



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Александар Јушковић

**Утицај комбинованог третмана алогеним
матичним ћелијама из масног ткива и
хипербаричном оксигенацијом на прогресију
експерименталног гонартритиса код пацова**

докторска дисертација

Крагујевац, 2022.



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Aleksandar Jušković

**Uticaj kombinovanog tretmana alogenim
matičnim ćelijama iz masnog tkiva i
hiperbaričnom oksigenacijom na progresiju
eksperimentalnog gonartristisa kod pacova**

doktorska disertacija

Kragujevac, 2022.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Aleksandar Juskovic

**The effect of combined treatment with
allogeneic stem cells from adipose tissue
and hyperbaric oxygenation on the
progression of experimental gonarthritis in
rats**

doctoral dissertation

Kragujevac, 2022.

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

I Аутор
Име и презиме: Александар Јушковић 111/2011 Са
Датум и место рођења: 16.01.1966. године, Бијело Поље
Садашње запослење: Клинички центар Црне Гора, Клиника за ортопедију и трауматологију
II Докторска дисертација
Наслов: Утицај комбинованог третмана алогеним матичним ћелијама из масног ткива и хипербаричном оксигенацијом на прогресију експерименталног гонартритиса код пацова
Број страница: 46
Број слика: 4 слике, 1 табела, 7 графикона
Број библиографских података: 116
Установа и место где је рад израђен: Лабораторија за кардиоваскуларну физиологију, Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу
Научна област (УДК): Медицина
Ментори: Проф. др Биљана Љујић, ванредни професор Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу Доц. др Александар Матић, доцент Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
III Оцена и одбрана
Датум пријаве теме: 11.06.2019. године
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-754/3 од 02.10.2019. године
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
1. Доц. др Марина Газдић Јанковић , доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Генетика, председник
2. Доц. др Иван Срејовић , доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Физиологија, члан
3. Проф. др Милан Петронијевић , редовни професор Медицинског факултета Војномедицинске академије Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Интерна медицина, члан
Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације:
Датум одбране дисертације:

IDENTIFIKACIONA STRANICA DOKTORSKE DISERTACIJE

I Autor
Ime i prezime: Aleksandar Jušković
Datum i mesto rođenja: 16.01.1966. godine, Bijelo Polje
Sadašnje zaposlenje: Klinički centar Crne Gora, Klinika za ortopediju i traumatologiju
II Doktorska disertacija
Naslov: Uticaj kombinovanog tretmana alogenim matičnim ćelijama iz masnog tkiva i hiperbaričnom oksigenacijom na progresiju eksperimentalnog gonartristisa kod pacova
Broj stranica: 46
Broj slika: 4 slika, 1 tabele, 7 grafikona
Broj bibliografskih podataka: 116
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Centar za molekulska medicinu i istraživanje matičnih ćelija; Laboratorija za kardiovaskularnu fiziologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu
Naučna oblast (UDK): Medicina
Mentori: Prof. dr Biljana Ljujić, redovni profesor Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu Doc. dr Aleksandar Matić, docent Fakulteta medicinskih nauka, Univerziteta u Kragujevcu
III Ocena i odbrana
Datum prijave teme: 11.06.2019. godine
Broj odluke i datum prihvatanja doktorske disertacije: IV-03-754/3 od 02.10.2019. godine
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata:
1. Doc. dr Marina Gazdić Janković, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Genetika, predsednik
2. Doc. dr Ivan Srejić, docent Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu za užu naučnu oblast Fiziologija, član
3. Prof. dr Milan Petronijević, redovni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu za užu naučnu oblast Interna medicina, član
Komisija za ocenu i odbranu doktorske disertacije:
Datum odbrane disertacije:

DOCTORAL DISSERTATION IDENTIFICATION PAGE

I Author
Name and surname: Aleksandar Jušković
Date and place of birth: 16.01.1966 year, Bijelo Polje
Current employment: Clinical Center of Montenegro, Clinic for Orthopedics and Traumatology
II Doctoral Dissertation
Title: The effect of combined treatment with allogeneic stem cells from adipose tissue and hyperbaric oxygenation on the progression of experimental gonarthritis in rats
No. of pages: 46
No. of images: 4 pictures, 1 table, 7 charts
No. of bibliographic data: 116
Institution and place of work: The Centar for molecular medicine and stem cell research; Laboratory for Cardiovascular Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDC): Medicine
Mentors: Prof. dr Biljana Lujic, Associate Professor at the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac Asst. dr Aleksandar Matić, assistant professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
III Grade and Dissertation Defense
Topic Application Date: 11.06.2019.
Decision number and date of acceptance of the doctoral dissertation topic: IV-03-754/3, 02.10.2019.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:
1. Asst. Dr. Marina Gazdić Janković, assistant professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Genetics, president
2. Asst. Dr. Ivan Srejović, assistant professor of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac for the narrow scientific field of Physiology, member
3. Prof. Dr. Milan Petronijević, full professor of the Medical Faculty of the Military Medical Academy of the University of Defense in Belgrade for the narrow scientific field of Internal Medicine, member.
Commission for evaluation and defense of doctoral dissertation:
Date of Dissertation Defense:

САЖЕТАК

Благотворно дејство хипербаричне оксигенације (НВО) у инфламаторним процесима чини га атрактивном врстом лечења хроничног артритиса. Ефекти комбиноване терапије засноване на примени алогених матичних ћелија масног ткива (ADS) и НВО на прогресију остеоартритиса (ОА) нису у потпуности истражени.

Актуелна студија је истраживала ефикасност интраартикуларне примене ADS у комбинацији са третманом НВО у моделу ОА пацова.

Модел ОА код пацова индукован је интраартикуларном ињекцијом монојодоацетата (MIA) и 7 дана након примене MIA пацови су подељени у осам група: здрава контрола (CTRL), ОА, ADS, НВО, ADS+НВО21day, ADS+НВО28day, 0,9% NaCl, медијум за узгајање ћелија (MED). 1×10^6 ADS убризгана је у зглоб колена самостално или у комбинацији са НВО третманом. Резултати лечења су процењени радиографском, хистолошком анализом, специфичним бојењем зглобне хрскавице, одређивањем инфламаторних и про/антиоксидативних маркера.

Комбиновани третман значајно побољшава регенерацију хрскавице у коленском зглобу. Rtg скор оштећења коленског зглоба је значајно смањен у групама ADS+НВО21day и ADS+НВО28day у поређењу са ОА. Међутим, позитиван ефекат у ADS+НВО28day групи био је већи него у ADS+НВО21day групи. Зглобна хрскавица је била релативно нормална у групи ADS+НВО28day, али умерена дегенерација је примећена у ADS+НВО21day у поређењу са ОА групом. Ови налази су у складу са хистопатолошким резултатима. Знатно нижи ниво O_2^- примећено је у групи ADS+НВО28day, али и виши ниво NO у поређењу са ADS+НВО21day групом. Штавише, у групи ADS+НВО28day примећене су значајно веће концентрације IL-10, али није било значајне разлике у проинфламаторним цитокинима у узорцима серума.

Ови резултати указују да је једна интраартикуларна ињекција ADS у комбинацији са НВО ефикасно ублажила прогресију ОА.

Кључне речи: адипозне матичне ћелије, хипербарична оксигенација, остеоартритис, натријум јодоацетата, пацови.

ABSTRACT

Hyperbaric oxygenation therapy (HBO) is a promising kind of treatment for chronic rheumatoid arthritis because of its positive effects on inflammatory processes. Furthermore, the effects of combination therapy based on adipose stem cells (ADS) and HBO on the development of osteoarthritis (OA) have not been thoroughly studied.

The goal of the current investigation was to determine if intra-articular injections of ADS and HBO were effective in treating a rat OA model.

The OA rat model was induced by intra-articular injection of monoiodoacetate (MIA), and 7 days after MIA application, rats were divided into eight groups: healthy (CTRL), OA, ADS, HBO, ADS+HBO21day, ADS+HBO28day, 0,9% NaCl, medium (MED). In the knee joint, alone or in combination with HBO, 1×10^6 ADS was administered. Results of treatment were assessed using articular cartilage specific staining, histological and radiographic analysis and determining of inflammatory and pro/antioxidative markers

ADS and HBO together promoted cartilage regeneration in the knee joint. In comparison to the OA, the Rtg score for knee joint damage was significantly lower in the HBO+ADS21day and HBO+ADS28day groups. The HBO+ADS28day group experienced a bigger favorable impact than the HBO+ADS21day group. Cartilage in the HBO+ADS28day group was normal but moderate degeneration was observed in ADS+HBO21day compared to OA group. These results concur with the histological findings. HBO+ADS28day group had a lower O₂ level than HBO+ADS21day group, but a higher NO level and greater IL-10 concentrations, although there was no discernible difference in proinflammatory cytokine levels in serum samples.

An intra-articular injection of ADS and HBO effectively slowed the progression of OA.

Key words: ADMSCs, HBO, monoiodoacetate, osteoarthritis, rats.

САДРЖАЈ

1. УВОД	2
1.1. Остеоартритис	2
1.1.1. Етиологија	2
1.1.2. Патофизиологија	2
1.1.3. Клиничка презентација	3
1.1.4. Медицински преглед	3
1.2. Третман остеоартритиса	4
1.2.1. Хипербарична оксигенација	4
1.2.2. Мезенхималне матичне ћелије	5
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	9
2.1. Главни циљ испитивања	9
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	11
3.1. Етичко одобрење	11
3.2. Експерименталне животиње	11
3.3. Индукција експерименталног гонартритиса	12
3.4. Култивација алогених адипозних мезенхималних матичних ћелија	12
3.4.1. Третман алогеним адипозним мезенхималним матичним ћелијама	12
3.5. Третман хипербаричном оксигенацијом	13
3.6. Жртововање животиња и сакупљање узорака крви	13
3.7. Одређивање клиничког скорa гонартритиса	13
3.8. Радиографска анализа	13
3.9. Пречник колена	14
3.10. Патохистолошка анализа	14
3.11. Одређивање нивоа цитокина у серуму	14
3.12. Генска експресија проинфламаторних и антиинфламаторних маркера	15
3.13. Одређивање параметара оксидационог стреса у плазми и еритроцитима	15
3.14. Процена степена и природе мононуклеарног инфилтрата у зглобу методом имунохистохемије	16
3.15. Статистичка обрада података	16
4. РЕЗУЛТАТИ	18
4.1. Озбиљност артритиса процењена пречником колена	18
4.2. Радиографија остеоартритиса	19
4.3. Ефекат ADS и HBO на репарацију дефекта хрскавице	20
4.4. Параметри оксидативног стреса	23

4.4.1. Прооксидативни маркери.....	23
4.4.2. Ензимски и неензимски антиоксиданси.....	25
4.5. Анализа серумских вредности проинфламаторних и антиинфламаторних citoкина.....	26
4.6. Анализа експресије гена који учествују у развоју експерименталног ОА.....	29
5. ДИСКУСИЈА	31
5.1. Комбинована примена ADS и НВО утиче на репарацију дефекта хрскавице.....	31
5.2. Комбинована примена ADS и НВО делује антиинфламаторно у ОА.....	33
5.3. Комбинована примена ADS и НВО утиче оксидациони статус у ОА	35
6. ЗАКЉУЧЦИ.....	39
7. ЛИТЕРАТУРА.....	41

ЗАХВАЛНИЦА

Посебну захвалност за израду овог доктората дугујем мојој менторки проф. др Биљани Љујић, без чијег залагања, подстицања и огромне стручне и људске енергије не бих успео да овај рад урадим и завршим.

Огромну захвалност дугујем проф. др Владимиру Јаковљевићу за несебичну помоћ и усмјеравање у току рада на докторату.

Захваљујем се др Марини Милетић Ковачевић и др Марини Николић за помоћ у експерименталном раду, обради података и подрици. Захваљујем се др Немањи Јовичићу и др Невени Миљивојевић за помоћ у хистолошкој обради резултата.

I

УВОД

1. УВОД

1.1. Остеоартритис

Остеоартритис (ОА) је хронично запаљење зглобова које се карактерише прогресивном деструкцијом хрскавице, склерозом субхондралне кости, формирањем маргиналних остеофита и променама у саставу синовијалне течности (1). Остеоартритис је најчешћа болест зглобова код одраслих широм света. Једна трећина одраслих има радиолошке знаке остеоартритиса, док клинички значајан остеоартритис колена, шаке или кука има свега 8,9% одраслог становништва (2). Радиолошка демонстрација и типични знаци остеоартритиса колена нису у корелацији са симптомима: само око 15% пацијената са радиолошки доказани остеоартритисом колена се жале на бол у колену (3). Остеоартритис колена је најчешћи тип (6% свих одраслих). Вероватноћа за развој остеоартритиса се повећава са годинама. Студије су показале да остеоартритис колена код мушкараца старости од 60 до 64 године чешћи у десном колену (23%) него у левом колену (16,3%), док је његова дистрибуција равномернија код жена (десно колено - 24,2%; лево колено - 24,7%) (2, 4). Преваленција остеоартритиса колена је већа код 70-74 годишњака, чак и до 40% (5).

Епидемиолошке студије су откриле да постоје како ендогени тако и егзогени фактори ризика за остеоартритис. Генетски фактори несумњиво играју улогу (6). Међутим, у само неколико случајева се остеоартритис приписује дејству једног гена, његов развој и напредовање је чешће због интеракције више гена, у комбинацији са факторима ризика. Студије попречног пресека су показале да је ризик од остеоартритиса колена 1,9 - 13,0 пута већи међу подземним рударима него у контролној популацији (7) указујући на главни фактор ризика рад у клечећем или чучећем положају. Грађевински радници, такође имају значајно повећану преваленцију остеоартритиса колена (8). Прекомерна тежина (ВМТ >30) итекако предствља фактор ризика за остеоартритис колена (9).

1.1.1. Етиологија

Остеоартритис колена, гонартритис је класификован као примарни (идиопатски) или секундарни. Међу разним структурама које чине коленски зглоб, хијалинска зглобна хрскавица је главна мета штетних утицаја који изазивају остеоартритис и управо структура у којој болест почиње. 95% хијалинске хрскавице се састоји од екстрацелуларног матрикса.

1.1.2. Патофизиологија

Динамичка равнотежа између континуираног формирање и разградња матрикса хрскавице је регулисана интеракцијом анаболичких утицаја (нпр. фактори раста

слични инсулину I и II (енгл. *Insullin-like growth factors* - IGF) и катаболичких утицаја (нпр. интерлеукин-1, тумор фактор некрозе алфа (енгл. *Tumor necrosis factor alpha* - TNF- α) и протеиназе). У ограниченем обиму, ови механизми могу елиминисати или надокнадити штетне утицаје који изазивају остеоартритис стимулисањем и модификацијом метаболичке активности хондроцита. Када ови штетни утицаји превазиђу способност система да компензује, долази до деградације матрикса и ово је први корак у развоју остеоартритиса, који може напредује до узрапредовале болести. Иако није сасвим јесно зашто долази до дегенерације хрскавице, сматра се да механички и ензимски фактори оштећују функцију хондроцита и на тај начин оштећују матрикс (10).

1.1.3. Клиничка презентација

Клиничка презентација ОА прогредира од хроничниг бола, морбидитета до инвалидитет код старијих особа (11). Пацијенти који пате од ОА се често жале на бол при кретању, који се обично јавља када се покрене покрет или када пацијент почне да хода, бол се често описује као туп бол. Како остеоартритис напредује, бол постаје непрекидан и функционалност зглоба је озбиљно нарушена.

1.1.4. Медицински преглед

Главни циљ дијагностичке евалуације је да се недвосмислено докаже присуство остеоартритиса. Прецизна дијагноза омогућава одговарајући третман. Главни елементи дијагностичке евалуације су анамнеза, физички преглед, снимање и лабораторијско испитивање.

Свака фаза поремећаја има своје карактеристике физички налази. Бол у колону је водећи симптом, обично се погоршава када се оболело колено покрене и побољшава се када мирује. Упоран бол у мировању или ноћу може бити знак узрапредовалог стања остеоартритиса. Физички преглед треба да обухвати све релевантне налазе, укључујући налазе о инспекцији и палпацији, испитивање опсега покрета и специјалне функционалне тестове када је то потребно (нпр. стабилност лигамената, тестови менискуса, анализа хода). Физички преглед лигамената колена састоји се од испитивања бочних лигамената са варус или валгус стресом и испитивања предњих и задњих укрштених лигамената са фиокер тестом.

