



UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET

**Karakteristike akutne zapaljenske reakcije miševa
sa uklonjenim genom za makrofagni inhibitorni
faktor**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentor:

Prof. dr Branislava Belić

Kandidat:

mr sc. vet. med. Milijana Vasiljevska

Novi Sad, 2016

**UNIVERZITET U NOVOM SADU
POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

Ključna dokumentacijska informatika

Redni broj:
RBR

Identifikacioni broj:
IBR

Tip dokumentacije:
TD

Monografska dokumentacija

Tip zapisa:
TZ

Tekstualni štampani materijal

Vrsta rada:
VR

Doktorska disertacija

Autor:
AU

Milijana Vasiljevska

Mentor/komentor:
MN

Prof. dr Branislava Belić, vanredni profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Naslov rada:
NR

Karakteristike akutne zapaljenske reakcije miševa sa uklonjenim genom za makrofagni inhibitorni faktor

Jezik publikacije:
JP

Srpski

Jezik izvoda:
JI

Srpski/engleski

Zemlja publikovanja:
ZP

Republika Srbija

Uže geografsko područje:
UGP

AP Vojvodina

Godina: 2016.
GO

Izdavač: Autorski reprint
IZ

Mesto i adresa
MS Poljoprivredni fakultet Novi Sad, Trg
Dositeja Obradovića 8, Novi Sad,
Srbija; Departman za Veterinarsku
medicinu.

Fizički opis rada:
FO Uvodni deo; Hipoteza i ciljevi
istraživanja, Materijal i metode
istraživanja; Rezultati; Diskusija;
Literatura; 118 strana; 4 slike; 46
grafikona; 1 tabela; 168 referenci

Naučna oblast:
NO Veterinarska medicina

Naučna disciplina:
ND Patofiziologija

Predmetna odrednica,
ključne reči
PO Makrofagni inhibitorski faktor,
"Knock-out" životinje,
Inflamacija,
Apoptoza,
Citokini,
NO

UDK 576.113:599.323.4 (043.3)

Čuva se:
ČU Biblioteka Poljoprivrednog fakulteta
Novi Sad

Važna napomena:
VN Nema

Izvod:
IZ

Cilj ovog rada je bio da se ispituju karakteristike sterilne zapaljenske reakcije u miševa sa delecijom *Mif* gena, korišćenjem modela subkutane implantacije polivinilskih sundera. Iako je MIF poznat pro-inflamacijski citokin o njegovom uticaju na procese regeneracije nakon oštećenja tkiva postoje kontradiktorni podaci. Zbog toga su u pokušaju razumevanja ovog problema ispitivani dinamika promena ćelijskih

elemenata u eksudatu rane, procesi apoptoze inflamacijskih ćelija i njihova funkcionalna sposobnost *in vitro* (adhezivnost i produkcija NO). Ovi parametri su povezivani sa nivoom različitih biomolekula u eksudatu (pro- i anti-inflamacijskih citokina), hemokina; faktora rasta reaktanata akutne faze i NO). Dobijeni rezultati su poređeni sa rezultatima kod kontrolnog divljeg soja C57BL/6 (*Mif*^{+/+}) miševa sa očuvanim *Mif* genom. Pokazano je da ranu fazu inflamacije (24 časa posle implantacije sunđera) karakteriše smanjeno nakupljanje neutrofilnih granulocita, manja produkcija IL- β , IFN- γ , IL-12 i NO, povećana produkcija IL-33 i GM-CSF i neočekivano manja apoptoza neutrofila u odnosu na divlji soj miševa. Shodno očekivanju, inflamacijske ćelije u kulturi su produkovale više NO, imale veću spontanu apoptozu koja se bitnije nije menjala pod uticajem LPS-a, ali su takođe neočekivano imale povećanu adhezivnost za plastiku. Kasnu fazu inflamacije (10. dana od implantacije sunđera) je karakterisalo manje nakupljanje granulocita; makrofaga i dendritskih ćelija što nije bilo povezano sa brojem neutrofila i monocita u perifernoj krvi, veće stvaranje džinovskih multijedarnih makrofaga i povećanje apoptoze kako neutrofila tako i makrofaga. U eksudatu su nađeni niži nivoi NO, IL- β , TNF- α i CXCL10 a povećani nivoi IL-12, IL-33, IL-1Ra i CRP. Inflamacijske ćelije su u kulturi produkovale niže nivoe NO ali su, slično kao u ranoj fazi, imale povećanu spontanu i indukovanu adhezivnost za plastiku, u odnosu na divlji soj miševa. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da predominacija anti-inflamacijskih medijatora kod *Mif*^{-/-} miševa, praćena smanjenom mobilizacijom inflamacijskih ćelija u povređeno tkivo i povećanjem njihove apoptoze, mogu delovati povoljno na bržu rezoluciju inflamacije.

Datum prihvatanja teme od strane NNV:

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

1. Akademik Miodrag Čolić, profesor emeritus, Mikrobiologija i imunologija, Univerzitet odbrane u Beogradu, predsednik

2. dr Marko Cincović, docent, Patologija-Patofiziologija, Poljoprivredni fakultet Novi Sad, departman za veterinarsku medicinu, član

3. dr Ivana Davidov, docent, Patologija, Poljoprivredni fakultet Novi Sad, departman za veterinarsku medicinu, član

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF AGRICULTURE**

Key words documentation

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type:

DT

Monograph publication

Type of record:

TR

Textual printed material

Contents code:

CC

PhD thesis

Author:

AU

Milijana Vasiljevska

Menthor/co-mentor

MN

Dr. Branislava Belić, Associate
Professor, Faculty of Agriculture,
Novi Sad

Title:

TI

Characteristics of the acute
inflammatory reaction in macrophage
migration inhibitory factor deficient
mice

Language of text:

LT

Serbian

Language of abstract:

LA

Serbian/English

Country of publication:

CP

Republic of Serbia

Locality of publication:

LP

Vojvodina

Publication year:

2016

PY

Publisher:

Author's reprint

PU

Publication place:

21000 Novi Sad, Department of
Veterinary medicine, Faculty of
Agriculture, square of Dositej
Obradovic 8

PP

Physical description:

Introduction; Materials and methods;
Results; Discussion; 118 pages in
total , 4 pictures; 46 figures; 1 table;
168 references.

PD

Scientific field:

Veterinary

SF

Scientific discipline:

Pathophysiology

SD

Subject/key words:

Macrophage inhibitory factor
"Knock-out" animals,
Inflammation,
Apoptosis,
Cytokines,
NO

UDC

576.113:599.323.4 (043.3)

Holding data:

Library of Faculty of Agriculture
Novi Sad

HD

Note:

None

N

Abstract:

AB

The aim of this study was to examine the characteristics of sterile inflammatory reaction in Mif knockout mice, by using a model of subcutaneous implantation of polyvinyl sponges. Although MIF has been known as a pro-inflammatory cytokine, the data about its role in the regeneration following tissue damage are controversial. Therefore, in an attempt to understand this problem, the dynamics of cellular elements in the exudate, apoptosis of inflammatory cells and their functional capability in vitro (adhesiveness and NO production) were examined. These parameters have been

correlated with the levels of different biomolecules in the exudate (pro-and anti-inflammatory cytokines, chemokines, growth factors, acute phase reactants and NO). The obtained results have been correlated with those in control, wild type, C57BL/6 mice. It has been shown that the early phase (24 hours after implantation of the sponges) was characterized by decreased recruitment of neutrophil granulocytes, lower production of IL- β , IFN- γ , IL-12 and NO, increased production of IL-33 and GM-CSF and, unexpectedly, by decreased neutrophil apoptosis, compared to the wild type of mice. As expected, the inflammatory cells produced higher quantity of NO in culture, had higher spontaneous apoptosis, which has not been changed significantly by LPS and also, unexpectedly, had increased adhesiveness to plastic. The late inflammatory phase (10. days after sponge implantation) was characterised by lower accumulation of neutrophils, macrophages and dendritic cells, which was not associated with the numbers of granulocytes and monocytes in peripheral blood, by higher generation of giant, multinuclear macrophages and increased apoptosis of both neutrophils and macrophages. Lower levels of NO, IL- β , TNF- α and CXCL10 and increased levels IL-12, IL-33, IL-1Ra and CRP were found in the exudate. Inflammatory cells produced lower levels of NO in culture, but similarly as in the early phase, increased both spontaneous and induced adhesiveness to plastic, compared to the wild type of mice. Based on the obtained results it can be concluded that the predomination of anti-inflammatory mediators in *Mif*^{-/-} mice, followed by reduced recruitment of inflammatory cells to the damaged tissue and increased apoptosis of these cells, may have beneficial effect on faster resolution of inflammation.

Accepted by the Scientific Board on:
ASB

Defended on:
DE

Thesis Defend Board
DB

1. Academician Miodrag Čolić, Professor Emeritus, Microbiology and Immunology, University of Defence in Belgrade, president
2. Dr. Marko Cincović, Assistant Professor, Pathology-Pathophysiology, Faculty of Agriculture, Novi Sad, Department of Veterinary Medicine, member
3. Dr. Ivana Davidov, Assistant Professor, Pathology, Faculty of Agriculture, Novi Sad, Department of Veterinary Medicine, member

Sadržaj

1	Uvod	1
1.1	Miš kao model za istraživanja.....	1
1.2	Inbredni miševi.....	2
1.2.1	Genetski status životinja	2
1.2.2	Inbredovanje (ukrštanje u srodstvu)	2
1.3	C57BL/6 soj miša.....	3
1.4	Genetski modificirani miševi	4
1.4.1	Transgeni miševi.....	5
1.4.2	Životinje sa ciljanom delecijom („knock-out“ životinje)	6
1.4.3	Uslovni (kondicional) „knock-out“ miševi.....	8
1.4.4	„Knock-in“ mutageneza (uvođenje nove funkcije)	9
1.4.5	„Knock-down“ miševi	10
1.5	Inflamacija.....	10
1.5.1	Uloga neutrofilnih granulocita u inflamaciji	11
1.5.2	Uloga makrofaga u procesima inflamacije	15
1.6	Specifičnosti reakcije na strano telo.....	20
1.7	Faktor inhibicije migracije makrofaga	21
2	Hipoteze i ciljevi istraživanja	29
3	Materijal i metode istraživanja	31
3.1	Medijumi, rastvori i reagensi	31
3.1.1	Osnovni (kompletni) medijum za kultivaciju ćelija	31
3.1.2	Rastvor Na-EDTA	31
3.1.3	Izotonični rastvor za liziranje eritrocita:.....	31
3.1.4	PBS (Phosphat-buffered saline) pH 7.56.....	31
3.1.5	PBS1	32
3.1.6	PBS2	32
3.1.7	Lipopolisaharid.....	32
3.1.8	Griess-ov reagens.....	32

3.2	Ekperimentalne zivotinje	32
3.3	Praćenje bioloških i hematoloških parametara kod miševa	33
3.4	Ekperimentalni model inflamacije.....	33
3.4.1	Priprema sunđera	33
3.4.2	Implantacija sunđera	33
3.4.3	Priprema suspenzije inflamacijskih ćelija.....	34
3.4.4	Liziranje eritrocita.....	34
3.4.5	Priprema citospin preparata	35
3.4.6	May-Grunwald Giemsa bojenje.....	35
3.5	Testovi za detekciju apoptoze	35
3.5.1	Morfološki metod	35
3.5.2	Merenje apoptoze vezivanjem aneksin-V FITC	36
3.6	Testovi za procenu funkcionalne aktivnosti inflamacijskih ćelija	36
3.6.1	Detekcija nitrita (po Griess-u).....	36
3.6.2	Određivanje koncentracije citokina i C reaktivnog proteina	37
3.7	Obrada podataka.....	38
4	Rezultati.....	39
4.1	Biološke karakteristike <i>Mif^{-/-}</i> i <i>Mif^{+/+}</i> miševa	39
4.2	Hematološki parametri odraslih <i>Mif^{-/-}</i> i <i>Mif^{+/+}</i> miševa	40
4.3	Rana faza inflamacije	42
4.3.1	Zapremina eksudata	42
4.3.2	Ukupna celularnost	43
4.3.3	Sastav inflamacijskih ćelija	44
4.3.4	Apoptoza.....	48
4.3.5	Produkcija NO in vivo	52
4.3.6	Produkcija citokina in vivo	53
4.3.7	Adhezija inflamacijskih ćelija in vitro.....	63
4.3.8	Produkcija NO in vitro.....	64
4.3.9	Apoptoza inflamacijskih ćelija u kulturi.....	65
4.4	Kasna faza inflamacije u <i>Mif^{-/-}</i> i <i>Mif^{+/+}</i>	68

4.4.1	Zapremina eksudata	68
4.4.2	Ukupna celularnost	69
4.4.3	Sastav inflamacijskih ćelija	70
4.4.4	Apoptoza.....	74
4.4.5	Produkcija NO in vivo	76
4.4.6	Produkcija citokina in vivo	77
4.4.7	Adhezija inflamacijskih ćelija in vitro.....	87
4.4.8	Produkcija NO u kulturi.....	88
5	DISKUSIJA.....	90
6	Zaključci	105
7	Literatura	106

1 Uvod

1.1 Miš kao model za istraživanja

Od svih laboratorijskih životinja u eksperimentalnim istraživanjima se najčešće koriste glodari (70-80% svih kičmenjaka). Ova grupa životinja predstavlja najveći red među sisarima sa oko 1800 opisanih vrsta. Od glodara najčešće se koriste miš (*Mus musculus*) i pacov (*Ratus norvegicus*).

