of NKT17 cells in the liver was accompanied with increased presence of hepatoprotective FOXP3 + IL10 producing NKT regulatory cells (Fig. 3D) and elevated serum levels of immunosuppressive IL10 (Fig. 1C), indicating that beneficial effects of MSC therapy in acute hepatitis is closely related to the modulation of the balance between NKT17 and regulatory NKT cells within the liver.

Progressive inflammatory diseases are associated with the loss of T<sub>h</sub>17 cells and a reciprocal increase in the fraction of the immunosuppressive T regulatory cells both in peripheral blood and in inflamed tissues.<sup>(25)</sup> IDO, a potent immunosuppressive enzyme, has been identified as a critical molecular switch that stimulates immunosuppressive properties of Tregs and simultaneously blocks reprogramming of Tregs into IL17-producing effector T cells.<sup>(26)</sup> IDO inhibition or genetic deletion led to the reduced generation of Tregs and an increase in T<sub>h</sub>17 differentiation both *in vitro* and *in vivo*.<sup>(26)</sup>

Under T<sub>h</sub>1 and T<sub>h</sub>2 conditions, IDO plays a key role in human MSC-mediated immunomodulation, whereas murine MSCs have lower IDO activity and usually use inducible nitric oxide synthase-mediated immunomodulation.<sup>(16,27,28)</sup> However, under T<sub>h</sub>17 conditions, murine MSCs do not produce nitric oxide, and their immunosuppressive effects are mediated through the production of other mediators, including

IDO. MSCs are able to suppress the generation of effector  $T_{H17}$  cells in IDO-dependent manner, and IDO inhibitors could be used to restore MSC suppression of  $T_{H17}$  differentiation.<sup>(29)</sup> In line with these findings, we found that a MSC-mediated increase of the natural killer T regulatory (NKTreg)/NKT17 ratio in acute hepatitis correlated with increased serum levels of IDO and that MSC-dependent attenuation of NKT cell hepatotoxicity is IDO dependent.

In conclusion, the capacity of MSCs to alter the NKT17/NKTreg ratio and suppress hepatotoxicity of NKT cells in an IDO-dependent manner may be used as a new therapeutic approach in IL17-driven liver inflammation.

## REFERENCES

- Lafdil F, Miller AM, Ki SH, Gao B. Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases. *Cell Mol Immunol* 2010;7:250-254.
- Lemmers A, Moreno C, Gustot T, Maréchal R, Degré D, Demetter P, et al. The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* 2009;49:646-657.
- Furuya S, Kono H, Hara M, Hirayama K, Sun C, Fujii H. Interleukin 17A plays a role in lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced fulminant hepatic injury in mice. *J Surg Res* 2015;199:487-493.
- Yan S, Wang L, Liu N, Wang Y, Chu Y. Critical role of interleukin-17/interleukin-17 receptor axis in mediating Con A-induced hepatitis. *Immunol Cell Biol* 2012;90:421-428.
- Volarevic V, Nurkovic J, Arsenijevic N, Stojkovic M. Concise review: therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis. *Stem Cells* 2014;32:2818-2823.
- Gazdic M, Volarevic V, Arsenijevic N, Stojkovic M. Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem Cell Rev* 2015;11:280-287.
- Linero I, Chaparro O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. *PLoS One* 2014;9:e107001.
- Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med* 2009;41:315-324.
- Tan Z, Qian X, Jiang R, Liu Q, Wang Y, Chen C, et al. IL-17A plays a critical role in the pathogenesis of liver fibrosis through hepatic stellate cell activation. *J Immunol* 2013;191:1835-1844.
- Volarevic V, Markovic BS, Bojic S, Stojanovic M, Nilsson U, Leffler H, et al. Gal-3 regulates the capacity of dendritic cells to promote NKT-cell-induced liver injury. *Eur J Immunol* 2015;45:531-543.
- Volarevic V, Milovanovic M, Arsenijevic N, Lukic M. A new semi-quantitative method for determining liver damage after concanavalin A administration. *Ser J Exp Clin Res* 2009;11:45-48.
- Blom KG, Qazi MR, Matos JB, Nelson BD, DePierie JW, Abedi-Valugerdi M. Isolation of murine intrahepatic immune cells employing a modified procedure for mechanical disruption and functional characterization of the B, T and natural killer T cells obtained. *Clin Exp Immunol* 2008;155:320-329.
- Krampera M, Galipeau J, Shi Y, Tarte K, Senses L, for MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy* 2013;15:1054-1061.
- Wang S, Zhang X, Ju Y, Zhao B, Yan X, Hu J, et al. Micro-RNA-146a feedback suppresses T cell immune function by targeting Stat1 in patients with chronic hepatitis B. *J Immunol* 2013;191:293-301.
- Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 2008;111:1327-1333.
- Meisel R, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* 2004;103:4619-4621.
- Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99:3838-3843.
- Johnston B, Kim CH, Soler D, Emoto M, Butcher EC. Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR alpha beta NKT cell subsets. *J Immunol* 2003;171:2960-2969.
- Subramanian M, Kini R, Madasu M, Ohta A, Nowak M, Exley M, et al. Extracellular adenosine controls NKT-cell-dependent hepatitis induction. *Eur J Immunol* 2014;44:1119-1129.
- Nagy L. Would eating carrots protect your liver? A new role involving NKT cells for retinoic acid in hepatitis. *Eur J Immunol* 2012;42:1677-1680.
- Wondimu Z, Santodomingo-Garzon T, Le T, Swain MG. Protective role of interleukin-17 in murine NKT cell-driven acute experimental hepatitis. *Am J Pathol* 2010;177:2334-2346.
- Santodomingo-Garzon T, Han J, Le T, Yang Y, Swain MG. Natural killer T cells regulate the homing of chemokine CXCR3-positive regulatory T cells to the liver in mice. *Hepatology* 2009;49:1267-1276.
- Cheng X, Shan YY, Luo YW. Dynamic change in Th17/regulatory T cell ratio in peripheral blood of patients with acute hepatitis B and its significance [in Chinese]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 2016;24:565-568.
- Xue-Song L, Cheng-Zhong L, Ying Z, Mo-Bin W. Changes of Treg and Th17 cells balance in the development of acute and chronic hepatitis B virus infection. *BMC Gastroenterol* 2012;12:43.
- Favre D, Mold J, Hunt PW, Kanwar B, Loke P, Seu L, et al. Tryptophan catabolism by indoleamine 2,3-dioxygenase 1 alters the balance of TH17 to regulatory T cells in HIV disease. *Sci Transl Med* 2010;2:32ra36.
- Matteoli G, Mazzini E, Iliev ID, Mileti E, Fallarino F, Puccetti P, et al. Gut CD103+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase which influences T regulatory/T effector cell balance and oral tolerance induction. *Gut* 2010;59:595-604.
- Ren G, Su J, Zhang L, Zhao X, Ling W, L'huillier A, et al. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells* 2009;27:1954-1962.
- Ling W, Zhang J, Yuan Z, Ren G, Zhang L, Chen X, et al. Mesenchymal stem cells use IDO to regulate immunity in tumor microenvironment. *Cancer Res* 2014;74:1576-1587.
- Tatara R, Ozaki K, Kikuchi Y, Hatanaka K, Oh I, Meguro A, et al. Mesenchymal stromal cells inhibit Th17 but not regulatory T-cell differentiation. *Cytotherapy* 2011;13:686-694.