Рендгенски снимак се користи и за примарну дијагнозу и за процену прогресије болести. Снимке треба направити у најмање две равни, спреда и бочно. Типична радиолошки знаци остеоартритиса колена који се могу видети на обичном снимку су уграђени у *Kellgren* и *Lawrence*-ов систем оцењивања (12). Допунске радиолошке студије могу подразумевати магнетну резонанцу за дијагнозу хијалинске хрскавице, као и скенирање костију применом ^{99m}Tc ради процене метаболичке активности у субхондралној кости. Ултрасонографија је добар начин да се испита присуство течности.

1.2. Третман остеоартритиса

Остеоартритис је тренутно неизлечива болест, с обзиром да механизам којим настаје и напредује није потпуно разјашњен. Стога је циљ лечења ублажавање знакова и симптома болести и ако је могуће, успорити њено напредовање. Терапијски спектар се креће од општих мера до физиотерапије, ортопедска помагала и ортозе, фармакотерапије и на крају хирургије и рехабилитације. Како је *Mohig* изјавио: „Најбољи третман за остеоартритис колена је превенција” (13). Операција је индикована када су симптоми пацијента у складу са физичким и радиолошким налазима и када сви конзервативни третмани нису дали учинка.

Тренутно доступни третмани за ОА укључују контролу телесне тежине, вежбе и фармаколошки приступ, који се обично састоје од интра-артикуларно убризгавања вискоеластичних додатака и аналгетске терапије која садржи ацетаминофен, салицилате и нестероидне антиинфламаторне лекове (14). Међутим, ови третмани су ефикасни само кратко време и фокусирају се само на привремено ублажавање симптома, а не на патогенезу болести због чега постоје медицинске потребе за трајне третмане који могу модификовати ток болести.

1.2.1. Хипербарична оксигенација

Године 1662., *Henshaw*, британски лекар, први је употребио хипербаричну терапију, постављајући пацијенте у челичну посуду која је била под притиском. Иако је *John Priestly* открио кисеоник још 1775. године, ефикасна терапија компримованим ваздухом замењена је удисањем 100% кисеоника под повећаним притиском, чиме је започета "хипербарична оксигенација". Разлог одлагања хипербаричне оксигенације био је страх од нежељених ефеката на основу рада *Lavoisier* и *Seguin* (1789. године), који су сумњали на токсичне ефекте висококонцентрованог кисеоника. Требало је скоро 100 година док 1878. године *Paul Bert*, који се сматра „оцем хипербаричне физиологије“, није документовао токсичне ефекте хипербаричног кисеоника на централни нервни систем, који су се манифестовали као напади (15) Пола века касније, 1937. године *Behnke* и *Shaw* су први пут успешно употребили хипербарични кисеоник за лечење декомпресијске болести. Године 1955. *Churchill-Davidson* (16) применио је НВО да појача ефекте радијационе терапије код пацијената са карциномом, док је у исто време *Boerema* развио НВО као додаток кардиохирургији, чиме се продужава време застоја циркулације (17). Од тад, НВО има примену за разна медицинска стања, како су патофизиолошки и молекуларни механизми хипербаричног третмана кисеоником постајали све више разјашњени.

НВО означава удисање 100% кисеоника под повишеним амбијенталним притиском између 2 и 3 атмосфере (АТМ) у хипербаричној комори. У директној корелацији са нивоом притиска, кисеоник се физички раствара у плазми повећавајући артеријски рО₂. При притиску од 2 АТМ кисеоник се раствара у плазми што доводи до артеријског рО₂ од око 1400 mmHg, који се може даље подићи на 2000 mmHg при притиску од 3 АТМ. У 3 АТМ, сама количина раствореног кисеоника елиминише потребу за еритроцитима ради оксигенације. Поред тога, притисак кисеоника у ткивима расте у складу са артеријским притиском кисеоника и повишени нивои могу трајати неколико сати (18). Међутим, механизам деловања НВО није само хипероксигенација која се супротставља

хипоксији ткива, већ је заснована на чињеници да је хипербарични кисеоник веома моћан лек.

НВО редистрибуира проток крви изазивајући вазоконстрикцију у регионима са повећаном перфузијом и вазодилатацију у хипоксичним регионима. На молекуларном нивоу НВО делује на очување аденозин трифосфата (енгл. *Adenosine triphosphate* - АТР), регулацију сложених молекуларних каскада које укључују β -2 интегрин и проинфламаторне цитокине, регулацију антиинфламаторних цитокина и фактора раста као и мобилизација матичних ћелија (19). До проблема у средњем уху и назалним синусима може доћи током притиска ако постоји опструкција због отока. Нежељени ефекти хипербаричног кисеоника (парестезије, напади) су веома ретки, ако притисак од 3 АТМ није прекорачен. Чак и ако се појаве, реверзibilни су када се хипербарични кисеоник пребаци на ваздух под притиском (20).

Благотворни ефекти НВО код упалних процеса је чине атрактивним видом лечења код хроничног артритиса (21). Претходне студије су показале да је у синовијалној течности зглобова захваћених артритисом низак ниво парцијалног притиска кисеоника (22). Хипоксични услови подстичу производњу проинфламаторних цитокина и прекомерно ослобађање реактивних кисеоничних врста (енгл. *Reactive oxygen species* - ROS) у инфламаторним зглобовима, што чини више него сигурну индикацију за примену НВО у овом патофизиолошком процесу. Упркос свим овим подацима још увек постоји веома мало студија које проучавају утицај НВО на клиничку слику ГА, док су добијени резултати неусаглашени и контроверзни (23).

1.2.2. Мезенхималне матичне ћелије

Адултне матичне ћелије (енгл. *Adult Stem Cells* - ASCs) карактерише способност самообновљања и могућност диференцијације у ћелије које имају карактеристичну морфологију и специјализовану функцију. ASCs генеришу интермедијерни ћелијски тип или типове пре него што постигну потпуно диференцирано стање. Интермедијерна ћелија се зове прекурсор или прогениторна ћелија. Прогениторне или прекурсорске ћелије фетуса или адултног ткива су делимично диференциране ћелије које се деле и дају диференциране ћелије. За прогениторну ћелију је карактеристично то да је неспецијализована или да има делимичне карактеристике специјализоване ћелије, која је способна да пролази кроз ћелијску деобу, при чему настају две специјализоване ћелије, за разлику од матичне ћелије која се дели асиметричном деобом и даје једну матичну ћелију, која служи за самообнављање и једну која ће даље да диференцира у неку специјализовану ћелију. ASCs су ретке и њихова примарна функција је да одржавају стабилно стање функционисања ћелија тзв. хомеостазу, уз ограничења, да замене ћелије које умиру због повреде или болести. ASCs су расуте у ткивима одраслих особа и понашају се врло различито, у зависности од њиховог локалног окружења. Под локализацијом се подразумева место у ткиву у организму у ком се налазе ASCs, тачније односи се на нишу. Иначе, нише су скривена места која се налазе у близини крвних судова и у којима се налази око 20-30 ASCs које су у контактаној инхибицији, све док не дође до неког стреса (повреда, оксидативни стрес итд.) који доводи до одвајања макар једне ћелије од осталих. Постојање хуманих ASCs до данас је доказано у коштаном сржи, периферној крви, кичменој мождини, фоликулу длаке, епителу дигестивног тракта, скелетном и срчаном мишићу, плућима, ретини, мозгу, јетри, панкреасу, масном ткиву, синовијуму, периостијуму и зубу (24).

Патолог *Cohnheim* приметио је присуство нехематопоеетских матичних ћелија у коштаном сржи у 1867. године. Он је претпоставио да ћелије са *fibroblast-like* морфологијом мигрирају на место повреде и помажу да се регенеришу оштећена ткива. Пионирски рад *Friedenstein* и сарадника 1960. године, који се бавио изолацијом, култивацијом и остеогеном диференцијацијом ћелија изведених из коштане сржи, отворио је ново поље истраживања матичних ћелија. Скоро 20 година касније, *Owen* и *Caplan* уводе термин стромалних матичних ћелија и мезенхималних матичних ћелија (енгл. *Mesenchymal Stem Cells* - MSCs). Док су у овим почетним радовима, MSCs изоловане из адултне коштане сржи, у наредним деценијама, такође су пронађене MSCs у скоро свим адултним ткивима (масном ткиву, синовијуму, дермису, покосницу, млечним зубима), у периферној крви, менструалној крви и чврстим органима (јетра, слезина, плућа). MSCs су ретка и мирна популација у својим нишама у потпуно специјализованим ткивима (25, 26).

MSCs јесу ASCs и настају углавном из перицита, налазе се у периваскуларном окружењу коштане сржи строме и природни су прекурсори кости, хрскавице и масти, као саставних ткива кости. MSCs се могу изоловати из масног ткива, зубне пулпе и крви пупчане врпце. Изолација MSCs из масног ткива и зубне пулпе засниване су на ензиматском разлагању изолованог садржаја, а изолација из крви пупчане врпце, такође, поступком издвајања мононуклеарних ћелија, класичним центрифугирањем (27, 28).

MSCs су адхерентне ћелије које карактерише способност диференцијације у *in vitro* условима у остеобласте, хондроците и адипоците. MSCs показују променљиве нивое експресије неколико молекула: CD105, CD73, стромални антиген 1, CD44, CD90, CD166 (васкуларни ћелијски адхезиони молекул), CD54/CD102 (интрацелуларни адхезиони молекул) и CD49 (веома касни антиген). MSCs немају експресију површинских маркера карактеристична за хематопоеетске ћелије (CD14, CD45 и CD11a/*lymphocyte function-associated antigen 1* (LFA-1)), еритроцитни (гликофорин А) и тромбоцитни и ендотелни ћелијски маркери (CD31) (29).

Главне функционалне карактеристике MSCs, су њихова имуномодулаторна способност, капацитет за самообнову и диференцијацију у ткива мезодермалног порекла. Кроз производњу растворљивих фактора, MSCs могу мењати секреторни профил дендритских ћелије (енгл. *Dendritic Cells* - DCs) резултујући повећаном производњом анти-инфламаторних цитокина интерлеукина - IL-10 и смањеном производњом интерферона-гама (IFN- γ) и IL-12. MSCs може да инхибира Т-ћелијску пролиферацију ангажовањем инхибиторног молекула програмиране смрти (енгл. *Programmed Death 1* - PD-1) својим лигандима PD-L1 и PD-L2, тиме подстиче производњу растворљивих фактора који потискују Т-ћелијску пролиферацију (TGF- β , IL-10) и кроз интеракцију са DCs. MSCs може да повећати број CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Т-регулаторних ћелија које супримирају имуни одговор (30).

1.2.2.1. Адипозне мезенхималне матичне ћелије

Током последњих десет година, признато да маст није само енергетски резервоар, већ и богат извор мултипотентних матичне ћелија. Поткожни масни депои су свеprisутни и лако доступни у великим количинама са минималним инвазивним поступком (липосукција аспирацијом). Липосукција се добро подноси и безбедна је процедура, која доноси велике количине аспириата. Метода је јефтинија и мање инвазивна од изолације матичних ћелија из коштане сржи. Мезенхималне матичне ћелије изоловане из масног ткива (енгл. *Adipose-derived mesenchymal stem cells* - ADMSCs) такође је могуће изоловати из ингвиналних масних јастучића код мишева,

као и из других сисара. Масно ткиво садржи велики број мултипотентне ћелије, што је битан предуслов за терапију на бази матичних ћелија.

ADMSCs имају капацитет да се самостално обнављају и диференцирају у различите ћелије везивног ткива, укључујући хондроците (31). ADSc се у великом броју налазе у масном ткиву и лако се добијају липосукцијом са минималним морбидитетом донорског места (32). Сматра се да су око $1 \pm 10\%$ нуклеисаних ћелија у масном ткиву ADSc, док су само $0,0001 \pm 0,01\%$ нуклеисаних ћелија у коштаном сржи матичне ћелије (33).

ADMSCs су атрактивни кандидати за клиничку примену у обнављању оштећених ткива, поготову што се могу изоловати из лако доступног ткива, а њихова примена не носи никакве етичке проблеме. Оптимална примена ADMSCs у терапијске сврхе подразумевала би добијање хуманог материјала и изолацију ћелија уз минималну штету према пацијенту, могућност умножавања ћелија до великог броја и њихову способност диференцирања у широк спектар ћелијских типова (34, 35). Резултати различитих студија изведених на животињама и клиничка испитивања су показала обећавајуће резултате у терапији ОА након интра-артикуларне примене ADMSCs (36, 37). Недавно је показано да локална апликација ADMSCs у зглоб колена у раној фази експерименталног осеоартритиса инхибира аутофагију хондроцита и у великој мери атенуира осеоартритис (38). Иако је било обећавајућих напредака ка клиничкој употреби ADMSCs, јављали су се бројни проблеми у њиховој примени. Неки од њих су: изолација, начин апликације, хоминг, преживљавање ћелија, што захтева даља истраживања у циљу потенцијалне терапијске користи третмана ADMSCs (39).

Поред солубилних медијатора као што су фактори раста, фактори средине могу играти важну улогу у регулацији раста и диференцијације матичних ћелија. Резултати неких студија указују да ниска концентрација кисеоника (5%), у којој се узгајају ADMSCs може значајно повећати синтезу колагена и сулфатних гликозаминогликана из ADMSCs, али истовремено и инхибирати пролиферацију ових ћелија. Ови налази указују на то да концентрација кисеоника може играти важну улогу у регулацији равнотеже између пролиферације ћелија и њихове биосинтетске активности. Потенцијална употреба кисеоника као "метаболичког прекидача" има значајне импликације и *in vivo* и *in vitro* у контексту ткивног инжењеринга (40).

Зато се у третману ОА поред матичних ћелија (или у комбинацији са њима) као потенцијално ефикасан адјувантни терапијски поступак наводи хипербарична оксигенација (НВО).

II

ЦИЉ

ИСТРАЖИВАЊА

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

2.1. Главни циљ испитивања

Испитати ефекте комбинованог третмана алогеним адипозним матичним ћелијама и хипербаричном оксигенацијом на прогресију експерименталног гонартритиса након интра-артикуларне апликације натријум јодоацетата у зглоб пацова.

У том циљу задали смо следеће специфичне циљеве:

1. Дефинисати и показати разлике у тежини гонартритиса између пацова третираних комбинованим третманом и пацова третираних само једним од третмана, одређивањем клиничког скорa за процену тежине болести.
2. Дефинисати и квантификовати степен дегенерације хрскавице код пацова третираних комбинованим третманом и пацова третираних само једним од третмана.
3. Дефинисати и квантификовати инфламаторне промене у зглобу хистолошким бојењима код пацова третираних комбинованим третманом и пацова третираних само једним од третмана.
3. Испитати експресију гена који посредују у процесу инфламације зглоба: IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, VEGF, IL-1, IL-4, IL-10, IL-13, IL-23, IL-17, IL-18 и IL-23 код пацова третираних комбинованим третманом и пацова третираних само једним од третмана.
4. Утврдити концентрације следећих прооксидационих маркера: водоник пероксида, индекса липидне пероксидације, азот монооксида, супероксид анјон радикала; активност параметара ензимске антиоксидативне заштите: каталазе и супероксид-дизмутазе; и ниво редукованог глутатиона у крви код пацова третираних комбинованим третманом и пацова третираних само једним од третмана.
5. Утврдити ниво цитокина (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, VEGF, IL-1, IL-4, IL-13, IL-23, IL-17, IL-18 и IL-23) у системској циркулацији код пацова третираних комбинованим третманом и пацова третираних само једним од третмана.
6. Утврдити корелацију између свих клиничких, хистолошких и биохемијских варијабли.

III

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Етичко одобрење

Експерименти спровдени на животињама, претходни су одобрени од стране Етичке комисије за заштиту добробити животиња Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу (број одобрења 01-71921). Све експерименталне процедуре су у складу са Дирктивом Европске уније о добробити лабораторијских животиња (2010/63EU), Дирктивом Савета Европких заједница (86/609/EEZ) и начелима добре лабораторијске праксе.

3.2. Експерименталне животиње

У експерименталној студији су коришћени пацови соја *Wistar albino* добијени из одгајалишта за пацове Војномедицинске академије у Београду. У истраживање су укључени пацови мушког пола, старости осам недеља, тежине 250 грама. Животиње су одгајане под стандардним условима који подразумевају собну температуру, смењивање светлости и таме на 12 сати слободан приступ води и храни.