Miš je najmanji sisar koji se upotrebljava kao laboratorijska životinja. U laboratorijskim uslovima odrasli miš star 10 nedelja, prosečno ima telesnu masu 25 g, a u trenutku kada se okoti ima masu oko 1,5 g. Navedene vrednosti zavise od soja i pola. Životni vek laboratorijskog miša je 1 - 2 godine, a u biomedicinskim istraživanjima koristi se najčešće u starosti od 2 do 7 meseci (Green, 1975). U laboratorijskim uslovima ženke postaju polno zrele između 4. i 6. nedelje života. Jedan od prvih znakova puberteta laboratorijskog miša je povlačenje opne koja u ranoj mladosti zatvara vaginu. Jajne ćelije počinju da sazrevaju 2 do 10 dana kasnije. U poređenju sa ženkama, kod mužjaka pubertet kasni za oko 2 nedelje. Na pojavu puberteta kod miševa utiču brojni spoljašnji uticaji: temperatura okoline, dužina dana i veličina okota iz kojeg jedinka potiče a prvenstveno feromoni. Putem feromona odrasle ženke ili njihov urin usporavaju pojavu puberteta kod nezrelih ženki, a na isti način deluju odrasli mužjaci na nezrele mužjake. Međutim, prisutnost odraslih mužjaka ili njihovog urina podstiče pubertet kod nezrelih ženki (Bishop i sar., 1966). Kod polno zrele ženke oslobađanje jajnih ćelija iz jajnika (estrus) zavisi od prisutnosti polno zrelog mužjaka. Ako je mužjak prisutan, estrus se javlja svaka 4 dana a svaki 5. ili 6. dan ako se mužjak ukloni. Poznato je da ženke gube estrus ako bez mužjaka borave u većim grupama, odnosno da u velikom postotku ulaze u estrus 3 dana nakon unosa mužjaka u grupu. Parenje laboratorijskih miševa obično se događa noću, u vreme oslobađanja jajnih ćelija. Najčešće se osemenjavanje događa između 22 i 24 sata, pucanje Grafovog folikula oko ponoći, a oplodnja oko 1 sat iza ponoći. Potvrda parenja je pojava sluznog čepa u vagini ženke, što se može videti pregledom vagine do kasnih jutarnjih sati. Oplodjenje se dešava u oko 70% ženki kod kojih je nađen vaginalni čep, međutim kod nekih srođenih (inbrednih) sojeva procenat oplodjenih ženki može biti značajno manji. U ćelijama miša broj diploidnih

hromosoma je 40. Oocita ne postoji kao haploidna ćelija, jer se mejoza završava kada spermatozoid proдре u oocitu. Tada se izdvaja drugo polarno telašće, a muški i ženski pronukleus ostaju odvojeni čineći dva susedna seta hromosoma (Foster i sar., 1981). Brazdanje zigota počinje 18-22 sata nakon što je spermatozoid prodro u oocitu. Sve vreme nakon ovulacije, oocita, a kasnije embrion, putuje jajovodom. Treći dan, kao morula, embrion ulazi u matericu, a između 4. i 5. dana u stadijumu blastociste implantira se u sluznicu endometrijuma. Tačno poznavanje ovog procesa omogućilo je stvaranje laboratorijskih transgenih miševa. Sazrevanje plodova (trudnoća) traje 19 - 21 dan, a okot se obično događa između ponoći i 4 sata ujutro. Miševi se rađaju slepi i bez dlake. U proseku većina ženki okoti 5 - 10 mladih. Na broj mladih utiču genetski i spoljni faktori (npr. procenat srođenosti soja, prisutnost nekih alela, hromozomske nepravilnosti, hrana, dužina dana, temperatura i sl.). Ženke imaju novi estrus odmah nakon koćenja (tzv. postpartalni estrus). Dođe li do oplodnje u tom estrusu, plodnost je manja, a zbog pojačanog izlučivanja mleka može se odložiti implantacija embriona, pa se novi, manji okot javlja nakon 25-31 dana.

1.2 Inbredni miševi

1.2.1 Genetski status životinja

Smatra se da je glavni faktor koji doprinosi različitosti rezultata, u eksperimentima sa životinjama, genetski status životinja. U nekim eksperimentima poželjne su genetske razlike između individa u ispitivanoj grupi, na primer kada se rezultati ekstrapoliraju na druge vrste, kao u testu toksičnosti, dok drugi eksperimenti zahtevaju ujednačenu populaciju životinja. Bez obzira na zahteve testa, rezultati koji se dobijaju, moraju biti reproducibilni. Iz tog razloga, genetski status životinja se mora standardizovati, što se postiže specifičnim načinom uzgajanja (ukrštanje u srodstvu) ili biotehnoškim manipulacijama. Obe tehnike daju populacije životinja sa standardizovanom genetskom varijacijom.

1.2.2 Inbredovanje (ukrštanje u srodstvu)

Ukrštanje u srodstvu (inbredovanje) je metoda sa biparentalnim razmnožavanjem u bliskom srodstvu u toku više generacija (na primer ukrštanje brata sa sestrom ili parenje potomaka sa neposrednim roditeljima) čime se postiže povećanje homozigotnosti i smanjenje heterozigotnosti u populaciji. Homozigotne

jedinke čiji su aleli identični po poreklu nazivaju se još i autozigotne, za razliku od homozigotnih jedinki koje nemaju zajedničke pretke i označavaju se kao alozigotne. Stepenn inbredovanja ili homozigotnosti se izražava koeficijentom inbridinga (F) koji predstavlja verovatnoću da su dva alela na ma kom genskom lokusu identična po poreklu (autozigotna). F je deo originalnih heterozigotnih gena koji se fiksiraju u homozigotnom stanju za vreme inbredovanja. Može se definisati i kao postotak redukcije heterozigotnih lokusa počevši od nekog određenog nivoa, na pr. divlje populacije. F se povećava sa brojem generacija u inbredovanju što zavisi od stepena srodstva među rođacima. U vrsta kod kojih je nemoguća samooplodnja najviši nivo inbridinga dobija se parenjem brata sa sestrom i u takvom sistemu F se povećava oko 19% u svakoj novoj generaciji. Parenje okota sa mlađim roditeljem dovodi takođe do povećanja autozomnih gena i daje vrednosti F oko 29% za polno vezane gene. Ako se inbredovanje nastavlja vrednost F raste i u svakoj novoj generaciji se može izračunati (Falconer, 1960). Teoretski je kod 21 generacije 98,6% originalnih heterozigotnih lokusa fiksirano u homozigotnom stanju, procenat homozigotnosti je skoro na maksimumu, ali su u praksi još uvek moguće male varijacije unutar inbrednog soja zbog malog procenta heterozigotnosti koji se može zadržati prirodnom ili usmerenom selekcijom radi održavanja fertiliteta. Mali stepen heterozigotnosti se takođe javlja kao posledica spontanijh mutacija (najmanje četiri mutacije po generaciji), bilo da su one vidljive ili nevidljive. Može se reći da je genetska razlika unutar jednog inbrednog soja veoma mala, praktično zanemarljiva u poređenju sa razlikama među raznim inbrednim sojevima ili među heterozigotnim jedinkama u outbrednim sojevima. Iz ovijh razloga se ni jedan soj ne može smatrati apsolutno homozigotnim posle dvadeset generacija i inbredovanje se mora stalno nastavljati, da bi se takav soj održao sa najvišim stepenom homozigotnosti.

1.3 C57BL/6 soj miša

C57BL/6 je najpopularniji inbredni soj miša, crne boje, često se naziva "crni C576" ili samo "crni 6" (standardna skraćenica: B6). Njegova ogromna popularnost uglavnom je zasnovana na detaljnom poznavanju njegove fiziologije i genetike, ali i zbog lakog uzgoja i izdržljivosti. Njegov genotip je *a/a*, a MHC haplotip *H2^b*. Inbredni soj miševa C57BL/6 je 1921. godine stvorio istraživač C.C Little u

Cold Spring Harboru, kada je spario ženku broj 57 sa mužjakom broj 52 iz Miss Abbie Lathrop's štoka. Ukrštanje je dalo potomke tamne boje (crne i braon) C57BL i C57BR. Tokom 1935. godine se razvilo puno podsojeva, ali se izdvojilo sedam glavnih. Podsojevi 6 i 10 su razdvojeni pre 1937. godine. Podlinija "6" je bila najpopularnija među sedam podlinija ovog soja.

C57BL/6 je homozigotan za *Cdh23^{ahl}*. Ova mutacija ima za posledicu gubitak sluha koji počinje sa 10 meseci starosti jedinke i progresivno se pogoršava sa starošću jedinke.

C57BL/6 se koristi u brojnim istraživačkim oblastima, uključujući genetiku, imunologiju, neurobiologiju, dijabetes, gojaznost ili u kardiovaskularnim istraživanjima. Takođe se često koristi kao soj sa osnovom za stvaranje kongenih životinja, u kojih se zadržavaju spontane ili indukovane mutacije ili se koristi za proizvodnju genetski modifikovanih modela miševa. Generalno se može reći da se C57BL/6 miševi relativno lako, dugovečni su i imaju nisku osetljivost na spontanu pojavu tumora.

Prosečna dužina života kod mužjaka iznosi 800 dana a 750 dana kod ženki, prema istraživanjima Rowlatt i sar. (1976). Ovaj soj je neobično osetljiv na bol, hladno, buku i mirise. Za razliku od većine sojeva miševa, on pije alkoholna pića dobrovoljno. Veoma je osetljiv na delovanje morfina i lako postaje zavisian.

Primitivne hematopoetske matične ćelije izolovane iz C57BL/6J miševa pokazuju znatno odloženo starenje u odnosu na druge sojeve miševa kao što su BALB/c ili DBA/2J, što je dominantna osobina ovog soja. Ostale karakteristike uključuju: 1) visoku osetljivost na razvoj gojaznosti indukovane ishranom, dijabetesa tip 2, i ateroskleroze; 2) visoku učestalost mikrooftalmije i druge očne abnormalnosti; 3) otpor na audiogeni stres; 4) nisku gustinu kostiju; 5) gubljenje dlake; 6) sklonost za alkohol i morfijum; 7) u kasnijoj dobi gubitak sluha; i 8) povećana učestalost hidrocefalusa i malokluzija (Mekada i sar., 2009).

1.4 Genski modifikovani miševi

Karakteristike jedne životinje (pored ostalih faktora), najviše zavise od ekspresije gena koje su nasledili od svojih roditelja. Kod metoda klasičnog ukrštanja genetskog materijala (kao najstarijeg oblika genske modifikacije) oplemenjivanje i

selekcija koje imaju za cilj da se odabere željena karakteristika organizma mogu da traju i po nekoliko godina. Takođe, na ovaj način može da se prenese i značajan broj gena nepoznatih funkcija. Iz tog razloga se sve češće koristi biotehnologija u cilju manipulacije genima. Ovi postupci se nazivaju tehnologija rekombinantne DNK, molekularna biotehnologija ili gensko inženjerstvo. Rekombinantna DNK tehnologija uključuje kloniranje DNK, kloniranje gena i kloniranje molekula, čime se omogućava stvaranje genetski modifikovanih organizama (GMO).

Tehnologija rekombinantne DNK razvijena je u toku poslednjih nekoliko decenija i izazvala je revoluciju u napretku nauke i njenoj primeni i to u bazičnim istraživanjima, medicini, veterini, farmaciji, agronomiji, šumarstvu i zaštiti životne sredine.

Tehnike genetskog inženjerstva pružaju mogućnost da se detaljno upoznaju i razumeju složene biološke pojave kao što su mehanizmi kojim eukariotske ćelije kontrolišu ekspresiju svojih genoma u toku razvića, imunološki odgovor, ćelijske deobe, onkogeneza, kognitivni procesi itd. Pored toga ove tehnike omogućavaju i da se utiče na navedene procese u cilju poboljšanja kvaliteta života jedinke (Guan i sar., 2005). Prvi rekombinantni DNK klon stvoren je 1972 godine, a krajem decenije naučnici su sintetisali i modifikovali gene i preneli ih u ćelije primaoce.

1.4.1 Transgeni miševi

Transgeneza ili transfer, znači (ubacivanje) nove DNK u životinju ili modifikovanje već postojeće DNK u životinji. Termin "transgena" životinja se odnosi na životinje u kojima su izvršene namerne modifikacije genoma, za razliku od spontanih mutacija. Ovakva životinja ima osobine koje *divlji* tip nema. "Transgen" se odnosi na segment rekombinantne DNK koji je ili unet u somatske ćelije ili stabilno integrisan u germinativnu liniju ćelija tj. u njihov lanac DNK i može se prenositi na sledeće generacije. U okviru stvaranja transgenih životinja (najčešće miševa koriste se tri metode: mikroubrizgavanje DNK u oplodenu jajnu ćeliju; unošenje transgena putem retrovirusa i manipulacija embrionalnim matičnim ćelijama.

1.4.2 Životinje sa ciljanom delecijom („knock-out“ životinje)

„Knock-out“ životinje predstavljaju životinje kod kojih je izazvana specifična genetska modifikacija, inaktivacija gena ugradnjom strane DNK ili zamena postojećeg gena mutiranom genskom varijantom.

Postoje dve metode dobijanja „knock-out“ miševa koje se izvode *in vitro* i obe počinju izdvajanjem embrionalnih matičnih ćelija u ranom stadijumu embriona miša, 4 dana posle oplodjenja.

Prvom metodom, nazvanom ciljanje gena ili homologna rekombinacija, modifikuje se gen u jedru embrionalne stem ćelije tako što se uvede veštački deo DNK koji ima identičan ili homologni deo tog gena. Drugom metodom, umesto direktnog delovanja na željeni gen koristi se nasumičan proces. Naime, veštački DNK molekul sadrži deo koji je napravljen tako da se umetne nasumično u bilo koji gen. Ovaj umetnuti deo sprečava RNK "spojni" mehanizam da funkcioniše ispravno, i isključuje funkciju gena u koji je umetnut.