Животиње су сврстане у осам група (по 5 животиња у групи):

1. Здравих пацови – **CTRL група (n=5)**;
2. Пацови са изазваним ОА без било какве терапијске интервенције – **ОА група (n=5)**;
3. Пацови са изазваним ОА на третману алогеним адипозним матичним ћелијама – **ADS група (n=5)**;
4. Пацови са изазваним ОА и на третману хипербаричном оксигенацијом – **НВО група (n=5)**;
5. Пацови са изазваним ОА и на комбинованом третману алогеним адипозним матичним ћелијама и хипербаричном оксигенацијом у трајању од 21 дан – **НВО+ ADS21day група (n=5)**;
6. Пацови са изазваним ОА и на комбинованом третману алогеним адипозним матичним ћелијама и хипербаричном оксигенацијом у трајању од 28 дан – **НВО+ ADS21day група (n=5)**;
7. Пацови са изазваним ОА којима је апликован само физиолошки раствор – **0,9% NaCl група (n=5)**;
8. Пацови са изазваним ОА којима је апликован медијум за узгајање адипозних матичних ћелија – **МЕД група (n=5)**;

3.3. Индукција експерименталног гонартритиса

Експериментални модел гонартритиса пацова индукован је интра-артикуларном апликацијом натријум јодоацетата (*MIA (Sigma, USA)* (41). Од три тестиране дозе натријум јодоацетата (1; 1,5 и 2 mg/kg), одабрана је доза од 2 mg/kg као најефикаснија за индукцију ГА, која је растворена у 50 μ L стерилног физиолошког раствора. Након краткотрајне наркозе (кетамин 100 mg/kg и ксилазил 10 mg/kg, *i.p.*) пацовима је колено задње ноге обријано, дезинфиковано и 50 μ L натријум јодоацетата је убризгано у медијалну страну пателарног лигамента коришћењем инсулинског шприца са иглом од 30 G.

3.4. Култивација алогених адипозних мезенхималних матичних ћелија

За ћелијску културу користили смо ADMSCs *Wistar* пацова купљене од *Cyagen Biosciences Inc.* (Lot Number: 120824L01). ADMSCs ћелије су одржаване у медијуму *MesenPRO RSTMme-dium (GibcoTM, ThermoFisher Scientific)* са додатком 10% феталног говеђег серума (*Gibco*), 100 U/ml пеницилина (*Sigma*, Немачка), 100 μ g/ml стрептомицин (*Sigma-Aldrich* Немачка), 2 mM L-глутамин (*Sigma*, Немачка) и 1 mmol/l неесенцијалних аминокиселина (*Capricorn Scientific GmbH*, Немачка). Ћелије су култивисане на 37°C у атмосфери од 5% CO₂. Медијум културе је потпуно замењен свака 3 дана све док ћелије нису достигле 80% конfluентности након чега су пасажирани. После четврте пасаже, ћелије су одвојене од дна флашка кратководујућим 0,25% трипсин-EDTA (*Gibco*, NY, USA). Ћелије су затим ресуспендоване у 10 ml *MesenPRO RSTM* медијума ради неутралисања трипсина и спречавања оштећења ћелија, а затим центрифугиране на 1500 RPMI током 10 минута. Ћелије су ресуспендоване у 1 ml *MesenPRO RSTM* медијума и вијабилност ћелија је одређена коришћењем трипан-плавог бојења.

3.4.1. Третман алогеним адипозним мезенхималним матичним ћелијама

Пацови из одговарајућих група су према раније утврђеном протоколу 7. дана експеримента, уз коришћење интраперитонеалне комбинације анестетика кетамин-ксилазила (100 mg/kg - 10 mg/kg) примили интраартикуларну ињекцију ADSc у концентрацији од 1×10^6 ћелија ресуспендованих у 60 μ L стерилног физиолошког раствора (42).

3.5. Третман хипербаричном оксигенацијом

Хипербарична оксигенација пацова из одговарајућих група је спроведена у хипербаричној комори за мале животиње (НУВ-С 300, Марибор, Словенија). Пацови су током две недеље, једном дневно (након индукције болести), излагани 100% кисеонику по сат времена, при притиску од 2,5 АТМ и протоку од 7 L/min \pm 10% (43).

3.6. Жртововање животиња и сакупљање узорака крви

Експеримент је трајао 21. дан, након чега су животиње најпре анестезиране диетилетром, а потом је извршена изолација зглобова ногу за даљу анализу. Крв је пунктирана из абдоминалне аорте, а изолован серум и складиштен на -20°C то тренутка анализе.

3.7. Одређивање клиничког скорa гонартритиса

Када су знаци артритиса постали видни, примењен је семиквантитативни систем бодовања за процену тежине артритиса на следећи начин: 0 - нормалан зглоб; 1 - отицање и црвенило зглоба; 2 - отицање целе шапе и 3 - деформација зглобова и/или анкилоза (13). За одређивање тежине и прогресије болести коришћен је акумулативни резултат за сваког пацова (максимална могућа оцена од 9). Ради процене учесталости болести, сматрано је да животиње имају артритис ако је резултат повећан за ≥ 2 поена у поређењу са резултатом на почетку експеримента (44).

3.8. Радиографска анализа

Колено задње десне ноге свих животиња је радиографисано помоћу рендгенске јединице (*Sirona Dental Systems Bensheim*, Немачка) 21. и 28. дана након индукције ГА. Време експозиције је подешено на 0,12 секунди (70kVp, 7mA). Прилагођена опрема је коришћена за постављање ноге под истим углом и растојањем од сензора, ради постизања униформности током радиографије. Уочене промене су процењене семиквантитативно. Узорци ткива су даље коришћени за патохистолошку анализу. Рендгенски снимци су класификовани на основу *Kellgren* и *Lawrence* система (45) као степен 0 (нема: нема радиографских карактеристика ГА), степен 1 (сумњиво: сумњиво сужење зглобног простора и могући остеофити), степен 2 (минимални: присуство дефинитивних остеофита и могуће сужење зглобног простора), степен 3 (умерен: вишеструки остеофити, дефинитивно сужење зглобног простора, склероза, могући деформитет кости) и степен 4 (тешки: велики остеофити, обележено сужење зглобног простора, тешка склероза и дефинитивни коштани деформитет).

3.9. Пречник колена

Пречник колена је мерен коришћењем калибрисаног дигиталног калипера (*World Precision Instruments, Stevenage, UK*) у милиметрима (mm) да би се проценили развојни стадијуми ОА нултог дана (пре МІА ињекције), 21. и 28. дана (после ињекције).

3.10. Патохистолошка анализа

Непосредно након што су животиње жртвоване, десни задњи екстремитет је деартукулисан у зглобу кука, фиксиран у 10% неутралном пуферисаном формалину током 72 сата и дехидриран у серији алкохола. Фиксирани узорци су уграђени у парафинске блокове, исечени на делове дебљине 8 μm и одвојено обојени хематоксилином и еозином и 0,1% сафранином-О брзо зеленом бојом (46). Након тога, плочице су секвенцијално дехидриране у 70%, 80%, 90% и 100% етанолу и очишћене у ксилену. Светлосни микроскоп са припадајућом дигиталном камером (*BX51, Olympus, Japan*) је коришћен за процену хистопатолошких карактеристика зглобне хрскавице. Локализација запаљења квантификована је на следећи начин, скором: 0 - без знакова болести; 1 - благо оштећење хрскавице; 2 - средње оштећење хрскавице; 3 - обимно оштећење хрскавице. За процену интезитета запаљења коришћен је наредни скор: 0 - нема инфилтрата у видном пољу; 1 - мање од 5 појединачних, сигурних мононуклеара; 2 - 5-20 појединачних, сигурних мононуклеара; 3 - више од 20 појединачних, сигурних мононуклеара. Процену степена дегенерације хрскавице зглоба квантификовали смо коришћењем следећег скорa *Osteoarthritis Research Society International (OARSI)* (распон резултата 0–24, од нормалне до најтеже дегенерације). Скорови су израчунати за све ткивне исечке и упоређени са контролом (47).

3.11. Одређивање нивоа цитокина у серуму

Нивои цитокина (IFN- γ , VEGF, TNF- α , IL-1, IL-4, IL-10, IL-13, IL-23, IL-17, IL-18 и IL-23) у серуму пацова мерени су имуноензимским есејима (ELISA) према протоколу (*R&D Systems, Mineapolis, USA*).

3.12. Генска експресија проинфламаторних и антиинфламаторних маркера

Методом кванитативне ланчане реакције полимеразе у реалном времену (енгл. *Quantitative Real Time - Polymerase Chain Reaction* - qRT-PCR) одређивана је експресија гена који посредују у процесу инфламације зглоба. Укупна рибонуклеинска киселина (РНК) је екстрахована из смрзнутих ткивних исечака зглобова колена десне задње ноге користећи TRIzol (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) према упутства произвођача. Укупна РНК (2 μg) је реверзно транскрибована у комплементарну ДНК коришћењем *Thermo Scientific RevrtAid and First Strend cDNA Synthesis kits* у присуству *oligo(dT)* прајмера према упутству произвођача. Метода qRT-PCR је изведен коришћењем *Power SYBR MasterMix (Applied Biosystems)* и mRNA (енгл. *Messenger RNA - mRNA*) специфичних прајмера који су коришћене за експресију IL-1, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10, IL-13, IL-23, IL-17, IL-18 и IL-23. qPCR реакције су започете временом инкубације од 10 минута на 95 °C након чега је уследило 40 циклуса од 95 °C током 15 секунди и 60 °C током 60 секунди у *Mastercycler Ep realplex (Eppendorf, Germany)*. Релативна експресија гена је израчуната према *Schmittgen and Livak* (48).

3.13. Одређивање параметара оксидационог стреса у плазми и еритроцитима

Из изоловане плазме одређивани су показатељи оксидационог стреса (индекс липидне пероксидације (TBARS), азот моноксид NO (у облику нитрита), супероксид анион радикал (O_2^-) и водоник пероксид (H_2O_2)), док су у лизату еритроцита мерени ензими антиоксидационе заштите каталаза (CAT) и супероксид-дизмутаза (SOD) и неензимски антиоксиданс - редуковани глутатион (GSH). Сви поменути параметри су мерени на одговарајућим таласним дужинама спектрофотометријски (UV 1800, *Shimatzu, Japan*).

Ниво O_2^- је мерен реакцијом нитро плавог тетразолјума у TRIS пуферу са узорцима плазме на 530 nm. Као слепа проба послужио је раствор дестиловане воде (49).

Одређивање нивоа H_2O_2 у узорцима плазме заснивало се на оксидацији фенол црвеног водоник пероксидом у реакцији катализованом пероксидазом рена. Користећи дестиловану воду као слепу пробу, мерење је изведено на 610 nm (50).

NO је одређен индиретном методом, одређивањем нитрата (NO_3^-) и нитрита (NO_2^-), тако што је 0,5 ml плазме преципитирано са 200 μl 30% сулфосалицилне киселине, мешано 30 минута и центрифугирано на $3000 \times g$. Додати су поједнаки волумени супернатанта и *Gries* реагенса, који садрже 1% сулфанламида у 5% фосфорне киселине/0,1% нафтален етилендиаминдихидрохлорида и то је инкубирано 10 минута у мраку и измерено на 543 nm (51).

Да бисмо одредили степен пероксидације липида у узорцима плазме, извршили смо мерење TBARS коришћењем 1% тиобрбитуричне киселине у 0,05 NaOH која је инкубирана са плазмом на 100 °C током 15 минута и мерена на 530 nm. Као слепа проба коришћена је дестилована вода (52).

Ниво GSH је базиран на одређивању оксидације GSH са нитробензојевом киселином по *Beutler* методи (53).

Активност CAT је праћена према *Aebi*. Лизат је дилуиран дестилованом водом (1:7 v/v) и третиран хлороформ-етанолом (0,6:1 v/v) ради уклањање хемоглобина. Потом је у узорке додато 50 μl CAT пуфера и 1 ml 10 mM H_2O_2 и измерено на 360 nm (54).

Користећи епинефрин методу по *Beutler*-у, детектовали смо активност SOD. Помешано је укупно 100 μ l лизате и 1 ml карбонтног пуфера, додат је 100 μ l епинефрина и измерено на 470 nm (55).

3.14. Процена степена и природе мононуклеарног инфилтрата у зглобу методом имунохистохемије

У циљу испитивења фенотпских карактеристика мононукларног инфилтрата и процене степана њихове инфилтрције коришћено је имунохистхемијско бојење. Ткивни исечци зглобова су инкубирани са биотинским анти-пацовским F4/80, CD45, CD3, CD68 антителом, а визуелизација је обављена уз помоћ *Rat Specific HRP/DAB Detection IHC Kit-a (Abcam)*. Дистрибуција инфламаторних ћелија у зглобу је праћена микроскопирањем ткивних исечака употребом светлосног микроскопа (*BX51, Olympus, Japan*) са припадајућом дигиталном камером.

3.15. Статистичка обрада података

Добијени резултати анализирани су статистичким пакетом SPSS 22.0. Непараметарски *Mann-Whitney U* тестови или параметарски *Independent Samples T-test* тестови су употребљавани сходно томе да ли су подаци пратили нормалност расподеле, која је проверена *Shapiro-Wilk* тестом. *One-way ANOVA* и *Bonferroni* тест су коришћени за вишеструка поређења параметара системског редокс статуса који су утврђени у узорцима крви у једној временској тачки између четири групе. Поред тога, у нашој студији подаци добијени мерењима временског тока, као што су промене параметара оксидативног стреса током времена (након 21 или 28 дана) анализирани су коришћењем *two-way ANOVA* праћене *Bonferroni posttest* да би се узеле у обзир две варијабле времена и третмана. Резултати су изражени као медијана \pm стандардна грешка. Прихваћене вредности статистичке значајности биле су $p < 0,05$.

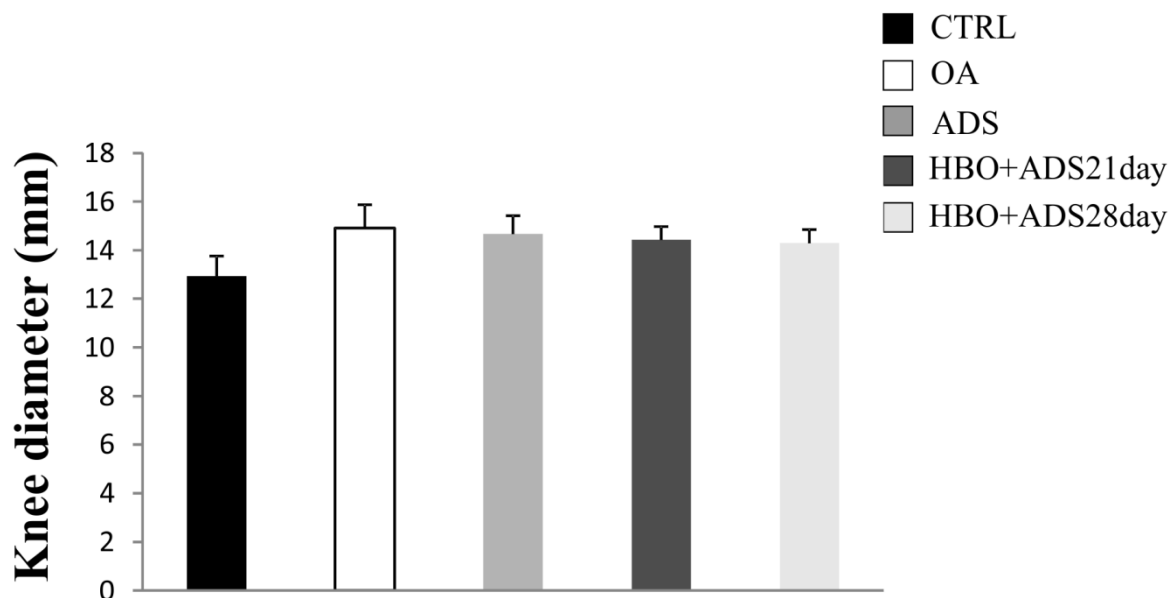
IV

РЕЗУЛТАТИ

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Озбиљност артритиса процењена пречником колена

Наши резултати су показали да је индукција ОА у свим експерименталним групама довела до благог повећања пречника колена (ОА - $14,91 \pm 0,96$; ADS - $14,68 \pm 0,75$; ADS+HBO21day - $14,43 \pm 0,55$; ADS+HBO28day - $14,30 \pm 0,55$) у поређењу са контролном групом - CTRL - $12,94 \pm 0,82$) али без статистички значајних разлика ($p > 0,05$) (Графикон 1). Вредности пречника колена пацова из осталих група: HBO – $14,64 \pm 0,96$; 0,9% NaCl – $14,78 \pm 0,45$; MED $14,54 \pm 0,47$ се такође нису значајно разликовале од контролне групе.