„Ciljanje“ gena putem homologe rekombinacije je dovelo do revolucije u eksperimentalnoj genetici. Manipulisanje mišjim genomom omogućilo je uvid u delovanje preko 10 000 mišjih gena i uvođenje oko 500 mišjih modela za proučavanje bolesti ljudi. Ciljanje gena sastoji se u tome da se otkrije i izoluje gen, a zatim uz poznavanje strukture delova koji ga okružuju u embrionalnim stem ćelijama, homologom rekombinacijom, ugradi transgen na njegovo mesto.

Poseban doprinos u ovoj oblasti dali su Mario R. Capecchi, Martin J. Evans i Oliver Smithies koji su za svoja otkrića dobili Nobelovu nagradu za fiziologiju i medicinu 2007. godine. Evans je uspešno kultivisao embrionalne matične ćelije miša, a Capecchi i Smithies su otkrili da se u ćelijama sisara dešava homologa rekombinacija. Capecchi (1989) je pokušao da homologom rekombinacijom pojedine gene izbacila iz genoma miša (engl. *knock out*), dok je Smithies gene miša zamenio ljudskim genima (engl. *knock in*) i na taj način stvorio posebne animalne modele za izučavanje ljudskih bolesti (Smithies i sar., 1985).

Homologa rekombinacija je zamena jednog gena drugim genom, koji ima istu funkciju i lociran je na istom mestu u genomu organizma. Koristi se za ciljanje genskih sekvenci na specifičnim mestima u genomu. Prednost ove metode u odnosu

na mikroubrizgavanje je u tome što se može precizno odrediti mesto u genomu gde će se transgen ugraditi. Kod mikroubrizgavanja nema kontrole, ubačeni gen može da ode bilo gde, što često dovodi do problema. Upotreba homologe rekombinacije je moćna, jer daje istraživaču mogućnost da napravi neaktivnu verziju gena i zameni aktivnu, i na taj način ispita šta će se desiti ako se gen "isključi".

U ćelijama sisara homologa rekombinacija se događa retko, pa se embrionalne matične ćelije s ugrađenim transgenom tokom eksperimentalne procedure pažljivo izdvajaju. Za izdvajanje ćelija u kojima je došlo do homologe rekombinacije koristi se posebna strategija. Izdvajanje se bazira na dva ključna dela transgena: genu koji određuje otpornost na antibiotik (npr. neomicin) koji se uvek ugrađuje i genu za timidin kinazu virusa herpes simplex (HSV-tk) koji se gubi samo onda kada dođe do homologe rekombinacije. Nakon što se transgen unese u embrionalne matične ćelije, one se zasejavaju na selektivne podloge. Na podlozi s neomicinom preživljavaju ćelije koje su ugradile transgen, a na podlozi s ganciklovirom (deluje antivirusno) preživljavaju samo one ćelije kod kojih se transgen ugradio na mesto ciljanog gena homologom rekombinacijom, pri čemu je isečen gen za timidin kinazu. Ćelije kod kojih je željeni klonirani transgen integrisan nasumice (slučajno) biće rezistentne na neomicin ali će biti uništene pomoću ganciklovira. S druge strane, ćelije kod kojih je došlo do homologe rekombinacije, će biti rezistentne na oba agensa.

Ova "pozitivno-negativna selekcija" pokazuje da se egzogeni transgen ugradio u endogene sekvence DNK preživelih ćelija pomoću homologe rekombinacije. Ugradnja egzogenog transgena u sredinu endogenih nizova DNK obično uništava kodirajuće sekvence i dovodi do delecije jednog ili više egzona i na taj način onemogućava funkciju endogene DNK. Takve selektovane embrionalne matične ćelije se dodatno ispituju analizom DNK pomoću različitih tehnika kao što su *Southern*-blot hibridizacija ili lančana reakcija polimeraze (PCR). Embrionalne matične ćelije kod kojih je došlo do homologe rekombinacije se selektuju i ubrizgavaju u blastocistu miša koja se zatim implantira u lažno gravidne ženke.

Okoćeni miševi će biti himerični, jer se u embrionalnim stem ćelijama transgen može ugraditi samo u jedan hromozom. Neka tkiva sastojaće se od heterozigota kod kojih je došlo do mutacije ili uništavanja željenog gena dok će

druga tkiva nastati od embrionalnih matičnih ćelija koje su zaostale u normalnoj blastocisti. I polne ćelije su najčešće himerične ali s obzirom da su one haploidne, samo neke od njih sadrže kopiju hromozoma sa uništenim (mutiranim) genom. Ukrštanjem himeričnih sa inbrednim miševima mogu se dobiti heterozigotni „*knock-out*“ miševi, tako što jajna ćelija ili spermatozoidi himeričnih miševa, koji se spajaju sa polnim ćelijama inbrednih miševa sadrže kopiju hromozoma sa odstranjenim (mutiranim genom). Heterozigotni miševi se nazivaju i transiteri germinativnih linija. Od njih se sparivanjem po klasičnim Mendelovim segregacionim pravilima mogu dobiti homozigoti, odnosno „*knock-out*“ miševi koji su defektni u ekspresiji ciljanog gena.

1.4.3 Uslovni (kondicional) „*knock-out*“ miševi

Za razliku od konvencionalne mutacije gena koja je prisutna već od ranog embrionalnog razvoja u svim ćelijama („klasični” knock-out i knock-in miševi), kondicionalna mutacija gena se može aktivirati specifično u pojedinim ćelijama i/ili u željeno vreme.

Da bi se ostvarila kondicionalna mutacija gena neophodna su dva alela (miša): miš koji sadrži gen ili deo gena ograničen loxP sekvencama i miš koji sadrži Cre transgen (specifični i nespecifični, inducibilni i neinducibilni promotor). Kondicionalna mutacija gena može se ostvariti ukrštanjem ova dva miša, odnosno kada oba alela (cre i flox) postoje u istoj životinji.

Prednost uslovne nad klasičnom inaktivacijom je i ta što klasična inaktivacija nekih gena može da bude letalna u ranom embrionalnom periodu zbog čega je nemoguće proučavati njihovu funkciju u kasnijim fazama razvoja i u odraslom organizmu.

Za izbacivanje (deleciju) gena iz genoma miša koristi se sistem za rekombinaciju koji postoji kod nižih organizama, a može se ugraditi i kod viših organizama. Jedan od takvih sistema je Cre/loxP, koji postoji u bakteriofagu P1 (Sauer i sar., 1988).

Cre je rekombinaza iz bakteriofaga P1 (skraćena za 38 kDa DNK), koja učestvuje u specifičnoj rekombinaciji između dva susedna loxP regiona, a kodira je gen cre (engl. *cyclization recombination gen*). Gen cre se može vezati za različite promotore, npr. promotor koji je specifičan za vrstu ćelija ili tkiva, promotor koji je

prisutan u određenoj fazi razvoja ili promotor koji se aktivira uz prisustvo spoljnog dodatka na primer tetraciklina. Na taj se način se može kontrolisati izbacivanje gena prostorno i vremenski.

LoxP regija (engl. *Locus of crossover in P1*) sastoji se od 34 baznih parova (u sredini 8 centralnih i sa svake strane je 13 ivičnih baza). Da bi se gen izbacio (izrezao), potrebne su dve linije miševa. U jednu liniju miševa ubacuje se transgen koji sadrži gen za Cre rekombinazu i odgovarajući promotor, a u drugu liniju miševa se ubacuje odabrani gen pomoću homologe rekombinacije, omeđen loxP regijama (engl. *flanked by lox P* ili *floxed*). Smerovi centralnog dela loxP regija određuju hoće li omeđeni gen biti isečen uz prisustvo Cre enzima, jer se ovaj proces dešava samo ako centralni delovi lox P regija imaju istu orijentaciju (trans-orijentaciju). Kada se transgeni miš, kod kojeg je gen oivičen loxP regijama u trans-orijentaciji, pari s transgenim mišem koji ima gen za Cre rekombinazu, i to vezanu za promotor specifičan za određeno tkivo, kod potomaka će doći do isecanja loxP oivičenog gena i to u svim tkivima u kojima je promotor aktivan (Guan i sar., 2010).

Ako se uz gen cre ugradi u promotor koji se reguliše tetraciklinom, do isecanja gena može doći kasnije kada se miševima u vodi za piće dodaje tetraciklin.

1.4.4 „Knock-in“ mutageneza (uvodenje nove funkcije)

„Knock-in“ miševi su slični „knock-out“ miševima. Kod njih se uvodi nova funkcija tako što se ugradi željeni gen pomoću homologe rekombinacije na definisano mesto u genomu. To je tehnika pomoću koje istraživači mogu izučavati funkciju regulatornih mehanizama (npr. promotora) koji određuju ekspresiju prirodnih gena koji su zamenjeni. Različitim manipulacijama sa određenim alelima, lokusima ili baznim sekvencama mogu se posmatrati specifične funkcije unutar gena. „Knock-in“ miševi su mnogo specifičniji za mutacije određenih alela ili lokusa unutar gena i na taj način omogućavaju izučavanje novih fenotipova u organizmima kod kojih je zamena izvršena. „Knock-in“ životinje proizvode i održavaju genetski proizvod, kao što su izmenjeni proteini. Održivost i specifičnost kod „knock-in“ miševa su osobine koje ih razlikuju od „knock-out“ miševa. Najčešća upotreba „knock-in“ tehnologije je stvaranje modela za izučavanje različitih bolesti, naročito za bolesti koje su slične bolestima kod ljudi.

1.4.5 „Knock-down“ miševi

Kod „knock-down“ miševa smanjena je ekspresija jednog ili više gena. Smanjenje se dešava genetskom modifikacijom ili tretiranjem sa kratkim delovima DNK ili RNK oligonukleotidima koji imaju sekvencu komplementarnu sa drugim genom ili iRNK transkriptom. Ako se genetska modifikacija desila na DNK takvi organizmi se zovu „knock-down“ organizmi.

Ukoliko je promena u ekspresiji gena prouzrokovana vezivanjem oligonukleotida za iRNK ili privremenim vezivanjem za gen, to vodi kratkotrajnoj promeni u ekspresiji gena bez modifikacije hromozomske DNK i onda je to „prolazni knock-down“. Vezivanje se može desiti blokiranjem transkripcije (u slučaju vezivanja za gen), degradacijom iRNK transkripta sa npr. malim interferirajućim RNK (siRNA), ili blokadom iRNK translacije, pre -iRNK splicing mesta itd.

Najčešće se gen „knock-down“ postiže RNK interferencom. RNK interferenca izaziva utišavanje gena putem degradacije iRNK. Ovaj postupak se postiže uvođenjem malih dvolančanih interferirajućih RNAs (siRNA) koje su komplementarne za ciljanu iRNK u citoplazmi. Male interferirajuće RNAs mogu da potiču iz ćelije ili da se unesu u ćeliju iz spoljnjne sredine. Kada su ušle u ćeliju siRNAs se pod dejstvom RNK spajaju stvarajući kompleks RISC (RNK-induced silencing complex). Nakon što je RISC lokalizovao ciljanu iRNK, RNK biva isečena pomoću ribonukleaza.

1.5 Inflamacija

Zapaljenje (inflamacija) je složen patofiziološki proces koji nastaje usled oštećenja tkiva ili prodora patogenih mikroorganizama u tkivo. Bez obzira na etiopatogenetski agens, zapaljensku reakciju odlikuje lokalno nakupljanje leukocita iz cirkulacije koje zajedno sa izlučenim medijatorima i medijatorima rezidentnih stromalnih ćelija, orkestriraju čitav niz događaja sa ciljem da se uništi agens koji je izazvao oštećenje tkiva i da se zatim aktiviraju mehanizmi reparacije (popravke) tkiva (Soehnlein i sar., 2010).

U inicijalnoj fazi, tkivne rezidentne ćelije urođenog imuniteta detektuju agense tkivnog oštećenja i alarmiraju brzu migraciju neutrofilnih granulocita iz

cirkulacije u oštećeno tkivo. Ovaj proces je praćen sledstvenom migracijom monocita koji se transformišu u tkivne makrofage i koji se zajedno sa neutrofilima bore da savladaju inflamacijski agens (inflamogen) (Mantovani i sar., 2011).

U normalnim okolnostima, neutrofil ulaze u proces apoptoze po obavljenoj funkciji a zatim bivaju eliminisani putem fagocitoze od strane tkivnih makrofaga (Fox i sar., 2010). Ovaj proces je praćen transformacijom makrofaga iz pro-inflamacijskog u anti-inflamacijski fenotip (Michlewska i sar., 2009), što je jedan od preduslova njihovog napuštanja tkiva putem eferentnih limfnih sudova i započinjanja složenog procesa rezolucije (zaustavljanja) inflamacije, restauracije i tkivne homeostaze.

Zapaljenska reakcija koja je rezultat tkivnog oštećenja kože započinje kratkotrajnom vazokonstrikcijom malih krvnih sudova u području povređenog tkiva koju smenjuje vazodilatacija i aktivacija sistema koagulacije (Haertel i sar., 2014). Ovaj proces je praćen nakupljanjem tečnosti (eksudata) bogate proteinima u tkivo čime se formira edem. Na taj način se stvaraju osnovni preduslovi za nakupljanje leukocita na mestu tkivnog oštećenja, ključnih medijatora i modulatora zapaljenja. Smatra se da je vodonik peroksid (H_2O_2) koji se stvara neposredno nakon oštećenja tkiva najraniji medijator privlačenja neutrofila iz krvne cirkulacije. Dodatni rani inflamacijski aktivatori su brojni faktori koji se oslobađaju iz degranulisanih trombocita, produkti razgradnje komplemента i produkti bakterijske degradacije (Haertel i sar., 2014).