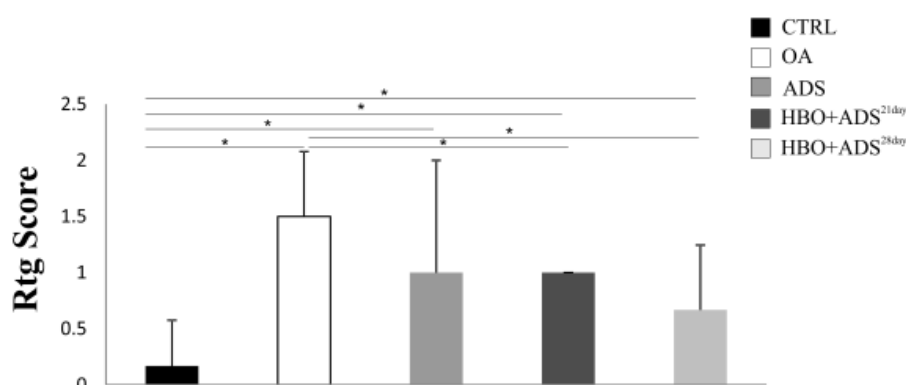
Графикон 1. Промене пречника колена у групама CTRL, OA, ADS, ADS+HBO21day и ADS+HBO28day. Вредности су престављене као средња вредност \pm средња стандардна грешка (SE). * $p < 0,05$ указује на статистички значајне разлике између група.

4.2. Радиографија остеоартритиса

Анализа радиолошких снимака је показала да је ОА група показала прогресивне промене на коленском зглобу током експерименталног периода, док је CTRL група задржала нормалан изглед. Самостална примена ADS је показала благи степен побољшања и зарастања у поређењу са групом без терапијске интервенције (ОА). С друге стране, постојала је значајна разлика у стопи опоравка са комбинованим третманом (ADS+HBO) у поређењу са здравом контролном групом и ОА групом животиња, посебно у групи комбинованог третмана у трајању од 28 дана (ADS+HBO28day) (Слике 1 и Графикон 2). Док код пацова са ОА третраних са стерилним физиолошким раствором и медијумом за култивацију ADS, као и оних третраних са само HBO није забележен опоравак.



Слика 1. Репрезентативне радиографске слике група CTRL, ОА, ADS, ADS+HBO21day, ADS+HBO28day.

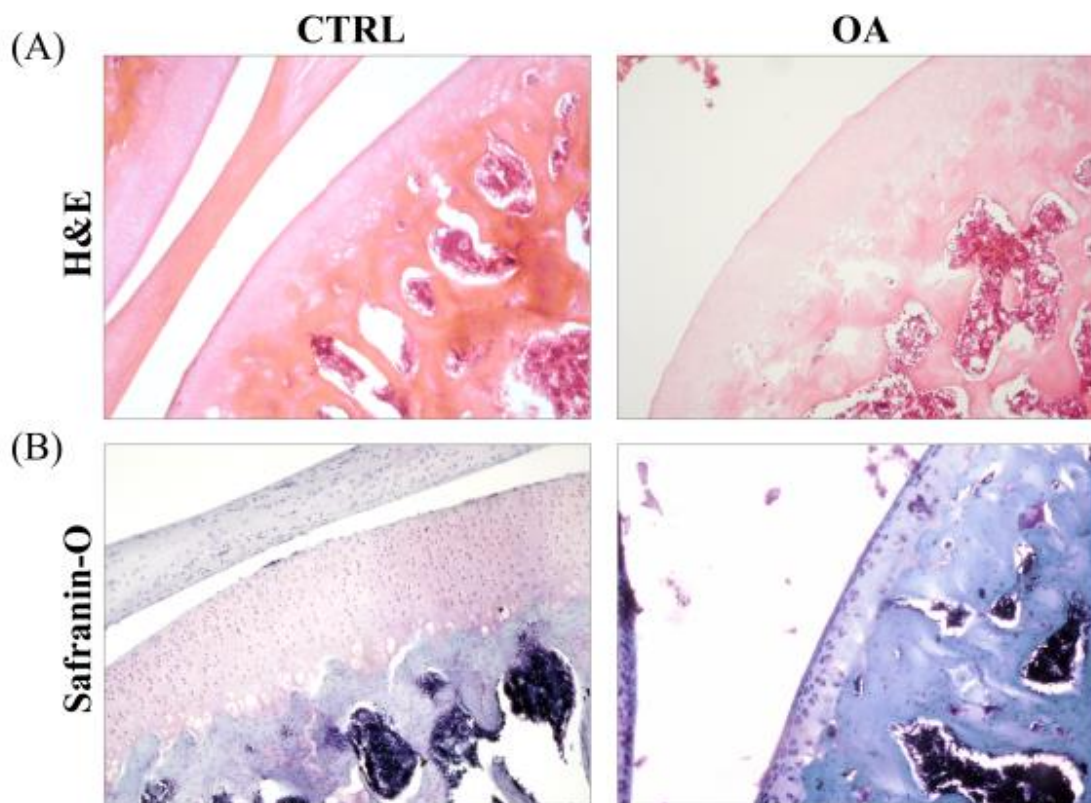


Графикон 2. Графичка анализа зглобова колена у групама CTRL, ОА, ADS, ADS+HBO21day, ADS+HBO28day. Вредности су престављене као средња вредност ± средња стандардна грешка (SE). * $p < 0,05$ указује на статистички значајне разлике између група.

4.3. Ефекат ADS и HBO на репарацију дефекта хрскавице

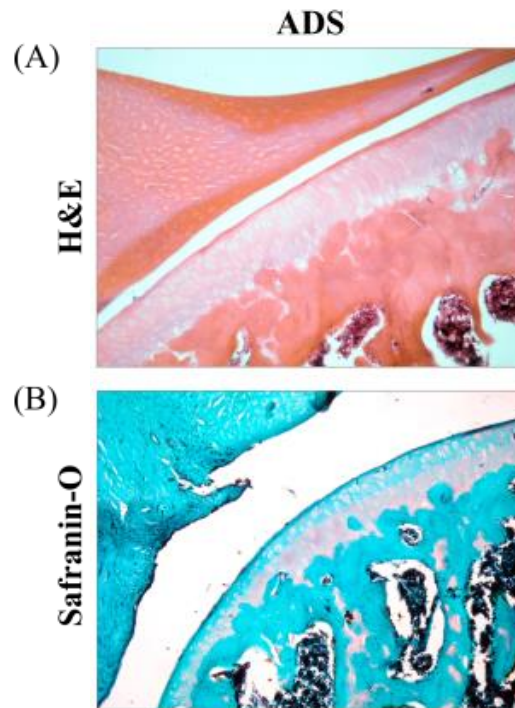
Да бисмо дефинисали и квантификовали степен дегенеративних промена у хрскавици, као и инфламаторних промена у зглобу, користили смо хематоксилин-еозин и Сафранин-О бојење. Сlike су снимљене светлосним микроскопом (*Olympus BX51*, Токио, Јапан) опремљеним дигиталном камером. Резултати добијени патохистолошком анализом у великој мери се поклапају са радиолошким резултатима. Патохистолошка анализа је показала разлику између свих експерименталних група у односу на групу без терапијске интервенције (ОА), а модел са комбинованим третманом (ADS+HBO28day) је управо направио и највећу разлику.

У ОА групи хематоксилин-еозин бојење је јасно показало знаке дегенерације зглобне хрскавице. У површинском слоју хрскавице налазио се углавном један хондроцит у лакунама. У дубљим слојевима хрскавице уочен је делимичан недостатак хондроцита у лакунама. Уочени су хондроцити са знацима дегенеративних промена и хиперхроматска једра (Слика 2А). Такође, сафранин О-позитивна хијалинска хрскавица је била скоро потпуно одсутна у групи са ОА у поређењу са CTRL групом, што јасно указује на прогресију дегенеративних промена (Слика 2В).



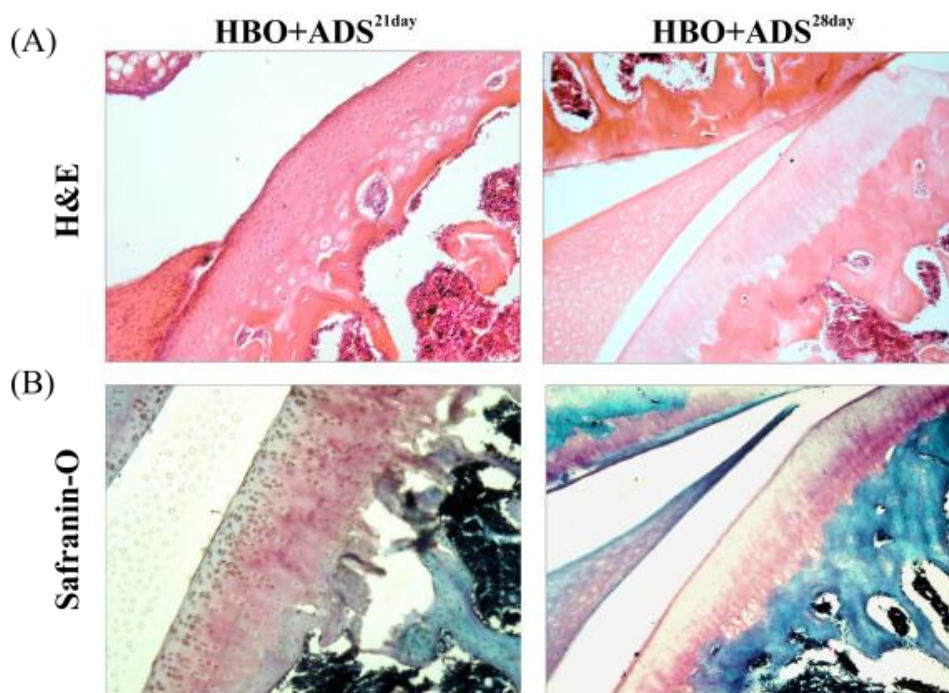
Слика 2. Репрезентативне слике пресека колесног зглоба CTRL и ОА групе обојених (А) хематоксилином/еозином (H&E) и (В) сафранином О-брзо зеленом (Сафранин-О).

Након 21 дана, хистолошка процена је показала да самостална примена ADS доводи до делимичног опоравка коленског зглоба уз очување глатке површине хрскавице нормалне дебљине и интензитета матрикса. У хрскавици се примећује већи број хондроцита, са делимично очуваном морфологијом (Слика 3А). Поред тога, сафранин О-позитивна хијалинска хрскавица била је мање истакнута у ADS групи, у поређењу са ОА групом (Слика 3В).



Слика 3. Репрезентативне слике пресека коленског зглоба ADS група обојених (А) хематоксилином/еозином (H&E) и (В) сафранином О-брзо зеленом (Сафранин-О).

У групи са комбинованим третманом (ADS+HBO21day) јасно је уочена већа дебљина хрскавице у односу на друге испитиване групе. Површина хрскавице је била глатка. У све три зоне хрскавице, углавном појединачни хондроцити су примећени у лакунама са очуваном ћелијском морфологијом (Слика 4А). Такође, хрскавица је показала интензивније бојење Сафранин О, које се шири по површини, средњој и дубокој зони хрскавице, што указује на већи садржај гликозаминогликана (ГАГ). На основу резултата можемо рећи да комбиновани третман убрзава процес регенерације хрскавице, посебно након 28 дана третмана (ADS+HBO28day) (Слика 4В). Док у групама пацова са ОА који су третрани стерилним физиолошким раствором и медијумом за култивацију ADS, као и оних третираних само HBO није забележена значајнија репарација хрскавице.



Слика 4. Репрезентативне слике пресека колеског зглоба ADS+HBO21day, и ADS+HBO28day група обојених (А) хематоксилином/еозином (H&E) и (В) сафранином О-брзо зеленом (Сафранин-О).

4.4. Параметри оксидативног стреса

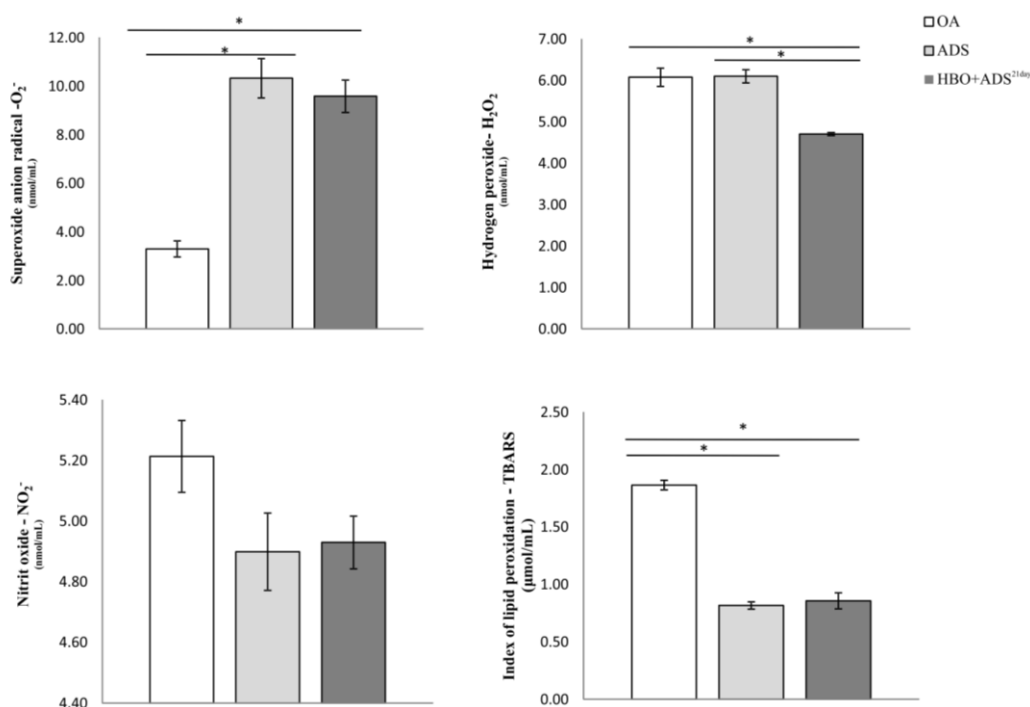
4.4.1. Прооксидативни маркери

Одређивањем концентрације прооксидативног маркера супероксид анјонског радикала - $O_2^{\cdot-}$ у узорцима плазме, примећено је значајно повећање ниво $O_2^{\cdot-}$ у групи третираној ADS, као и у групи на комбинованом третману у поређењу са OA ($3,25 \pm 0,58$), CTRL ($3,31 \pm 0,63$), MED ($3,37 \pm 0,69$) и 0,9% NaCl ($3,49 \pm 0,26$) групом, између којих иначе није било статистички значајне разлике.

Одређивањем концентрације нитрита у узорцима плазме, забележено је да није било статистичких разлика у нивоу овог прооксидативног маркера између ADS, HBO+ADS и OA, али су значајно повећани у поређењу са CTRL ($3,43 \pm 0,31$), MED ($3,37 \pm 0,19$) и 0,9% NaCl ($3,49 \pm 0,26$) групом.

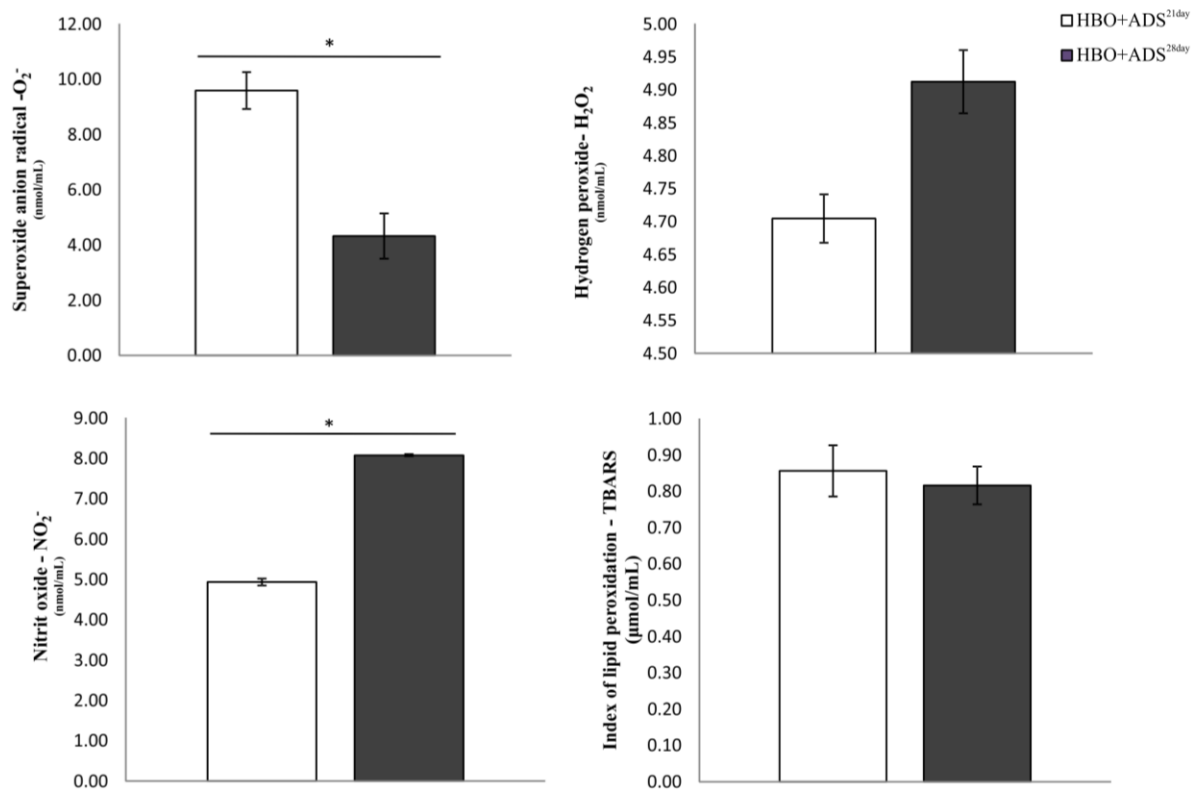
Са друге стране комбиновано лечење HBO и ADS изазвало је значајно смањење нивоа H_2O_2 у поређењу са OA и ADS групама, али су вредности у тим групама и даље значајно повећано у поређењу са CTRL ($2,37 \pm 1,04$), MED ($2,41 \pm 1,29$) и 0,9% NaCl ($2,16 \pm 1,06$) групом.