Kada je u pitanju sterilna inflamacija koja je izazvana različitim partikulama endogenog ili egzogenog porekla (implantacioni biomaterijali) procesi zapaljenja traju dugo jer se pokretač teško eliminiše, što je praćeno dodatnim tkivnim oštećenjima usled delovanja brojnih produkata inflamacijskih ćelija (Rock i sar., 2010).

1.5.1 Uloga neutrofilnih granulocita u inflamaciji

Neutrofilni granulociti, koji predstavljaju tip polimorfonuklearnih leukocita, predstavljaju ključne ćelije akutne inflamacije (Kolaczkoška i Rubes, 2013). Ove ćelije se kontinuirano stvaraju u koštanoj srži od mijeloidnih prekursora a dnevna produkcija može biti i do 2×10^{11} ćelija (Borregaard, 2010). Proces granulocitopoeze je kontrolisan od strane faktora stimulacije granulocitnih kolonija (G-CSF) koji se

produkuje pod uticajem IL-17A a koga sintetiše subpopulacija T ćelija. Sekretija IL-17A je kontrolisana od strane IL-23 koga produkuju rezidentni makrofagi i dendritske ćelije (Kolaczowska i sar., 2013). Čovek i miš se razlikuju po broju cirkulišućih neutrofila. Dok kod čoveka oni čine 50-70% leukocita, u miša je njihova zastupljenost samo 10-25% (Mestas i sar., 2004). U cirkulaciji se mogu naći zreli neutrofilni granulociti sa segmentiranim jedrom ali i mlađi oblici sa nesegmentiranim jedrom u obliku trake ili potkovice. Zreli neutrofili sadrže tri tipa granula u svojoj citoplazmi bogatih proinflamacijskim proteinima čije se stvaranje nadovezuje jedno na drugo. Primarne (azurofilne) granule sadrže mijeloperoksidazu (MPO), sekundarne specifične granule sadrže laktoferin a tercijarne granule sadrže matriksnu metaloproteinazu 9 (MMP-9) poznatu pod nazivom i kao želatinaza B. Svaka od ovih tipova granula sadrži i dodatne produkte i enzime na osnovu kojih se mogu dalje deliti u više podtipova (Borregaard, 2010).

Neutrofili su tradicionalno smatrani za kratkoživeće ćelije, čiji je poluživot u cirkulaciji oko 1,5 čas u miša a oko 8 časova u čoveka. Međutim novija istraživanja pokazuju da je poluživotni vek ovih ćelija u cirkulaciji mnogo duži (12,5 časova kod miša a čak 5,4 dana kod čoveka) (Galli i sar., 2011). Iako se veruje da je ovaj vremenski period precenjen (Tofts i sar., 2011), životni vek neutrofila se produžava nekoliko puta na mestu inflamacije pod uticajem brojnih proinflamacijskih medijatora, faktora rasta i bakterijskih produkata (Colotta i sar., 1992).

Postoje brojni tkivni rezervoari neutrofilnih granulocita i osim koštane srži oni se nalaze u plućima, jetri i slezini (Peters, 1998; Summers i sar., 2010). Kako je mehanizam njihovog nakupljanja u ovim organima nedovoljno proučen, smatra se da rezervoari služe za brzu popunu pula granulocita u tkivima u uslovima zapaljenja.

Neutrofilni granulociti eliminišu patogene mikroorganizme različitim mehanizmima. Najbolje je proučen proces fagocitoze kada ingestirani mikroorganizmi bivaju ubijeni u fagolizozomima putem brojnih antibakterijskih proteina (katepsini, defensini, laktoferin, lizozim) koji se oslobađaju iz granula i putem reaktivnih kiseoničkih vrsta (ROS) koje se stvaraju pod uticajem oksigenaza. Drugi mehanizam, koji je skoro opisan je mehanizam ekstracelularnog ubijanja mikroorganizama putem oslobađanja takozvanih neutrofilnih ekstracelularnih zamki (engl. neutrophil extracellular traps-NETs). Ove zamke sadrže delove DNK za koje

su zakačeni histoni, MPO, neutrofilne elastaze, laktoferin i katepsini). NET-ovi imobilizuju patogene što favorizuje procese fagocitoze ali i omogućuju direktno ubijanje pod uticajem antimikrobnih histona i proteaza (Brinkmann i sar., 2004; Kolaczkowska i sar., 2013).

Prelazak neutrofila iz cirkulacije u tkivo se odvija kroz 4 faze (incijalno hvatanje za endotel krvnog suda, kotrljanje, adhezija i transmigracija koja obuhvata prolaz između endotelnih ćelija, prolaz transcelularnim mehanizmom i ekstravazaciju). Proces započinje aktivacijom endotela putem različitih stimulusa iz oštećenog tkiva, produkata rezidentnih tkivnih makrofaga i drugih stromalnih ćelija koje se oslobađaju pod uticajem patogena. I sami patogeni mogu aktivirati endotelne ćelije. Za samo nekoliko minuta endotelne ćelije oslobađaju P-selektin iz preformiranih granula a nakon toga započinje i *de novo* sinteza i membranska ekspresija E-selektina. Funkcije ovih selektina se delimično preklapaju a odnose se na vezivanje glikolizovanih liganada, kao što je P-selektinski glikoproteinski ligand 1 (PSGL1) koji je ispoljen na granulocitima i koji je odgovoran za primarno hvatanje granulocita za endotel krvnog suda (Ley i sar., 2007). Nakon toga započinje proces kotrljanja neutrofila po površini endotela u kome se smenjuju mehanizmi adhezije i deadhezije neutrofila (Sundd i sar., 2011). U ovim procesima osim P-selektin / PSGL1 adhezionih molekula, značajnu ulogu ima i leukocitni funkcionalni antigen 1 (LFA-1) i njegovi ligandi (intercelularni adhezioni molekuli 1 i 2, ICAM-1 i ICAM-2) koji su ispoljeni na aktivisanim endotelnim ćelijama.

Procesi adhezije (najpre praćeni prekidom procesa kotrljanja a zatim uspostavljanja čvrste adhezije) su praćeni aktivacijom neutrofilnih granulocita. Proces aktivacije granulocita započinje delovanjem faktora nekroze tumora α (TNF- α) i interleukina-1 β (IL-1 β) (koji se oslobađaju iz aktivisanih tkivnih makrofaga) ili u direktnom kontaktu sa aktivisanim endotelom u kome značajnu ulogu imaju hemokini koji su imobilisani na endotelu posredstvom heparansulfata kao što su CXCL8 (IL-8) i njegov analog u miša CXCL1 (KC), CXCL2 i CXCL5. Oni se vezuju za CXCR2 na neutrofilima preko koga se prenosi aktivacioni signal neophodan za čvrstu adheziju, a u kojoj učestvuje CD11b/CD18 molekul (MAC1) na neutrofilima i ICAM1/ICAM2 na aktivisanom endotelu. Da bi se ovaj adhezivni proces odigrao neophodna je ekspresija CD11b/CD18 molekula na membrani iz preformiranih granula u citoplazmi i njeno konformaciona promena iz neaktivne

u aktivnu formu koja se dešava u toku prethodno opisanog procesa aktivacije neutrofila hemokinima (Cicchetti i sar., 2002).

Osim opisanog tipičnog obrasca adhezije neutrofila za aktivirane endotelne ćelije postkapilarnih venula u koži, postoje i specifičnosti adhezije i transmigracije neutrofila u druge organe (mozak, pluća, jetra, slezina) (Kolaczkowska i sar., 2013). U toku procesa transmigracije neutrofilni granulociti reorganiziraju citoskeletnu arhitekturu koja im olakšava prolaz između endotelnih ćelija. U ovim mehanizmima ključnu ulogu imaju fokalne adhezione kinaze (FAK), MMP9 koja vrši proteolitičku razgradnju ekstracelularnih matriksnih molekula, proteinaza 3 porekla neutrofila, CD31 molekul na endotelnim ćelijama i brojni drugi molekuli (Kolaczkowska i sar., 2013).

Prelaskom u tkivo neutrofilni nastavljaju migraciju pod uticajem novih hemotaktičnih medijatora kao što su C5a komponenta komplekta, bakterijski N-formyl-metionil-leucil-fenilalanin (fMLP), CXCL8 i leukotrijeni (LTB₄). Aktivacija fosfatidilinozitol 3- kinaznog puta i p38 mitogenom-aktivirane protein kinaze (p38 MAPK) imaju ključnu ulogu u kretanju granulocita kroz tkivo (Heit i sar., 2008).

Iako se ranije smatralo da u toku inflamacije većina granulocita umire procesom apoptoze u tkivu, opisani su i procesi tzv. reverzne migracije neutrofila, posebno u uslovima sterilne inflamacije (Mathias i sar., 2006).

Funkcija granulocita u toku inflamacije je višestruka. Osim fagocitoze i ubijanja mikroorganizama intra- i ekstracelularnim mehanizmima, neutrofilni granulociti proizvode brojne citokine i hemokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17A), zatim granulocitno-makrofagni faktor stimulacije kolonija (GM-CSF), M-CSF i interferon- γ (IFN- γ) sa proinflamacijskim svojstvima koji podstiču migraciju novih inflamacijskih ćelija i pospešuju proces zapaljenja. Produkcijom brojnih enzima, neutrofilni čiste tkivni debrisi. Međutim, kada je proces inflamacije produžen, produkti granulocita oštećuju tkivo što je osnovna patogenetska karakteristika mnogih hroničnih zapaljenskih bolesti.

Neutrofilni proizvode i citokine sa anti-inflamacijskim svojstvima kao što su TGF- β , IL10 i IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) koji pomažu, zajedno sa infiltrirajućim makrofagima, da se oštećeno tkivo popravi ili da se pospeši proces zarastanja rane (Kolaczkowska i sar., 2013; Serhan, 2010).

Neutrofilni granulociti pospešuju migraciju monocita iz krvi u tkivo na mesto zapaljenja. U tome učestvuje azurocidin (heparin- vezujući protein) LL37 i katepsin G koji se oslobađaju iz neutrofilnih granula, zatim kompleks IL-6 i njegovog solubilnog receptora koji se oslobađaju sa membrane granulocita proteolitičkom razgradnjom kao i brojni molekuli iz apoptotskih granulocita (Soehnlein i sar., 2010). U ovim složenim mehanizmima dolazi do ekspresije novih adhezivnih molekula na endotelu, kao što je vaskularni endotelni molekul 1 (VCAM-1) ili do sinteze novih hemokina (CCL2) koji su bitni za migraciju monocita.

Neutrofilni granulociti igraju značajnu ulogu i u stečenom imunitetu koja ranije nije bila dovoljno prepoznata. Ove ćelije stimulišu humoralni imunski odgovor, koji je najbolje opisan kod aktivacije B limfocita u slezini. Takođe mogu biti i antigen-prezentujuće ćelije koje stimulišu pojedine komponente ćelijske imunosti. Međutim, bitna je i uloga neutrofilnih granulocita u regulaciji stečene imunosti posredstvom supresije imunskog odgovora u kome učestvuju citokini (IL-10, TFG- β) ili arginaza 1 iz azurofilnih granula (Kolaczkowska i sar., 2013).

1.5.2 Uloga makrofaga u procesima inflamacije

Makrofagi nastaju od monocita periferne krvi. Monociti se stvaraju u koštanoj srži iz opredeljene progenitorske ćelije, monoblasta. Diferencijacijom monoblasta nastaje promonocit, velika ćelija, dijametra oko 18 μm sa bazofilnom citoplazmom i velikim, blago ugnutim jedrom. Hromatin je rastresit, a jedarca vidljiva. Promonocit prolazi dve ćelijske deobe tokom svog razvoja u monocite. Monociti u cirkulaciji imaju dijametar od 12 μm -20 μm . Citoplazma im je bazofilna i sadrži sitne azurofilne granule (lizosome), od kojih su neke jedva vidljive svetlosnim mikroskopom. Nukleusi su im ovalni, u obliku potkovice ili bubrežasti, i obično su lokalizovani ekscentrično. Hromatin je svetliji od hromatina limfocita.

Od svih uobičenih elemenata krvi, monociti prvi ulaze u cirkulaciju i tu se zadržavaju oko 72 sata. Nakon toga oni migriraju u veliki broj tkiva u organizmu, gde postaju tkivni makrofagi i zajedno sa monocitima čine monocitno-makrofagni fagocitni sistem (Kostic i sar., 2007).

Makrofagi se pojavljuju i predominiraju u tkivu rane 48-96 sati nakon povrede tkiva, odnosno inflamacije, a porekla su kako monocita periferne krvi tako i makrofaga okolnog tkiva. Glavni mehanizam prelaska monocita u tkivo i njihova

transformacija u makrofage se zasniva na interakciji receptora iskazanih na njihovoj površini i koncentracije MCP-1 (CCL2) hemokina (Muller i sar., 2001). Pretpostavlja se da monociti koji na svojoj membrani ispoljavaju CD14 ali ne i CD16 molekul (CD14⁺⁺/CD16⁻ ćelije), koji čine dominantnu populaciju monocita, predstavljaju prekursore tkivnih makrofaga. Sa druge strane, monociti CD14⁺/CD16⁺⁺ fenotipa su najverovatnije prekursori tkivnih dendritskih ćelija (Gordon i sar., 2005).

Opisan je tzv.intermedijerni tip monocita koji slično klasičnim monocitima ima visoku ekspresiju CD14 molekula a nisku ekspresiju CD16 (CD14⁺⁺CD16⁺ ćelije). Intermedijarni monociti, nakon stimulacije sa LPS-om proizvode visoke nivoe IL-1 β i TNF- α (Cros i sar., 2010).

Klasični monociti imaju visok nivo ekspresije CCR2 i L-selektina (CD62L) ali nizak nivo CX3CR1. Njihova osnovna uloga, nakon diferencijacije u makrofage, je fagocitoza, pri čemu ispoljavaju visoku peroksidaznu aktivnost a nakon stimulacije sa LPS-om proizvode IL-10 i male količine TNF- α .

Tokom inflamacije klasični i intermedijarni tip monocita prelazi u tkivo posredstvom interakcije CCR2/CCL2. Incijalno kotrljanje je slično kotrljanju neutrofila duž aktiviranih endotelnih ćelija.

Faza stabilne adhezije je takođe posredovana adhezivnim molekulima iz grupe integrina (Cai i sar., 1990). Monociti na svojim membranama imaju adhezivne molekule iz grupe β -2 integrina (CD11a i CD11b) i β -1 integrina (VLA-4). Veza između monocita i endotela se obezbeđuje interakcijama CD11/CD18-ICAM-1 ICAM-2 molekula i VLA-4-VCAM-1 (Barbul, 1990).

Vezivanje ćelija periferne krvi za endotel u procesu zarastanja rane je selektivno i zavisi od vremena nakon povrede (inflamacije). Naime, eksperimentalno je pokazano da adhezivni molekuli endotela ekspimirani u određenom vremenskom periodu nakon povređivanja aktivno određuju koji će tip ćelija iz periferne krvi migrirati na mesto tkivnog oštećenja. Pokazano je da sedmog dana postoji maksimalno vezivanje monocita, a dvanaestog dana limfocita za endotel krvnih sudova koji se nalaze uz okolinu incizije rane (Carlos i sar., 1990).

Ranije je istaknuto kakav je značaj neutrofilnih granulocita i njihovih produkata u migraciji monocita na mesto zapaljenja, odnosno tkivnog oštećenja.

Za makrofage se smatra da predstavljaju ključne ćelije u procesima akutnog i hroničnog zapaljenja i zarastanju rane. Međutim, makrofagi imaju brojne homeostatske funkcije koje su nezavisne od odbrane organizma, kao što su tkivno remodelovanje tokom ontogeneze ili regulacija metabolizma (Mantovani i sar., 2013). Slično neutrofilima, makrofagi svojom enzimskom aktivnošću, učestvuju u procesima fagocitoze mikroorganizama, a osim toga fagocituju apoptotske ćelije, uklanjaju tkivni debris, a svojim solubilnim produktima utiču na formiranje granulacionog tkiva i reepitelizaciju (Leibovich i sar., 1975).

Fagocitozi mikroorganizama prethodi prepoznavanje od strane različitih površinskih receptora na makrofagima, kao što su manozni receptor, receptori čistači, receptori za opsonine, Tol-u slični receptori (TLR) i drugi koji vezuju tzv. molekulske obrasce mikroorganizama. Mehanizmi za uništavanje mikroorganizama (mikrobicidni mehanizmi) su uglavnom odvijaju kompartmentski odvojeni u intraćelijske formacije, lizosome i fagolizosome, kako bi ćelija zaštitila sebe od oštećenja. »Uvlačenje« ili ingestija mikroba u ove strukture je neophodno da bi se mikrobi uništili. Ključni medijatori ubijanja mikroorganizama u fagolizozomima su slobodni kiseonički radikali, NO i brojne proteaze (Kostic i sar., 2007).

Ključna uloga makrofaga u procesima inflamacije i zarastanju rane je pokazana *in vivo* u eksperimentima Leibovich-a i Ross-a (1975). Oni su pokazali da zamorci tretirani anti-makrofagnim anti-serumom i steroidima imaju poremećeno zarastanje rane. Kasnija istraživanja su pokazala da peritonealni makrofagi ubrizgani intradermalno u okoline kružnih rana u miševa dovode do njihovog bržeg zarastanja (Danon i sar., 1989). Makrofagi utiču na proces zarastanja svojim solubilnim faktorima-citokinima koji dovode do proliferacije keratinocita, fibroblasta, sinteze kolagena i drugih proteina ekstracelularnog matriksa. Produkti makrofaga, kao što su faktor rasta porekla trombocita (PDGF), faktori aktivacije fibroblasta (FAF), TGF-beta, IL-1, TNF-a i drugi utiču *in vitro* na hemotaksu fibroblasta, proliferaciju i sintezu kolagena (Barbul, 1990). Malo je podataka o tome koji se od mnoštva citokina koje makrofagi proizvode stvarno nalazi u rani i u kojoj su fazi procesa zarastanja oni značajni. Do sada je metodama rekombinantne DNK pokazano

prisustvo transkripata i informacione RNK za TGF- α , TGF- β , PDGF-A lanac i insulinu sličan faktor rasta-1 na eksperimentalnom modelu u rane šestog dana od povređivanja (Rappolee i sar., 1988), kao i prisustvo IL-1, IL-6 i TNF- α u tkivnoj tečnosti eksperimentalne rane u prvim danima nakon povrede (Ford i sar., 1989).

Monociti, kao i granulociti napuštaju perifernu krv i naseljavaju mesto povrede aktivnim adhezivnim procesima.

Raznolikost i plastičnost su bitne karakteristike makrofaga i ovo svojstvo se jasno može analizirati i shvatiti na primeru zapaljenske reakcije. U tkivu makrofagi, slično neutrofilnim granulocitima, odgovaraju na faktore mikrookoline kao što su produkti mikroorganizama, produkti oštećenih ćelija ili signala koji potiču od neutrofila i aktiviranih limfocita. U zavisnosti od vrste signala makrofagi menjaju svoje fenotipske i funkcionalne karakteristike. Pod uticajem bakterijskih produkata koji se vežu za Tol-slične receptore (TLR) ili delovanjem IFN- γ , odnosno TNF- α i GM CSF-a, makrofagi se transformišu u tzv. M1 ili inflamacijski fenotip koga karakteriše visoka produkcija IL-12 i IL-23 a niska produkcija IL-10. Osim IL-12, koji je bitan za polarizaciju Th1 imunskog odgovora, ove ćelije proizvode i hemokine (CXCL9 i CXCL10) koji doprinose imunosti posredovanoj Th1 citokinima. Sa druge strane IL-23 je jedan od ključnih citokina za ekspanziju Th17 subpopulacije T limfocita. M1 makrofagi produkcijom reaktivnih kiseoničkih radikala u NO i inflamacijskih citokina (IL-1 β , TNF- α , IL-6) stimulišu zapaljenske procese, učestvuju u odbrani intracelularnih infekcija i kontrolišu razvoj tumora (Mantovani i sar., 2013).

Pod uticajem IL-14, IL-13, IL-21 ili IL-33 makrofagi se transformišu u M2 fenotip koga karakteriše visoka produkcija IL-10 i IL-1R α a niska produkcija IL-1 β , IL-12 i IL-23, visoka ekspresija manoznog receptora, produkcija angiogenih faktora arginoze 1 i hemokina (CCL24 i CCL17). Ovakve ćelije se nazivaju i alternativno aktivisani makrofagi (Gordon, 2003).

M2 makrofage učestvuju u polarizaciji Th2 imunskog odgovora koji je značajan za odbranu od parazatskih infekcija i razvoj alergijskih reakcija. One smanjuju zapaljenske i imunske reakcije, stimulišu remodelovanje tkiva i angiogenezu a takođe promovišu rast tumora (Wynn, 2004).

Makrofagi mogu biti polarizovani i u tzv. „M2-sličan fenotip“ koji je od značaja i za proces inflamacije. Ovakve ćelije, koje nemaju sve karakteristike M2 ćelija, se mogu obrazovati pod uticajem imunskih kompleksa u sadejstvu sa LPS-om ili IL-1, glukokortikoida, TGF- β , Wnt5a ili IL-10 (Bergenfelz i sar., 2012; Mantovani i sar., 2013).

M1 i M2 makrofage se razlikuju i u metabolizmu gvožđa. M1 makrofage imaju mnogo više feritina koji služi kao rezorvar gvožđa a malo feropetina koji je zadužen za izlučivanje gvožđa iz makrofaga. Obrnut je nalaz kod M2 makrofaga. Sekvestracija gvožđa u M1 makrofagama ima bakteriostatski efekat dok izlučeno gvožđe iz M2 makrofaga stimuliše popravku tkiva a u tumoru favorizuje proliferaciju ćelija (Mantovani i sar., 2013).

Makrofagi imaju ključnu ulogu i u ograničenju (rezoluciji) inflamacije. Ovi procesi započinju apoptozom neutrofila. Apoptotski neutrofilni sekretuju medijatore koji inhibiraju dalji priliv neutrofila na mesto zapaljenja kao što su aneksin 1 ili laktoferin (Ortega-Gomez i sar., 2013). Takođe sekretuju faktore koji prilače makrofage (engl. find me signals) od kojih su najznačajniji lipofosfatidil-holin, sfingozin 1-fosfat, fraktalkin i nukleotidi (ATP i UTP) (Truman i sar., 2008). Na makrofagima su ispoljeni odgovarajući receptori za ove hemotaktičke molekule. Druga grupa molekula (engl. eat me signals) su površinski molekuli koji omogućavaju prepoznavanje apoptotskih neutrofila i njihovu sledstvenu fagocitozu (eferocitozu) od strane makrofaga. „Eat me signals“ su fosfatidilserinski peptidi koji potiču od aneksina 1 (produkti apoptotskih neutrofila) koji se vežu za različite receptore na makrofagima kao što su TIM4, stabilin-2, BA/1 ili RAGE (Ortega-Gomez i sar., 2013).

Eferocitoza (uklanjanje apoptotskih neutrofila od strane makrofaga) je od ključnog značaja u transformaciji M1 u M2 makrofage, koje su zadužene za restauraciju tkiva i uspostavljanje homeostaze. Osim citokina koji su ranije spomenuti, u ovim procesima značaj imaju i pojedini limfni medijatori makrofaga (PGE2 i PGD2), lipoksin A4, rezolvin i drugi membranski i sekretorni molekuli (Arita i sar., 2007; Ortega-Gomez i sar., 2013; Serhan i sar., 2008).

1.6 Specifičnosti reakcije na strano telo

Subkutana implatacija polivinilskih sundera koja je korišćena u našem modelu istraživanja predstavlja tipičnu reakciju na strano telo, odnosno primer tzv. sterilne granulomatozne inflamacije.

Odgovor tkiva na implantirani biomaterijal uključuje povredu tkiva, incijalnu interakciju implantiranog materijala sa krvlju, privremeno formiranje matriksa, akutnu inflamaciju, hroničnu inflamaciju, granulaciju, reakciju na strano telo praćene formiranjem džinovskih makrofaga i formiranje fibrozne kapsule (Anderson, 2001; Anderson i sar., 2008).

Vrlo rani stadijum karakteriše inerakcija materijala sa krvlju i formiranje tromba koji čini privremeni matriks na površini materijala. Ovaj proces se nastavlja aktivacijom spoljašnjeg i unutrašnjeg puta koagulacije, aktivacije sistema komplementa, fibrinolitičnog sistema, kininskog sistema i aktivacije trombocita. Prisustvo mitogena, hemoatraktanata, citokina, faktora rasta i drugih bioloških agenasa u privremenom matriksu predstavlja bogatu mikrosredinu za modulaciju rezidentnih makrofaga i mobilizaciju ćelija iz krvi u tkivo oko implantata (Anderson i sar., 2008).

Na incijalnu fazu se nadovezuje akutna faza koju karakteriše migracija polimorfonuklearnih leukocita ali i degranulacija tkivnih mastocita koji oslobađaju histamin i druge biomolekule (Zdolsek i sar., 2007).

Rano oslobađanje citokina (IL-4 i IL13) od strane mastocita potpomaže postepenom razvoju reakcije na strano telo. Akutna faza inflamacije se po pravilu brzo završava (najčešće manje od 7 dana) i tad se smenjuje hronična faza koju karakteriše nakupljanje mononuklearnih ćelija (monocita/makrofaga i limfocita). Ova faza je manje uniformna u odnosu na akutnu fazu i u njoj imaju ulogu brojne ćelije.

Ova faza se obično završava za dve nedelje i nastavlja se na granulomatoznu fazu, koju karakteriše formiranje džinovskih makrofaga koje su zaštitni znak reakcije na strano telo. Stvaranje džinovskih makrofaga počinje već kada populaciju neutrofila zamenjuje populacija makrofaga a biva najizraženije tokom faze

granulacije. U ovoj fazi, osim džinovskih makrofaga intenziviran je proces proliferacije fibroblasta, neovaskularizacije i na kraju formiranje kapsule.

Funkcije neutrofila i monocita/makrofaga u reakciji na strano telo se razlikuju u odnosu na funkcije ovih ćelija kod inflamacije izazvane mikroorganizmima, počev od incijalnih faktora (produkti oštećenja tkiva u odnosu na bakterijske produkte), rana polarizacija M1 u M2 makrofage, stimulacija procesa fuzije makrofaga i generalno postepeno formiranje anti-inflamatorne sredine u cilju smanjenja neželjenog tkivnog oštećenja (Ward i sar., 2006).

Fenotip džinovskih makrofaga je sličan fenotipu drugih makrofaga a slično osteoklastima ispoljavaju tartrat rezistentnu kiselu fosfatazu (TRAP) (Kadoya i sar., 1994). Ove ćelije produžuju kiseoničke radikale i različite degradacione enzime, smanjući pH u mikrookolinu a takođe imaju smanjenu baktericidnu sposobnost. Često su odgovorne za oštećenje implantata nakon duže perzistencije u organu ili tkivu (Anderson i sar., 2008).