Најизраженија промена је примећена у вредности TBARS у OA групи у поређењу са другим групама. Значајно повећан ниво TBARS примећен у OA групи је уз протокол лечења се вратио на вредност овог маркера на оне уочене у CTRL групи ($0,86 \pm 0,02$). Вредности индекса липидне пероксидације у групама MED ($0,76 \pm 0,01$) и 0,9% NaCl ($0,71 \pm 0,06$), се нису значајно разликовале од вредности из контролне групе. Али, можемо рећи да различити протоколи лечења нису довели до значајних промена у нивоу овог прооксидативног маркера (**Графикон 3**).



Графикон 3. Вредности прооксидативних маркера, супероксид анјон радикала ($O_2^{\cdot-}$), водоник пероксида (H_2O_2), нитрита ($NO_2^{\cdot-}$) и индекса липидне пероксидације (TBARS) у узорцима плазме OA, ADS, ADS+HBO21day. Вредности су представљене као средња вредност \pm средња стандардна грешка (SE). * $p < 0,05$ указује на статистички значајне разлике између група.

Одређивањем концентрације прооксидативних молекула у узорцима плазме у две различите тачке интересовања, примећен је значајно нижи ниво O_2^- након 28 дана од индукције ОА у поређењу са његовом вредношћу након 21 дана од индукције болести. С друге стране, није било статистичких разлика у нивоима H_2O_2 и TBARS између група ADS+HBO21day и ADS+HBO28day. Међутим, нитрити су значајно повећани након 4 недеље од индукције ОА у поређењу са његовом вредношћу у групи која је третирана комбинованим протоколом у трајању од 3 недеље (**Графикон 4**).

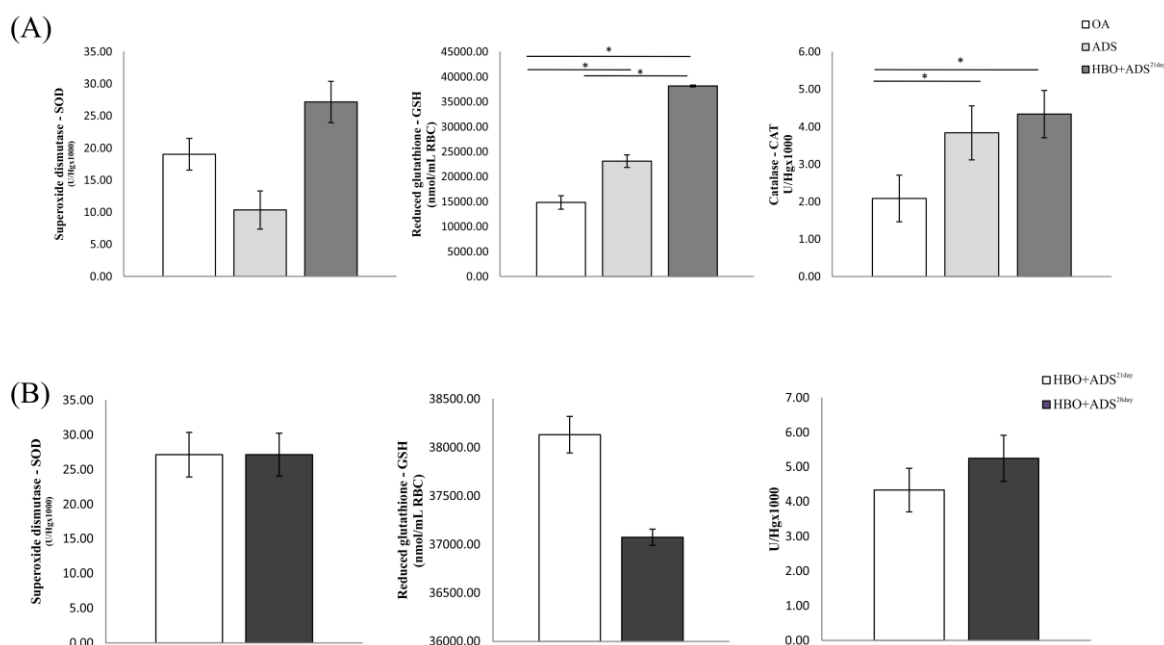


Графикон 4. Вредности O_2^- , H_2O_2 , NO_2^- и TBARS у узорцима плазме ADS+HBO21day и ADS+HBO28day групе. Вредности су престављене као средња вредност \pm средња стандардна грешка (SE). * $p < 0,05$ указује на статистички значајне разлике између група.

4.4.2. Ензимски и неензимски антиоксиданси

Примењени протокол лечења је изазвао значајно повећану активност антиоксидативних ензима у поређењу са ОА групом. Док се вредности SOD, GSH и CAT, нису статистички значајно разликовале између HBO (SOD: $80,23 \pm 2,54$; GSH: $24657,56 \pm 745,23$; CAT: $10,25 \pm 1,54$), 0,9% NaCl (SOD: $79,34 \pm 3,64$; GSH: $26579,96 \pm 849,23$; CAT: $11,65 \pm 1,94$) и MED (SOD: $77,27 \pm 3,04$; GSH: $25607,16 \pm 778,76$; CAT: $12,16 \pm 0,98$) група у поређењу са ОА групом.

Поред тога, појединачни третман ADS је изазвао значајно већу активност GSH и CAT у поређењу са ОА групом, али је супротно довео до ниже активности SOD. Штавише, примећено је да је индукција ОА довела до значајног смањења активности антиоксидативних ензима у поређењу са здравим контролним пацовима (**Графикон 5А**). С друге стране, није било статистичких разлика у антиоксидативној активности ензима између група ADS+HBO21day и ADS+HBO28day (**Графикон 5В**).



Графикон 5. Активност ензимских антиоксиданса SOD и CAT и неензимског антиоксиданса GSH у узорцима лизата еритроцита (A) CTRL, ОА, ADS група и (B) ADS+HBO21day и ADS+HBO28day група. Вредности су представљене као средња вредност \pm средња стандардна грешка (SE). * $p < 0,05$ означава статистички значајне разлике међу групама.

4.5. Анализа серумских вредности проинфламаторних и антиинфламаторних цитокина

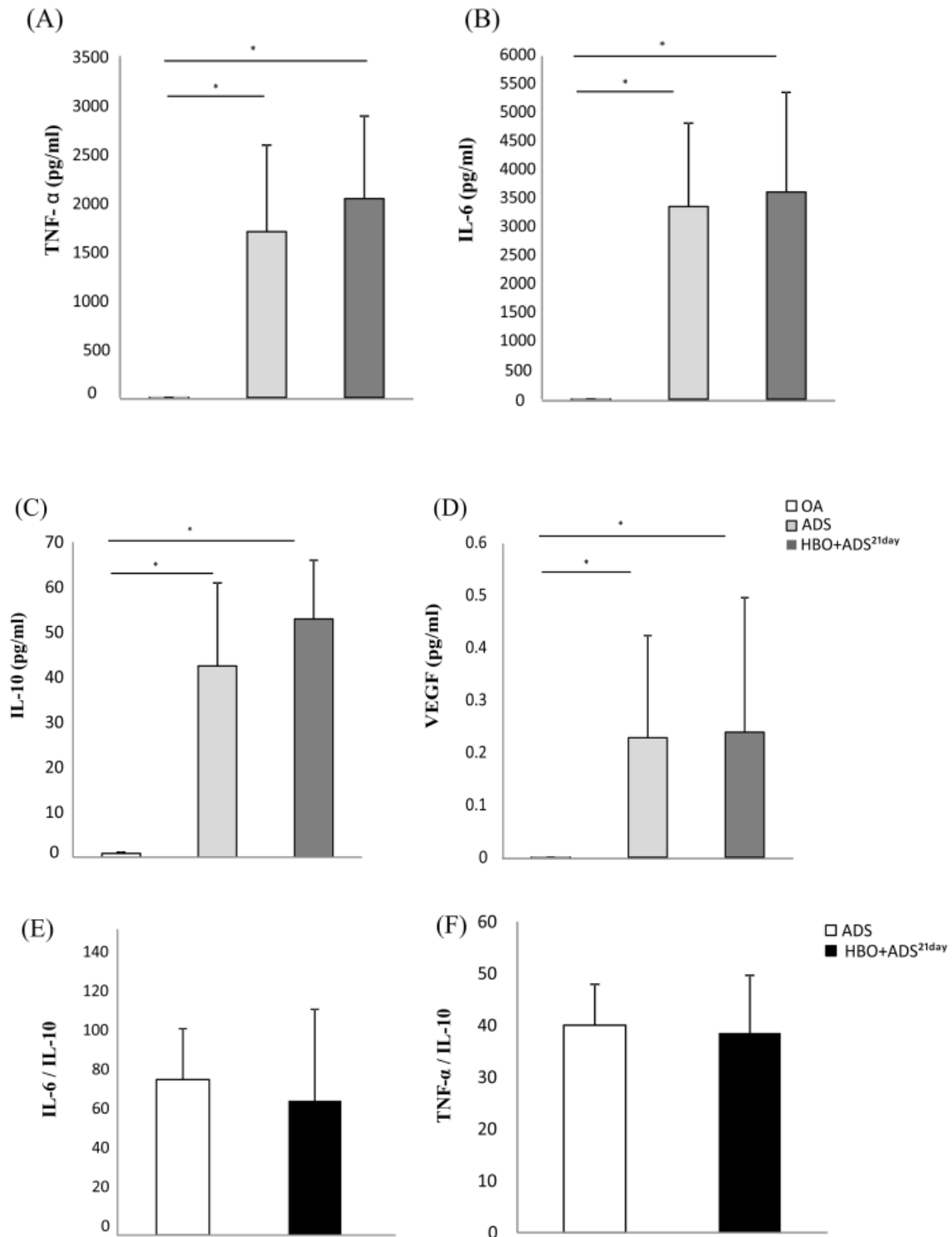
Испитали смо нивое TNF- α , IL-6, IL-10, фактора раста васкуларног ендотела (VEGF), IFN- γ , IL-13, IL-23, IL-17, IL-18, IL-1, IL-4 и IL-23 у узорцима серума експерименталних животиња након индукције остеоартритиса.

Концентрације TNF- α у серуму су значајно повећане у серумима група ADS и HBO+ADS21day у поређењу са ОА групом експерименталних животиња, док су серумске вредности TNF- α у две временске тачке показале виши ниво у HBO+ADS21day групу у поређењу са HBO+ADS28day групом, али без статистички значајне разлике. Концентрације TNF- α у серуму се нису статистички значајно разликовале између CTRL ($0,22 \pm 0,02$), HBO ($0,18 \pm 0,02$), MED ($0,23 \pm 0,02$) и 0,9% NaCl ($0,24 \pm 0,02$) у поређењу са ОА групом.

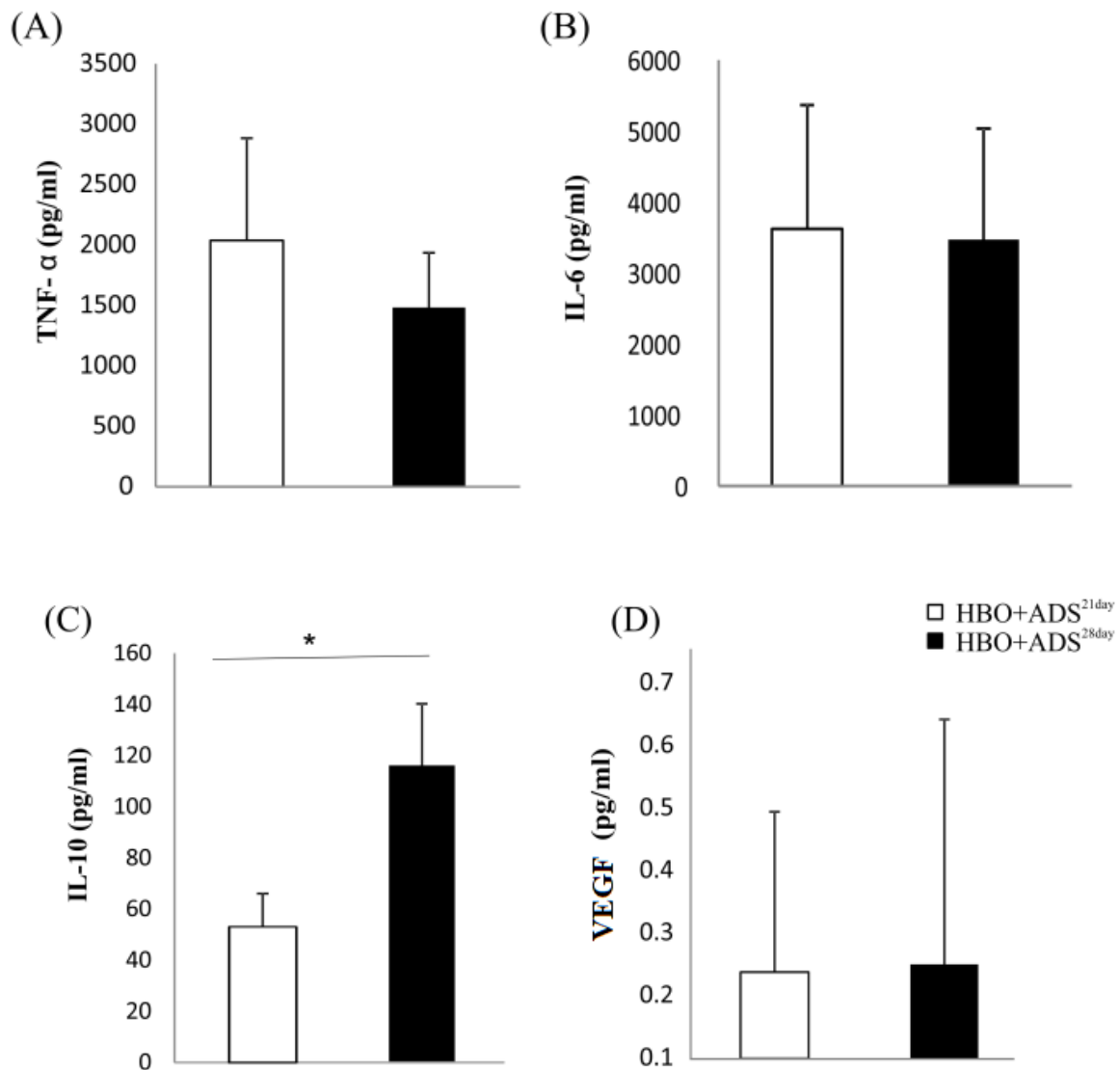
Анализа вредности IL-6 и IL-10, који су цитокини везани за TH2 профил и антиинфламаторни одговора, показала је значајно више серумске нивое у групама ADS и HBO+ADS21day у поређењу са ОА групом.

Поред тога, уочене су веће концентрације IL-6 у серуму у групи HBO+ADS21day у поређењу са групом HBO+ADS28day (без статистички значајне разлике), док су значајно виши нивои IL-10 уочени у групи HBO+ADS28day. Међутим, анализа апсолутних односа је показала да су TNF- α /IL-10 и IL-6/IL-10 били виши у групи која је примала ADS у поређењу са групом која је примала HBO+ADS21day, очигледно због повећаног серумског TNF- α и IL-6 у серуму сваког појединачног пацова.

Статистички значајно виши нивои VEGF примећени су у серумима ADS и HBO+ADS21day група у поређењу са ОА групом. Испитивање серумских вредности VEGF у две различите тачке интересовања показало је виши ниво VEGF после 28 дана индукције ОА у групи HBO+ADS28day у поређењу са његовом вредношћу у групи HBO+ADS21day (**Графикон 6 и 7**). Вредности VEGF, IL-6, IL-10 и TNF- α су биле јако ниске ($\sim 0,1$ pg/ml) и нису се значајно разликовале умеђу CTRL, HBO, MED и 0,9% NaCl групе у поређењу са ОА групом. Док се вредности осталих одређиваних цитокина IFN- γ , IL-13, IL-23, IL-17, IL-18, IL-1, IL-4 и IL-23 нису статистички значајно разликовале измеђи експерименталних и контролне групе.



Графикон 6. Вредности серумских вредности цитокина (A) TNF- α , (B) IL-6, (C) IL-10 и (D) VEGF, у OA, ADS и HBO+ADS^{21day} групама и вредности (E) односа IL-6 / IL-10 и (F) односа TNF- α / IL-10 између HBO+ADS^{21day} и HBO+ADS^{28day} група. Вредности су престављене као средња вредност \pm средња стандардна грешка (SE). * $p < 0,05$ указује на статистички значајне разлике између група.



Графикон 7. Вредности серумских вредности цитокина (A) TNF- α , (B) IL-6, (C) IL-10 и (D) VEGF, између HBO+ADS^{21day} и HBO+ADS^{28day} група. Вредности су престављене као средња вредност \pm средња стандардна грешка (SE). * $p < 0,05$ указује на статистички значајне разлике између група.

4.6. Анализа експресије гена који учествују у развоју експерименталног ОА

С обзиром да експресија специфичних гена корелира са повећаном продукцијом одговарајућих цитокина, употребом qRT-PCR методе анализирали експресију одређених гена који кодирају про-инфламаторне и анти-инфламаторне молекуле. Иако је на основу повећане продукције цитокина IL-10, IL-6 и фактора TNF- α и VEGF, у групама третираним ADS и комбиновим третманом ADS + HBO било очекивано да дође до повећане експресије гена који кодирају њихову синтезу, то се није десило. Односно, забележено је благо повећање експресије гена који кодирају синтезу IL-10 и VEGF, док је благо снижена експресије гена који кодирају синтезу IFN- γ , IL-6 и TNF- α , али без значајне статистичке разлике у вредностима (Табела 1). Док су вредности IL-13, IL-23, IL-17, IL-18, IL-1, IL-4 и IL-23 биле врло ниске и нису се разликовале између експерименталних и контролне групе.

Табела 1. Утицај ADS и HBO на експресију гена у ОА.

	TNF-α	IFN-γ	IL-6	IL-10	VEGF
CTRL	0,0021 \pm 0,0007	0,00011 \pm 0,00009	0,00037 \pm 0,00003	0,0061 \pm 0,0003	0,63 \pm 0,052
OS	0,0042 \pm 0,0009	0,00017 \pm 0,00006	0,00055 \pm 0,00004	0,0054 \pm 0,0004	0,54 \pm 0,031
HBO	0,0039 \pm 0,0004	0,00010 \pm 0,00005	0,00047 \pm 0,00001	0,0063 \pm 0,0002	0,61 \pm 0,065
ADS	0,0037 \pm 0,0006	0,00012 \pm 0,00008	0,00043 \pm 0,00003	0,0068 \pm 0,0003	0,55 \pm 0,032
HBO+ADS21day	0,0017 \pm 0,0008	0,00011 \pm 0,00007	0,00039 \pm 0,00004	0,0071 \pm 0,0002	0,73 \pm 0,065
HBO+ADS28day	0,0015 \pm 0,0010	0,00009 \pm 0,00008	0,00036 \pm 0,00002	0,00075 \pm 0,0005	0,78 \pm 0,036

Вредности су престављене као средња вредност \pm средња стандардна грешка (SE).
* $p < 0,05$ указује на статистички значајне разлике између група.

V

ДИСКУСИЈА

5. ДИСКУСИЈА

5.1. Комбинована примена ADS и HBO утиче на репарацију дефекта хрскавице

Остеоартритис је хронична болест зглобова коју карактерише дегенерација зглобне хрскавице и околне кости, која је праћена хроничним болом. Коришћени анимални модел ОА индукован монојодоацетатом, је модел који симулира бол, биохемијске и структурне промене које се налазе код хуманог ОА. У овој студији смо први пут користили различите терапијске моделе акутне фазе монојодоацетатом индукованог животињског модела остеоартритиса који су испитани и упоређени. Показали смо да примена комбинованог третмана (ADMSCs + HBO) има највећи потенцијал за репарацију хрскавице у хемијски индукованом ОА моделу. Терапијски ефекат се манифестовао смањеном дегенерацијом хрскавице посредством индукције антиинфламаторног одговора. Према подацима из анималних и клиничких студија, главне карактеристике третмана ADMSCs код ОА су њихов велики капацитет диференцијације, као и антиинфламаторни ефекат и регенеративне функције (56).

Такође, постоје извештаји о безбедности и ефикасности алогеног третмана ADMSCs код ОА (57). Главни недостатак је ниска стопа преживљавања ADMSCs *in vivo* и ограничавајући терапеутски ефекат. У актуелној студији, први смо користили ADMSCs у комбинацији са HBO за лечење остеоартритиса коленског зглоба. Резултати добијени у нашој студији су у складу са *in vitro* студијом коју су спровели *D. Wang et al* (40). Њихови налази сугеришу да притисак кисеоника има важну улогу у регулисању пролиферације и метаболизма ADMSCs док подлежу хондрогенези, а егзогена контрола притиска кисеоника може повећати акумулацију матриксних макромолекула у ткивном инжењерингу хрскавице. Претходна студија је открила да је позитиван ефекат алогених ADMSCs примећен већ 4 недеље након трансплантације. Интраартикуларна ињекција алогених ADMSCs експандираних у култури ублажила је дегенерацију хрскавице у експерименталном моделу ОА код пацова без уочених нежељених ефеката (47). Скорашње студије су показале корисне ефекте ADMSCs на третман ОА како на анималним моделима (36, 37), тако и у клиничким испитивања (58, 59). Сва клиничка испитивања која су објавила резултате о употреби ADMSCs за лечење ОА ослањала су се на употребу аутологних ћелија из стромалне васкуларне фракције (енгл. *Stromal Vascular Fraction - SFV*), а већина студија на животињама се такође фокусира на аутологне ADMSCs. Примена алогених ADMSCs за лечење ОА је ограничена. Међутим, експресија МНС-класе-II молекула код ADMSCs је ниска или у потпуности одсутна, што омогућава примену алогених ADMSCs за лечење дегенеративних болести и имуних поремећаја (60). Поред тога, алогене ћелије могу бити и практичан терапијски агенс, јер се могу изоловати од здравих донора и култивисати.

Toghraie et al (37) су показали да интраартикуларна ињекција аутологних ADMSCs побољшава квалитет хрскавице у моделу ОА код зеца изазваног трансекцијом предњег укрштеног лигамента.

Desando et al (35) су показали да аутологе ADMSCs спречавају оштећење хрскавице и менискуса и ублажавају запаљење у синовијалним мембранама у моделу ОА зеца.

Kuroda et al (61) је пронашао инхибиторни ефекат аутологних ADMSCs на прогресију ОА и показао да паракрини ефекти трансплантираних ADMSCs доприносе овом механизму. Мали број студија се бавио проценом безбедности и ефикасности алогених ADMSCs које су *in vitro* експандиране и МСН-некомпатибилне, за лечење ОА.

Према резултатима истраживања *Van Pham et al* које је спроведено на мишјем моделу ОА (62) интраартикуларна трансплантација алогено-неекспандираних ADMSCs изазвала је формирање неохрскавице у делу оштећења хрскавице које је изазваном иглом. У нашој студији нисмо посматрали формацију неохрскавице у ADMSCs групи или контролној групи, али је ADMSCs третман значајно умањио дегенерацију хрскавице код ОА у поређењу са контролном групом. Користан ефекат ADMSCs је забележен 4 недеље након третмана.

У другом истраживању сличног дизајна, али у коме је ОА индукован трансекцијом предњег укрштеног лигамента (57), након операције, како је време одмицало, озбиљан ОА се развио и у ADMSCs групи и у контролној групи. Међутим, хрскавица је била дебља у ADMSCs групи него у контролној групи, што није био случај у нашем истраживању. Разлике у начину индуковања ОА модела су највероватније разлог различитих резултата између наше студије и претходне објављене студије.

5.2. Комбинована примена ADS и HBO делује антиинфламаторно у ОА

У нашој студији, животиње су жртвоване 3 и 4 недеље након третмана. Макроскопском и хистолошком проценом констатовано је да је третман HBO уз ињекцију ADMSCs након 28 дана довео до повлачења дегенерације хрскавице. Комбиновани третман HBO и ADMSCs смањило је нивое TNF- α и IL-6 у серуму, док су нивои IL-10 и VEGF у серуму били повећани. Третмани са само ADMSCs су такође имали заштитни ефекат на ОА, али ниједан ефекат није био бољи од комбинованог третмана HBO и ADMSCs.

Постоје два могућа механизма деловања који леже у основи ефикасности матичних ћелија у лечење ОА. Прво, трансплантиране ћелије се диференцирају у хондроците и попуњавају хрскавицу лезије. Научник *Sato* са својим сарадницима (63) су открили да је директна трансплантација људских MSC у зглобове колена заморчића *Hartley* соја са спонтаним ОА, могу диференцирати у хондроците и откривено је да се налазе у новој хрскавици. Друго, трансплантиране ћелије могу утицати на микро-окружење путем паракриних деловања и лучењем различитих солубилних и несолубилних цитокина, хемокина и фактора раста који посредују антиинфламаторни, анти-фибротични, анти-апоптоички и трофички ефекат у хондроцитима (61, 64, 65).

Друга група научника је (66) објавила користан трофички ефекат хуманих MSC на говеђе хондроците коришћењем *transwell* система кокултивације. Још једно истраживање у ком су ADMSCs кокултивиривисане у *transwell* систему са хондроцитима, испитани су паракрини ефекти ADMSCs на хондроците. IL-1 β је главни инфламаторни фактор који се користи за изазивање промена сличних ОА *in vitro* (67).

IL-1 β стимулише хондроците да производе катаболичке протеазе са апокрином сигнализацијом, што даље појачава ослобађање матрикс металопротеиназа (енгл. *Matrix metalloproteinases* - MMP) (68). MMP чине велику групу ензима који разграђују екстрацелуларни матрикс који играју кључну улогу у започињању и напредовању оштећења хрскавице током ОА. MMP-3 разграђује неколико макромолекула који се налазе у матриксу хрскавице, укључујући протеогликане, неколико колагена и протеине који везују агрекане (69) MMP-13 деградира колаген типа II, који је главна компонента матрице хрскавице и одговорна је за деградацију изворних колагенских влакана (70). Експресија проинфламаторног цитокина TNF- α доприноси каснијим катаболичким дегенеративним процесима ОА и стимулише производњу других проинфламаторних цитокина (71).

Наша студија је то открила да апликација ADMSCs повећава анти-инфламаторне цитокине IL-10, али није значајно снизила про-инфламаторне цитокине IL-6 и TNF- α , што је делимично у складу са досадашњим истраживањима, с обзиром да је доказано да ADMSCs (57). Тако да је претпоставка, да третмана ADMSCs у ОА у раној фази делује паракриним ефектом и то главни механизам одговоран за њихов хондро-протективни ефекат, који касније доводи до лучење многих фактора који посредују у различитим функцијама (72), све то доприноси повећаној експресији хондрогених гена у ADMSCs, а производња екстраћелијског матрикса игра доминантну хондро-протективну улогу и индукује репаративне ефекте хрскавице.

У спроведеној студији сличног дизајна, код пацова са ОА који су третиран са IL-1 β , нивои експресије mRNA ензима који разграђују матрикс, MMP-3 и MMP-13, и проинфламаторних цитокина, IL-6, TNF- α , и IL-10, су били значајно повећани у хондроцитима у поређењу са онима у нетретираној контролној групи, док су хондроцити култивисани заједно са ADMSCs значајно смањили IL-1 β -индуковану

експресију TNF- α , MMP-3, MMP-13, и IL-6, док је експресија IL-10 била појачана, али не значајно (57).

Истраживање *Harnanik et al* (73) показало је да третман HBO има ефекте на поларизацију Th17 ка Treg кроз смањење експресије HIF-1 α код мишева са артритисом индукованим антигеном и колагеном. Закључак наведених аутора је да HBO третман може бити добра помоћна терапија за OA у комбинацији са медикаментозном терапијом. Подаци из литературе указују на то да је терапеутско дејство ADMSCs у OA засновано на паракрином деловању секреторних антиинфламаторних фактора (74).

Zhou et al су показали да су ADMSCs ублажиле OA и инхибирале дегенерацију хрскавице кроз смањено лучење проинфламаторних цитокина и заштитом од апоптозе индукцијом аутофагије. ADMSCs супримирају проинфламаторне цитокине *in vitro* и *in vivo*, тако што секретују вишеструке антиинфламаторне факторе и факторе раста и делују паракрино. Такође је показано да третман ADMSCs смањује експресију FGF-1, који такође може бити одговоран за њихову регенеративну функцију. Поред тога, ADMSCs играју важну улогу у модулацији бројних путева сигнализације (38).

Изложеност HBO кроз повећану производњу ROS, може деловати као ћелијски гласник у многим путевима трансдукције сигнала. Сходно томе, васкуларни фактор раста ендотела (VEGF) је усходно регулисан када су ћелије изложене и хипоксичним и хипероксичним условима (75). VEGF се сматра кључним промотером ангиогеног процеса који је неопходан за одржавање интегритета крвих судова, док ендотелин-1 учествује у одржавању базалног васкуларног тонуса и крвног притиска активирањем васкуларних глатких мишића. Поред тога, ендотелин-1 заједно са другим протеинима делују у мрежи која промовише диференцијацију миофибробласта и перзистентност током репарације ране (76). Акутна производња IL-6 има директне антиинфламаторне ефекте или стимулише производњу антиинфламаторних компоненти имуних ћелија, као што су антагонист IL-1 рецептора и IL-10 (77). Третман рана IL-6 појачава исцељење, тако што преусмерава имуне ћелије на решавање упале (78). Поред тога, IL-6 поспешује пролиферацију мезенхималних матичних ћелија, штити од апоптозе и повећава стопу исцељења рана *in vitro* (79).

5.3. Комбинована примена ADS и HBO утиче оксидациони статус у ОА

Други аспект наше студије подразумевао је испитивање да ли ADMSCs самостално или у комбинацији са HBO третманом могу променити системску концентрацију прооксидативних молекула.

HBO повећава капацитет крвне плазме за транспорт кисеоника с обзиром на нормобаричне услове. HBO се успешно користи као супортивна терапија у многим стањима (80, 81), као што су незарастајуће дијабетичке и друге проблематичне ране и некротизирајуће инфекције меког ткива. Зарастање рана је сложен процес и захтева координисан редослед корака који укључује производњу и учешће многих фактора раста, компоненте екстрацелуларног матрикса и неколико типова ћелија. Поправка ткива укључује мобилизацију и активацију имуног система који је одговоран за чишћење оштећеног ткива од мртвих ћелија и остатака матрикса, као и за синтезу медијатора који стимулишу ангиогенезу и раст фибробласта. Процес опоравка обухвата фазу запаљења, али и фазу решавања упале и враћања зарастања рана у хомеостазу ткива (82).