1.7 Faktor inhibicije migracije makrofaga

Faktor inhibicije migracije makrofaga (MIF) je bio među prvim citokinima koji identifikovani kod sisara krajem šezdesetih godina prošlog veka (Bloom i sar., 1966; David, 1966). MIF je inicijalno opisan kao solubilni produkt iz supernatanta aktivisanih T-limfocita uključenih u reakciju kasne preosetljivosti u koži, za koji je *in vitro* pokazano da inhibira mnoge funkcije makrofaga, ali najizrazitije sposobnost migracije (Nathan i sar., 1971).

Specifična biološka aktivnost MIF je ostala nedovoljno proučena narednih dvadesetak godina, sve dok nije klonirana komplementarna DNK (cDNK) *Mif* gena. Kod sisara je pokazano postojanje jednog, evolutivno očuvanog *Mif* gena koji je u humanom genomu lociran na hromozomu 22 (22q11.2) a kod miševa na hromozomu 10 (Weiser i sar., 1989). Pomenuti gen kodira neglikozilirani peptid od 114 aminokiselinskih ostataka (12,5 kDa) koji nakon homotrimerizacije postaje biološki aktivni MIF (Calandra i sar., 2003; Ishizaka i sar., 2000). Naknadne studije su isključile mogućnost da MIF pripada nekoj od citokinskih superfamilija iako je pokazano da ga pored limfocita produkuju još i monociti, makrofagi, dendritske ćelije, neutrofilni, eozinofili, mast ćelije i bazofili, ali je istovremeno dokazana

njegova strukturalna i funkcionalna sličnost sa tautomerizujućim i tiolnim-oksido-reduktivnim enzimima (Baugh i sar., 2002; Kleemann i sar., 1998; Lue i sar., 2002; Rosengren i sar., 1996).

MIF se konstitutivno eksplicira od strane ćelija koje su poput makrofaga u bliskom kontaktu sa spoljašnjom sredinom i koje kao deo urođene antimikrobne imunosti najbrže reaguju na prisustvo invazivnih mikroorganizama. Osim spomenutih ćelija imunskog sistema, MIF se naročito snažno produkuje u jetri, bubrezima i CNS, organima koji su u direktnom kontaktu sa spoljašnjom sredinom (pluća, GIT i koža), ali i u endokrinim žlezdama čiji su produkti uključeni u regulaciju stresa (hipotalamus, hipofiza i nadbubrežne žlezde) (Lue i sar., 2002). Za razliku od klasičnih citokina, MIF je već sintetisan i deponovan u unutarćelijskim vezikulama. Nakon adekvatne signalizacije on se iz njih oslobađa nekonvencionalnim procesom sekrecije, budući da nema odgovarajuću N-terminalnu sekvencu koja bi ga usmerila prema endoplazmatskom retikulumu (Calandra i sar., 2003). Zbog svega navedenog, MIF se sve češće definiše kao ubikvitarni citokin sa enzimskom aktivnošću, ili „citozim“, odnosno kao enzim koji se sekretuje. Na osnovu anatomske lokalizacije tkiva i organa u kojima se produkuje pretpostavlja se da bi MIF mogao imati ulogu medijatora između imunskog i endokrinog sistema (Kleemann i sar., 1998; Lue i sar., 2002).

Mif-deficijentni miševi (*Mif*^{-/-}) su dobijeni genskom manipulacijom 1999. god, čime je i praktično otvoreno novo poglavlje u ispitivanju funkcionalnih karakteristika ovog molekula (Bozza i sar., 1999). MIF ispoljava svoju funkciju putem receptorski-zavisnih i receptorski-nezavisnih mehanizama. Receptorski-zavisni mehanizmi delovanja MIF odvijaju se preko invarijantnog lanca glavnog histokompatibilnog kompleksa II klase (CD74), kao i CXC hemokinskih receptora tipa 2 i 4 (CXCR2 i CXCR4) (Schwartz i sar., 2009; Shi i sar., 2006a). Signalizacija preko CD74/CD44 receptorskog kompleksa povezana je sa fosforilacijom Src receptora i ekstraćelijskim signalima-regulisanih kinaza (ERK1/2), a što na kraju dovodi do aktivacije mitogenom-aktiviranih proteinskih (MAP) kinaza i protein kinaze B (Akt) koje regulišu ćelijsku vijabilnost i rast (Kleemann i sar., 2000; Leng i sar., 2003). MIF u visokoj koncentraciji ispoljava efekte receptorski nezavisnim mehanizmima. Nakon endocitoze MIF obrazuje kompleks sa JAB1 citoplazmatskim proteinom koji reguliše ćelijski rast i inflamaciju tako što prolazno aktivira

ERK/MAPK (Kleemann i sar., 2000). MIF indukuje brzu (unutar 30 minuta) i prolongiranu (do 24h) aktivaciju ERK/MAPK signalnog puta posredovanu protein kinazom A. Ova aktivacija praćena je snažnom enzimskom aktivnošću fosfolipaze A₂ (PLA₂), za koju se pretpostavlja da može biti u osnovi pokretanja proinflamacijske kaskade od strane MIF, ali i inhibicije imunosupresivnih efekata steroida (Calandra i sar., 2003; Mitchell i sar., 1999).

Prvobitno opisan kao T-ćelijski citokin, MIF ima važnu ulogu ne samo u adaptivnoj, već i urođenoj imunosti, a pripisuje mu se i potencijalni terapijski značaj.

Povećanje TLR-4 na makrofagima i smanjenje njihove apoptoze su dva osnovna načina kojima MIF indukuje proinflamacijski urođeni imunski odgovor (Calandra i sar., 2003; Lue i sar., 2002). Makrofagi *Mif*-deficijentnih miševa slabije proizvode proinflamacijske medijatore (TNF- α , IL-1 β i PGE₂) nakon stimulacije LPS-om ili infekcije Gram-negativnim bakterijama (*S.Typhimurium*). Razlog ove hiporesponsivnosti jeste posledica slabije ekspresije TLR4 koji se nalazi u sklopu LPS-receptorskog kompleksa, budući da MIF podstiče transkripciju *Tlr4* gena aktivacijom PU.1 transkripcionog faktora (Koebernick i sar., 2002). Povećana sklonost *Mif*-deficijentnih miševa ka infekcijama Gram-negativnim bakterijama u poređenju sa miševima divljeg soja objašnjava se sniženim serumskim vrednostima IL-12, TNF- α i IFN- γ , s obzirom da je pokazano da MIF indukuje Th1 imunski odgovor. Pored napred navedenih citokina, poznato je da MIF direktno ili indirektno stimuliše produkciju IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, NO, produkata arahidonske kiseline i nekih matriksnih metaloproteinaza (Lue i sar., 2002; Roger i sar., 2003).

Smatra se da bi nedostatak MIF-a mogao biti jedan od ključnih faktora povećane apoptoze monocita/makrofaga kod *Mif*-deficijentnih miševa nakon stimulacije LPS-om, u poređenju sa divljim sojem miševa. Pretpostavlja se da bi glavni medijator apoptoze u ovom slučaju mogao da bude NO, budući da je ranije pokazano da MIF inhibira NO-indukovanu apoptozu makrofaga posredstvom p53-zavisnog mehanizma (Mitchell i sar., 2002). Inhibicija tumor supresorskog onkogenog p53 od strane MIF-a smatra se jednim od ključnih procesa u regulaciji normalnog ćelijskog rasta i uključuje kaskadnu aktivaciju ERK1/ERK2, PLA₂, ciklooksigenaze 2 (COX2) i prostaglandina E₂ (PGE₂) (Salminen i sar., 2011).

U odvojenim *in vitro* eksperimentima na miševima divljeg soja dobijeni su kontradiktorni rezultati u vezi sa uticajem MIF na ćelijsku proliferaciju. Dodavanje rekombinantnog MIF-a je stimulisalo proliferaciju fibroblasta aktivacijom ERK 1/2 MAPK puta (Mitchell i sar., 1999), dok je u metodološki sličnom eksperimentu sa neutrališućim anti-MIF antitelima nađena dozno-zavisna inhibicija njihove proliferacije mehanizmom povezanim sa JAB1 proteinom (Kleemann i sar., 2000). Studije izvedene na preparatima humanog adenokarcinoma prostate pokazale su da je ekspresija MIF-a, iako generalno visoka, u obrnutom odnosu sa stepenom diferencijacije tumora i da bi MIF mogao da ima ključnu ulogu u inicijalnim fazama tumorigeneze (del Vecchio i sar., 2000). Efekti MIF-a na neovaskularizaciju dobijeni su na *in vivo* tumorskom modelu mišjeg B-ćelijskog limfoma. Izvor MIF-a u ovom modelu su bile isključivo vaskularne endotelne ćelije, a dodavanjem anti-MIF antitela značajno je redukovana neovaskularizacija (Chesney i sar., 1999). Skorašnji eksperimenti su potvrdili da postoji direktna korelacija između koncentracije MIF-a i gustine mikrovaskularne tumorske mreže kod nekih humanih epitelnih karcinoma (Mitchell, 2004).

Uloga MIF-a u akutnoj inflamaciji je prvi put ispitivana na mišjem modelu endotoksemije. Nakon intraperitonealne aplikacije endotoksina (LPS) ili egzotoksina, poput toksičnog šok sindrom toksina 1 (TSST-1) i streptokoknog toksina A, mišji makrofagi su snažno produkovali MIF. Ubrizgavanje rekombinantnog MIF-a zajedno sa LPS pogoršalo je simptome septičkog šoka kod eksperimentalnih životinja, dok su *Mif*-deficijentni miševi bili rezistentni (Lue i sar., 2002).

Slični rezultati su dobijeni i na modelu mišjeg bakterijskog peritonitisa izazvanog bilo ubrizgavanjem živih Gram-negativnih bakterija ili nakon ligacije i punkture cekuma, a koji su pokazali dobru korelaciju sa septičkim šokom kod ljudi (Calandra i sar., 2000). Na ovom modelu je pokazana i potencijalna upotreba kako poliklonskih, tako i monoklonskih anti-MIF antitela koja bi mogla naći potencijalnu terapijsku primenu kod ljudi. Miševi kojima su ova antitela bila ubrizgana i do osam časova nakon pojave simptoma sistemske infekcije nisu uginuli od posledica letalnog bakterijskog peritonitisa. Ovakav ishod je bio u suprotnosti sa rezultatima dobijenim na mišjim eksperimentalnim modelima u kojima je praćen ishod infekcije *E. Coli* nakon prethodnog tretmana anti-MIF antitelima ili anti-TNF α antitelima (Lue

i sar., 2002). Mortalitet miševa kojima su aplikovana anti-MIF antitela nije bio statistički značajno promenjen, za razliku od eksperimentalne grupe koja je primala anti-TNF α antitela gde je došlo do povećanja smrtnosti. Opisani rezultati bi mogli da ukažu na važnu ulogu MIF-a, pre svega u započinjanju inflamacije, dok u poređenju sa TNF- α manje utiče na razvoj septičkog šoka (Calandra i sar., 2000).

MIF ima ulogu u patogenezi brojnih autoimunskih bolesti koje se karakterišu hroničnim inflamacijskim substratom. Uticaj MIF-a je najbolje proučen na mišjem modelu kolagenom-indukovanog reumatoidnog artritisa tipa II (Lue i sar., 2002). Ovde je pokazano da su izvor MIF-a pre svega infiltrišući T-limfociti, makrofagi i sinoviociti, kao i da MIF utiče na porast sekrecije matriksnih metaloproteinaza (MMP)-1 i MMP-3 koje su u najvećoj meri odgovorne za degradaciju tkiva i razvoj posledičnih simptoma bolesti, kao i da izaziva snažniju proliferaciju sinoviocita p53-zavisnim mehanizmom (Leech i sar., 1998; Lue i sar., 2002; Xu i sar., 2013). Ublažavanje sinovijalne imflamacije kod eksperimentalnih miševa divljeg soja nakon ubrizgavanja anti-MIF antitela, kao i spontano zaustavljanje bolesti kod kolagenom-indukovanog artritisa u *Mif*-deficijentnih miševa, ukazuju na mogući značaj MIF kao terapijske mete u reumatoidnom artritisu (RA) (Stosic-Grujicic i sar., 2009).

Neuspeh glikokortikoidne (GK) terapije kod nekih pacijenata od RA doveden je u vezu sa MIF. Za razliku od drugih proinflamacijskih medijatora, fiziološke koncentracije GK povećavaju ekspresiju i sekreciju MIF-a (Stosic-Grujicic i sar., 2009). Na modelu antigenom-indukovanog RA kod glodara je pokazano da MIF inhibira imunosupresivne efekte GK tako što obnavlja produkciju proinflamacijskih citokina od strane makrofaga i stimuliše aktivaciju T-limfocita. MIF je *in vitro* u prisustvu GK indukovao produkciju TNF- α , IL-1 β , IL-6 i IL-8 od strane mononukleara periferne krvi, PGE₂ u fibroblastima i proliferaciju T-limfocita (Santos i sar., 2001). Opisani efekti su posledica interakcije MIF i GK na nivou NF- κ B signalnog puta, gde je MIF inhibirao GK-podstaknutu sintezu I κ B α transkripcionog faktora (Daun i sar., 2000). Iz svega navedenog proističe da bi blokada MIF-a mogla da postane alternativni način lečenja kod pacijenata sa RA koji su razvili rezistenciju na steroidnu terapiju (Stosic-Grujicic i sar., 2009).