У већини патолошких ситуација са одложеним зарастањем рана, постоји директна повезаност са штетним ефектима продуженог дефицита кисеоника (83). На овај начин, различити процеси неопходни за нормално зарастање рана, као што су пролиферација фибробласта, ангиогенеза, таложење колагена или отпорност на инфекцију, зависе од кисеоника (84). Повећање нивоа кисеоника у хипоксичној рани је неопходно за ћелије укључене у процес зарастања (неутрофили, фибробласти, макрофаги) да би извршили своје специфичне функције поправке (85). Повећана доступност кисеоника током HBO је суштински посредујући фактор повезан са депозицијом колагена и неоваскуларизацијом (86). HBO није у могућности да повећа количину кисеоника везаног за молекуле хемоглобина, али може повећати количину раствореног кисеоника у плазма (87). Штавише, повећана доступност кисеоника повећава генерисање ROS, што је директно повезано са модулацијом инфламаторног процеса (88, 89). HBO повећава експресију различитих фактора раста и активира фактор 1 који је индукован хипоксијом (енгл. *Hypoxia-Inducible Factor-1* - HIF-1) који могу појачати ангиогенезу и пролиферацију фибробласта (90). Поред тога, већина аутора је указала да резултирајућа хипероксија може изазвати вазоконстрикцију, чиме се смањује едем ткива (91), иако ово смањење едема може бити узроковано смањењем упале након HBO (92). HBO третман такође изазива промене у оксидативним способностима имуних ћелија, које могу активно да учествују у процесу зарастања рана (93). Даљи значајни ефекти HBO повезани са зарастањем рана су повећани капацитет за убијање бактерија леукоцитима, супресија пролиферације бактерија због њеног бактерицидног дејства на анаеробе и микроаерофилних аероба, регулација инфламаторних путева смањењем експресије проинфламаторних цитокина (88, 94). Изложеност HBO може повећати производњу ROS, која директно корелира са количином присутног кисеоника. Производња ROS је штетна за ћелије јер је то може оштетити компоненте ћелија, укључујући протеине, липиде и нуклеинске киселине које воде до значајних измена здравственог стања (95). Међутим, умерено повећање ROS може бити корисно јер ROS такође може деловати као ћелијски гласник у многим путевима трансдукције сигнала (96).

Резултати нашег истраживања су показали значајно повећан ниво прооксидативних молекула као и смањену активност антиоксидативних ензима у ОА групи у поређењу са здравим контролним пацовима. Штавише, примећено је да група комбинованог третмана (ADMSCs + HBO) има најјачи потенцијал да побољша антиоксидативну

одбрану и на тај начин спречи појаву оксидационог стреса у експерименталном моделу ОА. Поред тога, испитујући ефекте различите дужине трајања НВО третмана, нисмо приметили никакве разлике у утицају на редокс статус животиња са ОА. Резултати су показали значајно ниже нивое свих прооксидативних маркера у ове две групе у односу на ОА, осим повишеног нивоа супероксидног анјонског радикала у третираним групама. Овај налаз би се могао објаснити прикупљеним доказима који указују да умерено повећање интрацелуларног ROS током рутинског третмана НВО може модулирати сигналне путеве, индуковати експресију цитопротективних протеина и побољшати ћелијску толеранцију на штетне стимулусе (97). Иако је повећана производња ROS примећена након третмана НВО, висока концентрација кисеоника је парадоксално довела до антиоксидативног окружења у плазми повећањем активности антиоксидативних ензима. Такође, различите студије су показале повећање укупног антиоксидативног капацитета након излагања НВО (98). Ово је у складу са резултатима наше студије који показују значајно већу активност свих одређиваних антиоксидационих ензима у третираним групама у поређењу са ОА. Међутим, није било промена у антиоксидативној одбрани током два различита временска интервала. Терапеутска употреба НВО се може огледати у повећању производње ROS, што напротив побољшава регулацију активности антиоксидативних ензима у ткивима.

Неке студије су показале мале промене у маркерима пероксидације липида у плазма после НВО (99). Док у студији спроведеној са здравим пацијентима, НВО није индуковала промене у маркерима оксидативног оштећења у плазми и лимфоцитима, али је изазивала антиоксидативни одговор који карактерише повећану активност GPx лимфоцита (100). Поред тога, није доказан значајан ефекат НВО и трајања лечења на еритроцитне антиоксидативне ензиме, што је у складу са нашим резултатима (99, 101). Терапеутска основа примене НВО је повећање количине раствореног кисеоника коју носи крв што доводи до значајног повећања концентрације кисеоника у ткивима. Висока концентрација кисеоника може повећати производњу ROS али парадоксално НВО индукује антиоксидативно окружење у плазми повећањем активности каталазе. Различите студије су показале повећање укупног антиоксидативног капацитета плазме који је одређен након сесије НВО (102). Показало се да НВО може деловати као хорметички агенс кроз активирање антиоксидативних и цитопротективних гена у циљу заштите од стресне ситуације (103). Повећање нивоа ROS може да посредује у експресији кључних молекула инфламације, резолуције и репарације рана. На овај начин, ово повећање се може сматрати примарним механизмом деловања НВО у зарастању рана (104). НВО би могао повећати генерисање ROS, изазивајући заштитни и адаптивни одговор како би помогао ћелијама и ткиву у ефикаснијем савладавању различитих ендогених стресора и стресора из околине. Повећана производња ROS након НВО активира нуклеарни фактор $\kappa\beta$ (*Nuclear Factor* $\kappa\beta$ - NF $\kappa\beta$) који регулише неколико путева укључених у покретање заштитних механизма (105). Активност мијелопероксидаза у плазми значајно се смањила након сваке НВО сесије током читавог експерименталног периода (106). Смањено снабдевања крвљу код повређеног ткива може изменити митохондријски ланац транспорта електрона повећавајући цурење електрона и последично повећање производње ROS (107). НВО индукује производњу ROS који могу деловати као сигнали који посредују физиолошке одговоре у митохондријама. НВО чува интегритет митохондрија кроз одржавање потенцијала митохондријалне мембране и смањење митохондријског пута апоптозе (108). У складу са тим, понављане сесије НВО би могле индуковати адаптацију на оксидативну машинерију неутрофила како би се смањила реакција на стимуланс, умањујући инфламаторни одговор и побољшавајући процес опоравка у оштећеним ткивима. У том смислу, НВО сесије промовишу антиинфламаторни одговор сличан резолуционом

инфламаторном одговору липидних медијатора укључујући ресолвине и неколико цитокина (82). Ресолвини испољавају јаке антиинфламаторне ефекте смањењем прекомерна инфилтрација неутрофила у ткива и смањење производње проинфламаторних медијатора (82, 109).

IL-6 је плејотропни цитокин са проинфламаторним и антиинфламаторним функцијама (110). Као одговор на акутну инфекцију, трауму или вежбу, акутна повишења IL-6 посредују у антиинфламаторним ефектима, док хронично повишени нивои IL-6 су повезани са патогеном инфламацијом и штетним ефектима на метаболизам (111). Познато је да IL-6 игра улогу у решавању инфламације и постизању задовољавајућег зарастања рана, кроз појачану индукцију макрофага алтернативним путем (78). НВО третман је повећао ниво IL-6 у плазми, што за узврат промовише алтернативно активирање макрофага у повређеном ткиву доводећи до фазе зарастања рана. Понављајуће сесије НВО произвеле су понављајуће лучење IL-6 који доводи до зарастања повреде.

VEGF је важан ангиогени фактор са великим ефектом стимулације раста на ендотелне ћелије, а такође и са снажним медијаторским ефектом на васкуларну пермеабилност (112). НВО доводи до умерене продукције ROS, што може индуковати ослобађање VEGF и последично промовише ангиогенезу (113). ROS, произведене током зарастања рана, могу учествовати као сигнални молекул који регулише производњу VEGF и различите ћелијске одговоре. НВО индукује експресију VEGF која заузврат стимулише ангиогенезу и побољшава процес опоравка.

Међутим, свега неколико студија је обавило резултате анализе ефеката НВО на концентрацију VEGF у плазми код људи, и пронађени резултати су контроверзни (114), вероватно као последица различите НВО, различите експерименталне процедуре и различитих врста рана које се процењују. Ослобађање азот-моноксида од стране ћелија глатких мишића указано на то да су укључене у сигналну каскаду која доводи до синтезе и ослобађања VEGF (115). Код испитаника који су пријавили повољан утицај НВО на повреду, забележен је повећан ниво азот-моноксида након НВО (86). Док је у студији са моделом ендотелних ћелија хумане пупчане вене, запажена је значајна индукција експресије VEGF гена након НВО (116), што је у складу са резултатом добијеним у нашем истраживању.

Укратко, једна интраартикуларна ињекција алогених ADS и НВО третман су успорили прогресију ОА у моделу те болести код пацова. Терапеутски ефекат ADS-НВО био је значајно бољи од третмана само ADS. Потенцијални биолошки ефекти НВО и ADS, као и тачан механизам деловања ADS третмана на ОА, остаје да се разјасни.

VI

ЗАКЉУЧЦИ

6. ЗАКЉУЧЦИ

На основу свих претходно изнетих резултатат, можемо закључити следеће:

- Да употреба интраартикуларне примене мезенхималних матичних ћелија изолованих из масног ткива (ADSMCs, односно ADS) у комбинацији са третманом хипербаричне оксигенације (НВО) у трајању од 28 дана смањује инфламаторне и прооксидативне факторе, на тај начин ублажавајући остеоартритис колена и директно значајно ублажавајући прогресију болести.
- Комбиновани третман примене ADS и НВО који се спроводи у трајању од 28 дан даје боље резултате од комбинованог третмана који се се спроводи у трајању од 21 дан.
- Комбиновани третман примене ADS и НВО који се спроводи у трајању од 21 дан даје боље резултате од самосталне интраартикуларне терапије мезенхималним матичним ћелијама изолованим из масног ткива.
- Комбиновани третман примене ADS и НВО који се спроводи у трајању од 21 дан даје боље резултате од терапије само хипербаричном оксигенацијом.

VII

ЛИТЕРАТУРА

7. ЛИТЕРАТУРА

1. Liu SH, Driban JB, Eton CB, et al. Objectively measured physical activity and symptoms change in knee osteoarthritis. *Am J Med.* 2016;129:497e505.
2. Andrianakos AA, Kontelis LK, Karamitsos DG, et al. Prevalence of symptomatic knee, hand and hip osteoarthritis in Greece. The ESORDIG study. *J Rheumatology.* 2006;33:2507–13.
3. Hanan MT, Felson DT, Pincus T. Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol.* 2000;27:1513–17.
4. D'Ambrosia RD. Epidemiology of osteoarthritis. *Orthopedics.* 2005;28(Suppl. 2):p.201–205.
5. van Sase JLCM, van Romunde LKJ, Cats A, et al. Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Ann Rheum Dis.* 1989;48:271–80.
6. Spector TD, Cicuttini J, Baker J, et al. Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ.* 1996;312:940–44.
7. Greinemann H. Argumente gegen die Anerkennung von Kniegelenksarthrose nach Berufsbelastung als Berufskrankheit. *Unfallchirurg* 1988;91:374–89.
8. Kirkesov Jensen L, Milckelsen S, Loft IP, et al. Radiographic knee osteoarthritis in floorlayers and carpenters. *Scand J Work Environ* 2000;26:257–62.
9. Grotle M, Hagen KB, Natvig B, et al. Obesity and osteoarthritis in knee, hip and/or hand: An epidemiological study in the general population with 10 years follow-up. *BMC Musculoskelet Disord.* 2008;9:132.
10. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage. Part I: Degeneration and osteoarthrosis, repair, regeneration and transplantation. *J Bone Joint Surg.* 1997;79-A:612–32.
11. Peat G. Knee pain and osteoarthritis in older adults: a review of community burden and current use of primary health care. *Ann. Rheum. Dis.* 2001;60:91e97.
12. Kellgren JH, Lawrence JS. Radiological assessment of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis.* 1957;16:494–501.
13. Mohing W. Die Arthrosis deformans des Kniegelenkes. SpringerVerlag Berlin 1966.
14. Altman RD. Practical considerations for the pharmacologic management of osteoarthritis, *Am. J. Manag. Care* 2009;15:S236eS243.
15. Kindwall EP. A History of Hyperbaric Medicine. In *Hyperbaric Medicine Practice*, 2nd ed.; Best Publishing Company: Flagstaff, AZ, USA, 1995; pp. 2–15.
16. Churchill-Davidson I, Sanger C, Thomlinson RH. High-pressure oxygen and radiotherapy. *Lancet.* 1955;268:1091–1095.
17. Boerema, I. The use of hyperbaric oxygen. *Am Heart J.* 1965;69:289–292.
18. Cianci P. Advances in the treatment of the diabetic foot: Is there a role for adjunctive hyperbaric oxygen therapy? *Wound Repair Regen.* 2004;12(1):2-10.
19. Camporesi EM, Bosco G. Mechanisms of action of hyperbaric oxygen therapy. *Undersea Hyperb Med.* 2014;41(3):247-52.
20. Domachevsky L, Pick CG, Arieli Y, et al. Do hyperbaric oxygen-induced seizures cause brain damage? *Epilepsy Res.* 2012;100(1-2):37-41.
21. Wilson HD, Toepfer VE, Senapati AK, et al. Hyperbaric oxygen treatment is comparable to acetylsalicylic acid treatment in an animal model of arthritis. *J Pain.* 2007;8(12):924-30.

22. Nagatomo F, Gu N, Fujino H, et al. Effects of exposure to hyperbaric oxygen on oxidative stress in rats with type II collagen-induced arthritis. *Clin Exp Med.* 2010;10(1):7-13.
23. Chen H, Wu G, Sun Q, et al. Hyperbaric oxygen protects mandibular condylar chondrocytes from interleukin-1 β -induced apoptosis via the PI3K/AKT signaling pathway. *Am J Transl Res.* 2016;8(11):5108-5117.
24. Robert Lanza. *Essentials of Stem Cell Biology* 2nd Edition.
25. Baer PC, Geiger H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. *Stem Cells Int.* 2012;2012:812693.
26. Dominici M, Paolucci P, Conte P et al. Heterogeneity of multipotent mesenchymal stromal cells: from stromal cells to stem cells and vice versa. *Transplantation.* 2009;87(9):S36–42.
27. Lennon DP and AI Caplan. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 2006;34:1604-1605.
28. Oscar K. Lee, Tom K. et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood,* 2004; 103:1669-1675.
29. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
30. Le Blanc K. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy.* 2003;5(6):485-9.
31. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell.* 2002;13:4279e4295.
32. Mehrabani D, Mehrabani G, Zare S, et al. Adipose-derived stem cells (ADSC) and aesthetic surgery: a mini review. *World J Plast Surg.* 2013;2:65-70.
33. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002; 13: 4279-4295.
34. Peptan IA, Hong L, Mao JJ. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(5):1462-70.
35. Vidal MA, Kilroy GE, Lopez MJ, et al. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Vet Surg.* 2007;36(7):613-22.
36. Desando G, Cavallo C, Sartoni F, et al. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis Res Ther.* 2013;15:R22.
37. Toghraie F, Razmkhah M, Gholipour MA, et al. Scaffold-free adiposederived stem cells (ASCs) improve experimentally induced osteoarthritis in rabbits. *Arch Iran Med.* 2012;15:495-499.
38. Zhou J, Wang Y, Liu Y, et al. Adipose derived mesenchymal stem cells alleviated osteoarthritis and chondrocyte apoptosis through autophagy inducing. *J Cell Biochem.* 2018. doi: 10.1002/jcb.27530. [Epub ahead of print]
39. Shafiq M, Jung Y, Kim SH. Insight on stem cell preconditioning and instructive biomaterials to enhance cell adhesion, retention, and engraftment for tissue repair, *Biomaterials* 2016;90:85e115.
40. Wang DW, Fermor B, Gimble JM, et al. Influence of oxygen on the proliferation and metabolism of adipose derived adult stem cells. *J Cell Physiol.* 2005; 204(1):184-91.
41. Takahashi I, Matsuzaki T, Kuroki H, et al. Induction of osteoarthritis by injecting monosodium iodoacetate into the patellofemoral joint of an experimental rat model. *PLoS One.* 2018;13(4):e0196625.