MIF je važan medijator i potencijalna terapijska meta i kod ateroskleroze. Poznato je da aktivisani CD68⁺ makrofagi, vaskularni endotel i glatke mišićne ćelije u krvnim sudovima hiperlipemičnih kunića povećavaju produkciju MIF u toku razvoja ateroskleroze (Lin i sar., 2000). Prisustvo neutrališućih anti-MIF antitela kod hiperlipemičnih ApoE^{-/-} i LDLR^{-/-} miševa dovodi do značajnog smanjenja produkcije proinflamacijskih medijatora poput IL-6 i fibrinogena. Ekspresija MIF u ovom eksperimentu je pokazala blisku korelaciju sa debljinom arterijske tunike medije i prisustvom lipidnih depozita (Burger-Kentischer i sar., 2006; Javeed i sar., 2008). Kod ApoE-deficijentnih miševa uočeno je smanjenje ekspresije p53 gena koje se dovodi u vezu sa potencijalnim mehanizmom aterogenog delovanja MIF-a (Roovers i sar., 1999; Sherr i sar., 1999). Na preparatima humanih krvnih sudova je pokazana povećana ekspresija MIF-a i njegova funkcionalna ko-lokalizacija sa JAB1 proteinom u sklopu MAPK signalnog puta (Javeed i sar., 2008).

Postoje brojni, ali manje jasni eksperimentalni dokazi da MIF učestvuje u patogenezi i mnogih drugih imunskih i zapaljenskih oboljenja kao što su: sistemski lupus eritematodes (SLE) (Xu i sar., 2013), akutni respiratorni distress sindrom (ARDS) (Donnelly i sar., 1997), bolest kalema protiv domaćina (GVHD) (Javeed i sar., 2008), glomerulonephritis (Lan i sar., 1997), dijabetes tip I (Bojunga i sar., 2003), atopijski dermatitis i psorijazis vulgaris (Ogata i sar., 2004; Shimizu, 2005).

Iako se odavno zna da je MIF produkt sekrecije aktivisanih T-limfocita, njegov uticaj na modulaciju adaptivnog imunskog odgovora nije dovoljno proučen.

Od ranije je poznato da mitogeni, tetanusni toksin, anti-CD3 antitela, neki egzotoksini Gram-pozitivnih bakterija i GK indukuju produkciju MIF od strane mišjih T-limfocita i splenocita (Calandra i sar., 2003). Eksperimenti sa mišjim neutrališućim anti-MIF antitelima pokazali su da MIF autokrinim mehanizmom stimuliše proliferaciju T-limfocita i produkciju IL-2 *in vitro*, odnosno podstiče antigenom-zavisnu aktivaciju T-limfocita i produkciju antitela *in vivo*. Iako je poznato da i Th1 i Th2 podtip CD4⁺ T-limfocita produkuju MIF, nakon stimulacije konkavalinom A transkripcija *Mif*-gena i sinteza proteina detektovana je samo u Th2-limfocitima (Bacher i sar., 1996).

MIF ima važnu ulogu i u zarastanju rane. Zarastanje rana na koži prolazi kroz fazu zapaljenja, granulacije i remodelovanja oštećenog tkiva. Ključni događaj u

ovom procesu jeste migracija keratinocita sa ivice rane koji brojnim proinflamacijskim medijatorima indukuju rast, diferencijaciju i metabolizam svih ostalih ćelija prisutnih u zoni lezije (Gilliver i sar., 2011). Nakon formiranja krvnog ugruška u fazi inflamacije, trombin i faktor Xa snažno indukuju sekreciju MIF-a od strane humanih dermalnih mikrovaskularnih endotelnih ćelija *in vitro* (Shimizu i sar., 2004). Kultivisani fibroblasti izolovani iz sterilnih rana glodara u prisustvu LPS-a značajno snažnije sekretuju MIF od fibroblasta dobijenih iz zdrave kože *in vitro*, a pokazano je i da rekombinantni MIF *in vitro* stimuliše migraciju mišjih dermalnih fibroblasta. Fibroblasti *Mif*-deficijentnih miševa su pokazali slabiju sposobnost proliferacije i migracije u prisustvu LPS-a *in vitro* (Abe i sar., 2000). Intraperitonealna aplikacija anti-MIF antitela značajno je usporila zarastanje kožnih rana na C57/BL6 miševima *in vivo* (Ashcroft i sar., 2003a; Gilliver i sar., 2011).

Iako prethodne studije ukazuju na to da MIF podstiče zarastanje rana na koži, postoji nekoliko studija koje pokazuju suprotno. Kod *Mif*-deficijentnih miševa, nezavisno od pola, nije primećena promena u dinamici zarastanja incizione rane na koži u poređenju sa miševima divljeg soja, dok je ubrizgavanje rekombinantnog MIF-a ovim miševima dovelo do usporenog zarastanja rane (Zhao i sar., 2005). Razlog za ovu pojavu mogao bi da bude način aplikacije MIF-a, ali i različita osetljivost *Mif*-deficijentnih ćelija na rekombinantni odnosno endogeni MIF. Dodavanje rekombinantnog MIF-a je ubrzalo reepitelizaciju samo ekscizionih ali ne i incizionih rana na koži *Mif*-deficijentnih miševa nakon nedelju dana (Hardman i sar., 2008; Mitchell i sar., 2002). Prema mišljenju autora, objašnjenje za ovu pojavu moglo bi biti posledica različite kinetike u sanaciji rane između ova dva eksperimentalna modela. Zarastanje rane uslovljeno je i ćelijskim i citokinskim sastavom eksudata, kako je pokazao *in vivo* eksperiment u kome je rana kod *Mif*-deficijentnih miševa najbrže zarastala u odsustvu infiltrišućih neutrofila, makrofaga i TNF- α (Abe i sar., 2000).

Nekoliko studija se bavilo uticajem seksualnih hormona na ekspresiju i funkciju MIF-a. LPS-om aktivisani mišji makrofagi su pod uticajem β -estradiola i inhibitora estrogena snizili ekspresiju i sekreciju MIF-a *in vitro*, dok je testosteron ispoljio suprotan efekat (Gilliver i sar., 2008). Sekrecija MIF od strane makrofaga nakon stimulacije testosteronom je povezana sa Smad3-responsivnim elementom,

dok je njegova inhibicija estradiolom zavisna od estrogenskog receptora i povezana je sa NF- κ B (Ashcroft i sar., 2003a).

Kod miševa divljeg soja, regulacija produkcije MIF u rani pod dejstvom estrogena naročito dolazi do izražaja kod ovariektomisanih jedinki pošto se zarastanje usporava, dok se kod *Mif*-deficijentnih jedinki ne uočava promena. Kod ovariektomisanih miševa divljeg soja u rani se detektuje povišen nivo MIF-a, intraćelijskog MIF-signalnog medijatora CSN5 i MIF receptora CD74 (Hardman i sar., 2008). Glavna uloga estrogena u procesu zarastanja rana je pre svega blokiranje ekspresije MIF-a, kako pokazuju eksperimentalni rezultati dobijeni na sličnom modelu: aplikacija anti-MIF antitela ili estrogena miševima divljeg soja poboljšalo je njihovo ozdravljenje, odnosno davanje rekombinantnog MIF-a ga je usporilo kod *Mif*-deficijentnih jedinki (Ashcroft i sar., 2003b). Dihidroepiandrosteron (DHEA), takođe, inhibira produkciju MIF u ovom modelu, ali nakon prethodne konverzije u estrogen, mehanizmom koji uključuje ERK i PI3K signalne puteve (Mills i sar., 2005).

Kastracija miševa divljeg soja ili tretman supstancama koje inhibiraju prevođenje testosterona u aktivniji metabolit 5 α -dihidrotestosteron ubrzavaju zarastanje rana zbog lokalnog smanjenja sekrecije proinflamacijskih citokina kao što je TNF- α (Ashcroft i sar., 2002). U opisanom eksperimentu nije primećena promena koncentracije MIF u samoj rani, ali je detektovan smanjen nivo CSN5. Prisustvo ili odsustvo MIF nije dodatno moduliralo efekat kastracije na zarastanje rane koja je bila podjednako ubrzana i kod divljeg soja i kod *Mif*-deficijentnih jedinki. Interakcija MIF i steroidnih polnih hormona je pokazana na molekulskom nivou. JAB1/CSN5 proteinski kompleks koji se sekretuje u sklopu MIF-signalnog puta je ko-aktivator androgenog receptora, a ima i ko-enzimsku ulogu u interakciji između progesteronskog receptora i SRC-1 proteina (Berndt i sar., 2008; Chauchereau i sar., 2000).

2 Hipoteze i ciljevi istraživanja

Iz dosadašnjih rezultata, a koji su koncizno sistematizovani u revijskom radu Gilliver-a i sar. 2010., jasno se može zaključiti da MIF ima jednu od ključnih uloga u biološkim funkcijama kože, inflamaciji i zarastanju rana. Međutim, da li ovaj biomolekul podstiče, smanjuje ili bitnije ne utiče na pojedine faze inflamacije i tkivnog remodelovanja tokom procesa zarastanja rane, nije dovoljno rasvetljeno, između ostalog jer su u pristupu izučavanja ovog naučnog problema korišćeni različiti modeli istraživanja (primena rekombinantnog MIF-a, blokiranje funkcije MIF-a specifičnim antitelima ili farmakološkim antagonistima odnosno korišćenje *Mif*-deficijentnih miševa). Zbog toga je koncept naše studije fokusiran na izučavanje pojedinih funkcija inflamacijskih ćelija koje su uključene kako u odbrani organizma od infekcije tako i u popravci tkiva nakon povrede koristeći *Mif*-deficijentne miševе. Za istraživanje je odabrana metoda subkutane implantacije suđera koji predstavlja pogodan model za izučavanje procesa akutne i hronične nesterilne inflamacije kao reakcije na povredu tkiva a istovremeno i model rane faze zarastanja rane. Iz eksudata suđera se mogu analizirati kako ćelijski elementi tako i solubilni produkti (Pejnovic i sar., 1995). Slična istraživanja do sada nisu rađena.

Na osnovu toga postavljene su sledeće

HIPOTEZE

1. Kod C57BL/6 miševa sa uklonjenim genom za faktor inhibicije makrofaga (*Mif*^{-/-} miševa) je smanjena zapaljenska reakcija nakon subkutane implantacije sterilnih polivinilskih suđera u odnosu na divlji soj (*Mif*^{+/+}) miševa.
2. Smanjenje zapaljenja u *Mif*^{-/-} miševa je posledica smanjenja broja inflamacijskih ćelija u eksudatu koje nije povezano sa brojem neutrofilnih granulocita i monocita u krvi, smanjenja koncentracije NO i pro-inflamacijskih citokina (IL-1β, IL-12, IL-17, IFN-γ, TNF-α, CXCL-10, GM-CSF) i C-reaktivnog proteina (CRP), a povećanja koncentracije IL-1Ra i IL-33.
3. Inflamacijske ćelije izolovane iz eksudata imaju smanjenu adhezivnu sposobnost, povećanu apoptozu i različit odgovor na dodatnu stimulaciju u kulturi u odnosu na inflamacijske ćelije divljeg soja miševa.

Za proveru ovih hipoteza postavljeni su sledeći

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Kod *Mif*^{-/-} i kontrolnih *Mif*^{+/+} miševa odrediti i međusobno uporediti:

1. Biološke karakteristike i hematološke parametre u perifernoj krvi.
2. Ukupan broj inflamacijskih ćelija u eksudatu u ranoj (24 časa) i kasnoj fazi (10 dana) inflamacije posle subkutane implantacije polivinilskih sundera.
3. Relativan i ukupan broj pojedinih subpopulacija inflamacijskih ćelija.
4. Stepen spontane apoptoze inflamacijskih ćelija *ex vivo* i u kulturi nakon stimulacije LPS-om.
5. Koncentraciju nitrita u eksudatu i supernatantima kultura inflamacijskih ćelija, kao pokazatelja produkcije NO.
6. Stepen spontane i forbol miristat acetatom (PMA)-indukovane adhezije inflamacijskih ćelija za plastiku.
7. Koncentraciju citokina IL-1 β , IL-1Ra, IL-12, IL-17, IL-33, IFN- γ , TNF- α , CXCL-10, GM-CSF i CRP u eksudatu.

3 Materijal i metode istraživanja

3.1 Medijumi, rastvori i reagensi

3.1.1 Osnovni (kompletni) medijum za kultivaciju ćelija

Osnovni (kompletni) medijum za kultivaciju ćelija je bio RPMI medijum sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (FCS), prethodno inaktivisanog 30 minuta na 56°C. Sto ml ovog medijuma sadrži:

- 70 ml redestilovane vode
- 10 ml RPMI-1640 (Serva, Nemačka)
- 10 ml FCS-a (Flow Laboratories, UK)
- 1 ml L-glutamina 200 mmol/l (ICN-Flow)
- 3.25 ml 7.5% NaHCO₃ (Apoteka VMA)
- garamicin 40 mg/ml (Galenika, Beograd)
- 50 i.j./ml penicilina (Galenika, Beograd)
- 50 mg/ml streptomicina (Galenika, Beograd)

3.1.2 Rastvor Na-EDTA

Rastvor Na-EDTA 0.2 g/l u RPMI medijumu bez seruma korišćen je za izolaciju inflamacijskih ćelija iz suđera

3.1.3 Izotonični rastvor za liziranje eritrocita:

- 160 mM NH₄Cl (Zorka, Šabac);
- 4 mM NaHCO₃ (Zorka, Šabac)

3.1.4 PBS (Phosphat-buffered saline) pH 7.56

je napravljen korišćenjem sledećih supstanci:

- 1,06 mM KH₂PO₄ (Merck)
- 155,17 mM NaCl (Merck)

2,97 mM Na₂HPO₄ (Merck).

3.1.5 PBS1

PBS ca dodatkom 0,01% NaN₃(Sigma)

3.1.6 PBS2

PBS1 ca dodatkom 2% FCS (PAA Laboratories).

3.1.7 Lipopolisaharid

Lipopolisaharid (LPS) (Sigma, SAD) iz *Escherichiae coli* je rastvoren u RPMI 1640 medijumu u koncentraciji od 1 mg/ml, alikvotiran i čuvan na -20°C do upotrebe. U eksperimentima je korišćen u koncentraciji od 250 ng/ml.