42. Mei L, Shen B, Xue J, et al. Adipose tissue-derived stem cells in combination with xanthan gum attenuate osteoarthritis progression in an experimental rat model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;494(1-2):285-291.
43. Koo ST, Lee CH, Choi H, et al. The Effects of Pressure on Arthritic Knees in a Rat Model of CFA-Induced Arthritis. *Pain Physician* 2013;16:E95-E102.
44. van Holten J, Reedquist K, Sattonet Roche P, et al. Treatment with recombinant interferon beta reduces inflammation and slows cartilage destruction in the collageninduced arthritis model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2004;6:R239 R249.
45. Hu Y, Yang Y, Luo B. Evaluation of destruction in a collagen-induced arthritis rat model: Bony spur formation. *Exp Ther Med.* 2017;14(3):2563-2567.
46. Schmitz N, Laverty S, Kraus VB, et al. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis Cartilage.* 2010;18Suppl 3:S113-6.
47. Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14:13-29.
48. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-118.
49. Auclair C, Voisin E. (1985). Nitrobluetetrazolium reduction. In R. A. Greenvald (Ed.), *Handbook of methods for oxygen radical research* (pp. 123–132). Boca Raton: CRC Press.
50. Pick E, and Keisari Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. *J. Immunol. Methods.* 1980;38:161–170.
51. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15 N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry.* 1982;126:131–138.
52. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 1979;95:351–358.
53. Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 1963;61:882–888.
54. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology.* 1984;105:121–126.
55. Beutler E. (1984). Superoxide dismutase. In E. Beutler (Ed.), *Red cell metabolism. A manual of biochemical methods* (pp. 83–85). Philadelphia, PA: Grune & Stratton.
56. Si YL, Zhao YL, Hao HJ, et al. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns. *Ageing Res Rev.* 2011;10(1):93-103.
57. Mei L, Shen B, Ling P, et al. Culture-expanded allogenic adipose tissue-derived stem cells attenuate cartilage degeneration in an experimental rat osteoarthritis model. *PLoS One.* 2017;12(4):e0176107.
58. Koh YG, Choi YJ, Kwon SK, et al. Clinical results and second-look arthroscopic findings after treatment with adipose-derived stem cells for knee osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015;23:1308–1316.
59. Pak J, Chang JJ, Lee JH, et al. Safety reporting on implantation of autologous adipose tissue-derived stem cells with platelet-rich plasma into human articular joints. *BMC Musculoskel Disord.* 2013;14:337.
60. Cheng KH, Kuo TL, Kuo KK, et al. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and current application in regeneration medicine. *Genom Med Biomark Health Sci.* 2011;3:53–62.
61. Kuroda K, Kabata T, Hayashi K, et al. The paracrine effect of adipose-derived stem cells inhibits osteoarthritis progression. *BMC Musculoskel Disord.* 2015;16:236.
62. van Pham P, Bui K, Ngo D, Khuat L, et al. Transplantation of nonexpanded adipose stromal vascular fraction and platelet-rich plasma for articular cartilage injury treatment in mice model. *J Med Eng.* 2013;2013:832396.

63. Sato M, Uchida K, Nakajima H, et al. Direct transplantation of mesenchymal stem cells into the knee joints of hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis. *Arthritis Res Ther.* 2012;14:R31.
64. Platas J, Guillen MI, del Caz MD, et al. Conditioned media from adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells downregulate degradative mediators induced by interleukin1beta in osteoarthritic chondrocytes. *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 357014.
65. Maumus M, Manferdini C, Toupet K, et al. Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. *Stem Cell Res.* 2013;11: 834–844.
66. Wu L, Prins HJ, Helder MN, et al. Trophic effects of mesenchymal stem cells in chondrocyte co-cultures are independent of culture conditions and cell sources. *Tissue Eng Part A.* 2012;18:1542–1551.
67. Largo R, Alvarez-Soria MA, Diez-Ortego I, et al. Glucosamine inhibits IL-1beta-induced NFkappaB activation in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthr Cartil.* 2003;11:290–298.
68. Aida Y, Maeno M, Suzuki N, et al. The effect of IL-1beta on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human chondrocytes. *Life Sci.* 2005; 77: 3210–3221.
69. Cawston TE, Young DA. Proteinases involved in matrix turnover during cartilage and bone breakdown. *Cell Tissue Res.* 2010;339:221–235.
70. Billingham RC, Dahlberg L, Ionescu M, et al. Enhanced cleavage of type II collagen by collagenases in osteoarthritic articular cartilage. *J Clin Invest.* 1997;99:1534–1545.
71. Goldring SR, Goldring MB. The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;427:S27–S36.
72. Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells: the great WAT hope. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23:270–277.
73. Harnanik T, Soeroso J, Suryokusumo MG, et al. Effects of Hyperbaric Oxygen on T helper 17/regulatory T Polarization in Antigen and Collagen-induced Arthritis: Hypoxia-inducible Factor-1 α as a Target. *Oman Med J.* 2020;35(1):e90.
74. Wu L, Cai X, Zhang S, et al. Regeneration of articular cartilage by adipose tissue derived mesenchymal stem cells: perspectives from stem cell biology and molecular medicine. *J Cell Physiol.* 2013;228(5):938-44.
75. Gole Y, Gargne O, Coulange M, et al. Hyperoxia-induced alterations in cardiovascular function and autonomic control during return to normoxic breathing. *Eur J Appl Physiol.* 2011;111:937–46.
76. Leask A. Potential therapeutic targets for cardiac fibrosis: TGFbeta, angiotensin, endothelin, CCN2, and PDGF, partners in fibroblast activation. *Circ Res.* 2010; 106(11):1675–80.
77. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, et al. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev.* 2011;17:6–63.
78. Fernando MR, Reyes JL, Iannuzzi J, et al. The pro-inflammatory cytokine, interleukin6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PLoS One.* 2014;9(4):e94188.
79. Pricola KL, Kuhn NZ, Haleem-Smith H, et al. Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism. *J Cell Biochem.* 2009;108(3):577–88.
80. Thackham JA, McElwain DL, Long RJ. The use of hyperbaric oxygen therapy to treat chronic wounds: A review. *Wound Repair Regen.* 2008; 16(3):321–30.

81. Frangogiannis NG. The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2014;63(3):185–95.
82. Serhan CN, Chiang N, Dalli J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Semin Immunol.* 2015.
83. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing—more than a nutrient. *World J Surg.* 2004;28(3):294–300.
84. Warriner RA 3rd, Hopf HW. The effect of hyperbaric oxygen in the enhancement of healing in selected problem wounds. *Undersea Hyperb Med.* 2012;39(5):923–35.
85. Shah JB. Correction of Hypoxia, a Critical Element for Wound Bed Preparation Guidelines: TIMEO2 Principle of Wound Bed Preparation. *J Am Col Certif Wound Spec.* 2011;3(2):26–32.
86. Boykin JV Jr., C. Baylis Hyperbaric oxygen therapy mediates increased nitric oxide production associated with wound healing: a preliminary study. *Adv Skin Wound Care.* 2007;20(7):382–8.
87. Sheffield PJ. Measuring tissue oxygen tension: a review. *Undersea Hyperb Med.* 1998; 25(3):179–88.
88. Kendall AC, Whatmore JL, Harries LW, et al. Changes in inflammatory gene expression induced by hyperbaric oxygen treatment in human endothelial cells under chronic wound conditions. *Exp Cell Res.* 2012; 318(3):207–16.
89. Zhang Q, Chang Q, Cox RA, et al. Hyperbaric oxygen attenuates apoptosis and decreases inflammation in an ischemic wound model. *J Invest Dermatol.* 2008; 128(8):2102–12.
90. Sheikh AY, Rollins MD, Hopf HW, et al. Hyperoxia improves microvascular perfusion in a murine wound model. *Wound Repair Regen.* 2005; 13(3):303–8.
91. Garcia-Covarrubias L, Cuauhtemoc Sanchez-Rodriguez E. [Hyperbaric oxygenation therapy, basic concepts]. *Gac Med Mex.* 2000; 136(1):45–56.
92. Yildirim AO, Eryilmaz M, Kaldirim U, et al. Effectiveness of hyperbaric oxygen and ozone applications in tissue healing in generated soft tissue trauma model in rats: an experimental study. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2014; 20(3):167–75.
93. Zgheib C, Xu J, Liechty KW. Targeting Inflammatory Cytokines and Extracellular Matrix Composition to Promote Wound Regeneration. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2014;3(4):344–55.
94. Aydin F, Kaya A, Savran A, et al. Diabetic hand infections and hyperbaric oxygen therapy. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2014;48(6):649–54.
95. Wells PG, McCallum GP, Chen CS, et al. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol Sci.* 2009;108(1):4–18.
96. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol.* 2009;106:988–95.
97. Zhou Q, Huang G, Yu X, et al. A Novel Approach to Estimate ROS Origination by Hyperbaric Oxygen Exposure, Targeted Probes and Specific Inhibitors. *Cell Physiol Biochem.* 2018;47(5):1800-1808.
98. Sureda A, Batle JM, Martorell M, et al. Antioxidant Response of Chronic Wounds to Hyperbaric Oxygen Therapy. *PLoS One.* 2016;11(9):e0163371.
99. Gasier HG, Fothergill DM. Oxidative stress, antioxidant defenses and nitric oxide production following hyperoxic exposures. *Undersea Hyperb Med.* 2013;40(2):125–34.

100. Chiang N, Shinohara M, Dalli J, et al. Inhaled carbon monoxide accelerates resolution of inflammation via unique proresolving mediator-heme oxygenase-1 circuits. *J Immunol.* 2013;190(12):6378–88.
101. Handy RD, Bryson P, Moody AJ, et al. Oxidative metabolism in platelets, platelet aggregation, and hematology in patients undergoing multiple hyperbaric oxygen exposures. *Undersea Hyperb Med.* 2005;32(5):327–40.
102. Sureda A, Ferrer MD, Batle JM, et al. Scuba diving increases erythrocyte and plasma antioxidant defenses and spares NO without oxidative damage. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 2009;41:1271–6.
103. Godman CA, Joshi R, Giardina C, et al. Hyperbaric oxygen treatment induces antioxidant gene expression. *Ann N Y Acad Sci.* 2010; 1197:178–83.
104. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *J Appl Physiol (1985).* 2009;106(3):988–95.
105. Vince RV, Midgley AW, Laden G, et al. The effect of hyperbaric oxygen preconditioning on heat shock protein 72 expression following in vitro stress in human monocytes. *Cell Stress Chaperones.* 2011;16(3):339–43.
106. Chen Q, Banick PD, Thom SR. Functional inhibition of rat polymorphonuclear leukocyte B2 integrins by hyperbaric oxygen is associated with impaired cGMP synthesis. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996;276(3):929–33.
107. Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL, et al. Reversible blockade of electron transport during ischemia protects mitochondria and decreases myocardial injury following reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319(3):1405–12.
108. Palzur E, Zaaroor M, Vlodaysky E, et al. Neuroprotective effect of hyperbaric oxygen therapy in brain injury is mediated by preservation of mitochondrial membrane properties. *Brain Res.* 2008;1221:126–33.
109. Tang Y, Zhang MJ, Hellmann J, et al. Proresolution therapy for the treatment of delayed healing of diabetic wounds. *Diabetes.* 2013;62(2):618–27.
110. Kuhn KA, Manieri NA, Liu TC, et al. IL-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury. *PLoS One.* 2014; 9(12):e114195.
111. Fontes JA, Rose NR, Cihakova D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine.* 2015;74(1):62–8.
112. Gordillo GM, Roy S, Khanna S, et al. Topical oxygen therapy induces vascular endothelial growth factor expression and improves closure of clinically presented chronic wounds. *Clin Exp Pharm Physiol* 2008;35:957–64.
113. Luo JD, Chen AF. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol.* 2005; 26:259–64.
114. Jung S, Wermker K, Poetschik H, et al. The impact of hyperbaric oxygen therapy on serological values of vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF). *Head Face Med.* 2010;6:29.
115. Zachary I, Glick G. Signaling transduction mechanism mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res.* 2001; 49:568–81.
116. Lee CC, Chen SC, Tsai SC, et al. Hyperbaric oxygen induces VEGF expression through ERK, JNK and c-Jun/AP-1 activation in human umbilical vein endothelial cells. *J Biomed Sci.* 2006;13(1):143–56.

БИОГРАФИЈА

Александар Јушковић је рођен 16.01.1966. године у Бијелом Пољу у Црној Гори. Завршио је основну и средњу школу у Бијелом Пољу са одличним успехом. 1985/1986 године је уписао Медицински факултет у Београду и завршио 1993. године са просечном оценом 8,86. Започео је специјализацију из ортопедије 1997/1998. године на Медицинском факултету у Београду, а специјалистички испит положио 25.06.2002. године. 1997/1998. године је уписао магистарске студије из ортопедије на Медицинском факултету у Београду и положио предвиђене испите. Од јануара 1995. године ради на Клиници за ортопедију и трауматологију Клиничког центра Црне Горе, прво као клинички лекар, затим као специјализант, а по завршеној специјализацији од 2002. године као ортопед. Од 2015. године је начелник Одељења за трауматологију Клинике за ортопедију и трауматологију Клиничког центра Црне Горе. 2011. године је уписао докторске студије на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Клиничка и експериментална хирургија. Положио је предвиђене испите и усмени испит. У више наврата је био на усавршавању у земљи и иностранству. Његово најуже подручје рада представља решавање комплексних прелома костију савременим методама, као и хирургија повреда и обољења кичменог стуба. Увео је у своју установу савремене технике решавања прелома: интрамедуларну фиксацију прелома дугих костију и фиксацију прелома закључаним плочама. Аутор је и коаутор више радова из области ортопедије и трауматологије коштано-зглобног система. Учествовао је у изради књиге “Развојни поремећај кука” проф. др Милоша Цимбачјевића. Учествовао је на више међународних и националних стручних конгреса и семинара. Ментор је специјализантима из области ортопедије у његовој установи. Говори енглески језик, а служи се и немачким језиком.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. **Juskovic A**, Nikolic M, Ljubic B, Matic A, Zivkovic V, Vucicevic K, Milosavljevic Z, Vojinovic R, Jovicic N, Zivanovic S, Milivojevic N, Jakovljevic V, Bolevich S, Miletic Kovacevic M. Effects of Combined Allogenic Adipose Stem Cells and Hyperbaric Oxygenation Treatment on Pathogenesis of Osteoarthritis in Knee Joint Induced by Monoiodoacetate. *Int J Mol Sci.* 2022;23(14):7695.
2. **Juskovic A**, Pesic G, Kezunovic M, Jeremic J, Bulatovic N, Dasic Z. Treatment of complex femoral fractures with the long intramedullary gamma nail. *SJECR.* 2019;20(4):337–342.
3. Fatic N, Radojevic N, Obadovic J, **Juskovic A**. Axillary arterial thrombosis secondary to re-fracture of the humerus. *OAMJMS.* 2014;2(4):618–621.
4. Bulatović N, Aligrudić V, Dasić Z, Pepić D, **Jusković A**. Operative vs. non-operative treatment of acute Achilles tendon rupture. *Acta Chir Jugosl.* 2013;60(3):57–60.

СКРАЋЕНИЦЕ

ASCs - адултне матичне ћелије

ATP - аденозин трифосфат

ATM - амосфера

ADMSC - мезенхималне матичне ћелије изоловане из масног ткива

CAT – каталаза

DC - дендритске ћелије

DMEM - Дулбеков модификовани медијум

ГА - гоартритис

GSH – глутатион

H₂O₂ - водоник пероксид

HBO -

IL- интерлеукин

IFN- γ - интерферона-гама

MIA - натријум јодоацетата

MSCs – мезенхималне матичне ћелије

NO - азот моноксид

O₂⁻ - супероксид анион радикал

OA - осеоартритис

ROS - реактивне врсте кисеоника

rpm - обртаја у минути

SOD - супероксид дисмутаза

TBARS - реактивне супстанце тиобарбитурне киселине (производи липидне пероксидације)

TNF- α - фактор некрозе тумора алфа

VEGF - васкуларним ендотелним фактором раста

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСKE ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

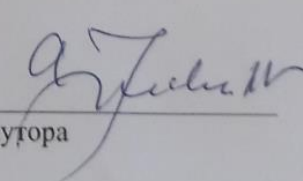
Утицај комбинованог третмана алогеним матичним ћелијама из масног ткива и хипербаричном оксигенацијом на прогресију експерименталног гонартритиса код пацова

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,

у Подгорици, 29.12.2022 године,



потпис аутора

Образац 2

**ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ**

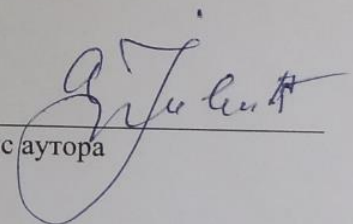
Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под насловом:

Утицај комбинованог третмана алогеним матичним ћелијама из масног ткива и
хипербаричном оксигенацијом на прогресију експерименталног гонартритиса код
пацова

истоветне.

у Подгорици, 29.12.2022 године,

потпис аутора



ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Александар Јушковић

дозвољавам

не дозвољавам

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

Утицај комбинованог третмана алогеним матичним ћелијама из масног ткива и хипербаричном оксигенацијом на прогресију експерименталног гонартритиса код пацова

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

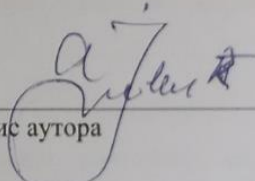
не дозвољавам¹

¹ 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 прерада²

у Порпорици, 29.12.2022 године,



потпис аутора

² 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/>