3.1.8 Griess-ov reagens

rastvor A

N-(1-naftil) etil- endiamin (Sigma) je rastvoren u destilovanoj vodi u koncentraciji 1mg/ml

rastvor B

p-aminobenzensulfonamid (Sigma) je rastvoren u 5% H₃PO₄

Do upotrebe oba rastvora su čuvani na 4°C, a neposredno pred rad su pomešani u odnosu 1:1.

3.2 Eksperimentalne životinje

U eksperimentima su korišćeni miševi soja C57BL/6 (kontrolna grupa) i C57BL/6 *Mif*^{-/-} (eksperimentalna grupa), oba pola, starosti 8-10 nedelja, težine 22-24 g. Životinje su odgajane i razmnožavane u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja VMA u Beogradu. *Mif* „knockout“ miševi su dobijeni ljubaznošću dr Yousef Al-Abed (The Feinstein Institute for Medical Research, North Shore LIJ Health System, New York, USA). Oba soja miševa su uzgajana u polipropilenskim kavezima u prostorijama sa konstantnom temperaturom (22±1°C) i vlažnošću vazduha od 50%. Životinjama je davana briketna hrana (veterinarski zavod, Subotica) i voda iz plastičnih pojilica, *ad libitum*.

U svim eksperimentima životinje su žrtvovane upotrebom prekomerne doze anestetika Zoletil (Virbac S.A., Francuska).

3.3 Praćenje bioloških i hematoloških parametara kod miševa

Godinu dana pre početka eksperimenta oba soja su praćena u pogledu fertilne sposobnosti, postnatalnog rasta mladunaca, fenotipskih svojstava, ponašanja i drugih parametara, o čemu je vođena detaljna evidencija. Takođe su pojedine grupe odraslih mužjaka i ženki korišćene za uzimanja krvi iz trbušne aorte u cilju određivanja hematoloških parametara na automatskom analizatoru ćelija periferne krvi (ADVIA 120, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Nemačka) u Institutu za biohemiju VMA.

3.4 Eksperimentalni model inflamacije

Eksperimentalni model inflamacije je bio subkutana implantacija polivinilskih sunđera po metodi Middleton i sar., a koji je ranije uspostavljen u Institutu za medicinska istraživanja VMA (Pejnović, 1997). Istraživanja na ovom eksperimentalnom modelu su odobrena od strane Ministarstva poljoprivrede i zaštite životne sredine-uprave za veterinu (br. 323-07-04924/2015-05/1, od 03.07.2015.).

3.4.1 Priprema sunđera

Polivinilski sunđeri, debljine 3 mm su isečeni u kvadratu dimenzija 7.5mm x 7.5mm x 3mm. Nakon dugotrajnog ispiranja u česmenskoj pa destilovanoj vodi, sunđeri su iscedeni i autoklavirani. Neposredno pre implantacije u životinju, u sterilnim uslovima sunđeri su navlašeni fiziološkim rastvorom.

3.4.2 Implantacija sunđera

Subkutana implantacija polivinilskih sunđera je rađena po metodi Middleton i Campbell (Middleton i sar., 1989). Životinjama je dat anestetik Zoletil u koncentraciji 120 mg/kg i.p. Nakon uvođenja u anesteziju, ošišana im je dlaka kože leđa i na koži su napravljene incizije, a zatim je makazama sa tupim vrhom pravljen subkutani „džep“ (na liniji koja prolazi supraskapularno) u koji su postavljeni prethodno pripremljeni sterilni polivinilski sunđeri. Postavljano je ukupno dva sunđera, veličine 7.5mm x 7.5mm x 3mm, po jedan sa svake strane. Incizije su zatvarane malim hirurškim kopčama.

Nakon uvođenja u eksperiment životinjama je mesto povrede prekriveno sterilnom gazom koja je pričvršćena flasterom (Galenika, Beograd) i stavljane su u kaveze (1 životinja/kavezu), uz slobodan pristup vodi i hrani.

3.4.3 Priprema suspenzije inflamacijskih ćelija

Inflamacijska reakcija je procenjivana u ranoj (24 časa) i kasnoj fazi (10 dana) nakon implantacije suđera. Životinje su žrtvovane u etarskoj anesteziji, nakon čega su suđeri pažljivo vađeni i stavljani u plastične špriceve od 2 ml bez igle i iz njih je izdvajan eksudat pritiskom klipa šprica. Eksudat sa inflamacijskim ćelijama je odvojeno sakupljen. Suđeri oslobođeni eksudata su potapani u RPMI medijum sa dodatkom 0.02% EDTA radi dodatnog izdvajanja adherentnih ćelija. Ove ćelije su izdvajane dvostrukim ispiranjem suđera medijumom i spajane sa inflamacijskim ćelijama koje su izdvojene iz eksudata. Centrifugiranjem na 1500 rpm, 10 min na +4°C, izdvojen je eksudat (supernatant) od taloga ćelija. Inflamacijske ćelije su nakon spajanja dva puta isprane u RPMI medijumu bez seruma i finalno resuspendovane u RPMI medijumu sa dodatkom 10% FCS.

Vijabilnost ćelija je određivana pomoću 0.2% rastvora Tripan plavog, pod svetlosnim mikroskopom i iznosila je od 92-95%. U slučajevima kontaminacije uzorka eritrocitima, oni su uklanjani primenom izotoničnog rastvora NH₄Cl (pufera za liziranje).

Ćelije su korišćene za morfološka i funkcionalna ispitivanja *ex vivo* i u kulturi.

3.4.4 Liziranje eritrocita

Na talog ćelija kontaminiran eritrocitima je dodavano 3ml hladnog pufera za lizu eritrocita. Epruveta je ručno okretana gore-dole, bez vorteksovanja, na svakih par minuta. Nakon 10 minuta, delovanje pufera je prekidano dodatkom RPMI medijuma sa 10% FCS. Ćelije su istaložene centrifugiranjem (15 minuta, 800 obrtaja, +4°C), a potom dva puta isprane u RPMI medijumu bez dodatka seruma. Pre finalnog ispiranja dobijena suspenzija ćelija je profiltrirana kroz najlonsku mrežicu. Talog ćelija je resuspendovan u kompletnom RPMI medijumu.

3.4.5 *Priprema citospin preparata*

Predmetno staklo (mikroskopske pločice) su najpre premazane 10% PLL (*poly L-lysine*) u cilju bolje adhezije ćelija. Za pripremu citospin preparata ćelije su nakon vorteksovanja resuspendovane u RPMI medijumu sa dodatkom 2% FCS. Napravljena je suspenzija u kojoj je koncentracija ćelija iznosila $2 \times 10^4 / 100\mu\text{l}$ medijuma. Ovako pripremljena suspenzija je nalivana u modele za citospin preparate (100 μl / kalupu) i centrifugirana na *Cytospin 4* centrifugi (Thermo Scientific) na 500 obrtaja 5 minuta. Citospinovi su potom vadjeni iz modela, osušeni na vazduhu na sobnoj temperaturi minimum 2 časa nakon čega su korišćeni u daljoj analizi.

3.4.6 *May-Grunwald Giemsa bojenje*

Citospin preparati su najpre 5 minuta inkubirani u May-Grunwald rastvoru (Merck KGaA, Nemačka) a zatim ispirani jedan minut destilovanom vodom. Nakon toga su tretirani rastvorom Geimsa (Merck KGaA, Nemačka) koji je napravljen u razblaženju 1:10 u destilovanoj vodi. Nakon 15 minutne inkubacije preparati su ponovo isprani destilovanom vodom i zatim ostavljeni na sobnoj temperaturi da se osuše. Na osušene preparate stavljan je Kanada balsam i pokrovno staklo. Tako pripremljeni preparati su analizirani na svetlosnom mikroskopu (Olympus CX31, Tokio, Japan).

3.5 Testovi za detekciju apoptoze

3.5.1 *Morfološki metod*

Morfološki metod detekcije apoptoze je zasnovan na bojenju ćelija Turk-ovim rastvorom po metodi koju su opisali Čolić i sar. Čolić i sar. (2000)

Turk-ov rastvor fiksira ćelije i boji jedra. Posmatranjem ćelija pomoću svetlosnog mikroskopa, mogu se morfološki razlikovati vijabilne ćelije sa heterohromatinskim i euhromatinskim jedrom i apoptotske ćelije sa piknotičnim jedrima (kondenzovan hromatin), ili se uočavaju apoptotična telašca sa fragmentima zgusnutog hromatina. Na izolovane inflamacijske ćelije suđera je dodavan Turk-ov rastvor u odnosu 1:3 (10 μl suspenzije ćelija + 20 μl Turk-ovog rastvora). Na mikroskopsku pločicu je nanošeno 10 μl ovako spremljene suspenzije i nakon 1 minuta (talo enja) i pokrivanja pokrovnim stakalcetom ćelije su analizirane. Preparati su analizirani na svetlosnom mikroskopu (OLYMPUS CX31) brojanjem najmanje 500 ćelija po

preparatu. Apoptotičnim su smatrane ćelije kod kojih je zapažena kondenzacija hromatina, smanjeno, piknotično jedro, kao i ćelije koje su sadržale apoptotska telašca. Slična morfologija je uočavana i na citospin preparatima bojenim May-Grunwald-Giemsa metodom.

3.5.2 *Merenje apoptoze vezivanjem aneksin-V FITC*

Detekcija apoptoze je takođe vršena pomoću *Dead Cell Apoptosis Kit* (Invitrogen Biosource, Karlsbad, SAD) koji sadrži Annexin V Alexa Fluor 488 i PI. Aneksin V je antikoagulantni protein koji se preferencijalno vezuje za negativno naelektrisane fosfolipide. Aneksin V- FITC konjugat se koristi za detekciju promena na membrani ćelija koje se dešavaju rano tokom apoptoze, kada dolazi do ispoljavanja fosfatidilserina na spoljašnjoj strani membrane ćelije.

Ispitivane ćelije (*ex vivo* izolovane ili nakon *in vitro* kultivacije) su najpre ispirane u hladnom PBS dva puta, a zatim resuspendovane u komercijalnom vezujućem puferu (engl. *Binding buffer*) i tretirane Annexin V Alexa Fluor 488 i PI u skladu sa uputstvom proizvođača. Ćelije su zatim 15 minuta inkubirane u mraku na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije ćelijama je dodavano po 400µl vezujućeg pufera i analizirane su na protočnom citofluorimetru.

3.6 Testovi za procenu funkcionalne aktivnosti inflamacijskih ćelija

3.6.1 *Detekcija nitrita (po Griess-u)*

Koncentracija nitrita, kao mera produkcije azot oksida, određivana je Griess-ovom reakcijom u eksudatima izolovanim iz sunđera (nakon 24 časa 10 dana) od implantacije sunđera. Takođe, koncentracija nitrita je određivana i u supernatantima nestimuliranih ili LPS-om stimuliranih inflamacijskih ćelija nakon 24 časovne kultivacije *in vitro* u plastičnim pločama sa 96 mesta (ravno dno) u kompletnom RPMI medijumu (4×10^5 ćelija/bazenu). U zapremini od 50µl supernatanta / eksudata dodavano je 50µl Griess-ovog reagensa (Sigma) (smeša 0.1% N-1-naftiletilendiamin i 1% p-aminobenzensulfonamida u zapreminskom odnosu 1:1). Nakon 10 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi intenzitet rastvorene boje je meren na ELISA spektrofotometru (Behring ELISA Processor, Behring, Nemačka) na talasnoj dužini od 570nm (referentna 650 nm). Intenzitet bojene reakcije je srazmeran koncentraciji nitrita u testiranom uzorku. Koncentracija NO je izračunavana

korišćenjem standardne krive dobijene na osnovu standarda NaNO_2 poznatih koncentracija (od $125\mu\text{M}$ do $0.975\mu\text{M}$ u dvostruko opadajućim koncentracijama).

1.1.1. Test adhezije za plastiku

Za procenu spontane i PMA-indukovane adhezije inflamacijskih ćelija za plastiku korišćen je modifikovani kolorimetrijski esej po Oez-u (Oez i sar., 1990). Inflamacijske ćelije su nakon izolacije iz suđera resuspendovane u RPMI medijumu sa 10% FCS i postavljene u ploče sa 96 mesta i ravnim dnom u koncentraciji 2×10^5 /polju. Nakon inkubacije od 45 minuta ili 24h, u zavisnosti od dizajna eksperimenta, neadherentne ćelije su uklonjene ispiranjem ploče toplim PBS. Ispiranje je vršeno višekanalnim pipetom sa po $200\mu\text{l}$ PBS / polju ploče. Višak tečnosti je uklonjen obrnutim centrifugiranjem ploče na 800 obrtaja, 1 minut. Na adherentne ćelije je dodat metanol $100\mu\text{l}$ / polju ploče i ćelije su fiksirane 7 minuta. Nakon toga, metanol je uklonjen a u ploče je dodat 0.1% rastvor metilenskog plavog u PBS u trajanju od 15 minuta (sobna temperatura). U narednom koraku su ploče ispirane (tri puta) u kadici sa česmenskom vodom i ostavljene na vazduhu da se osuše. Boja je rastvarana dodatkom 0.1N HCL, $200\mu\text{l}$ / polju ploče. Intenzitet rastvorene boje, koji je direktno srazmeran broju adherentnih ćelija, meren je na ELISA spektrofotometru (Behring ELISA Processor, Behring, Nemačka) na talasnoj dužini od 650nm (korekcija na 570nm).

3.6.2 Određivanje koncentracije citokina i C reaktivnog proteina

Koncentracije citokina IL-1 β , IL-12, IL-17, IL-33, IFN- γ , TNF- α , IL-1RA, CXCL-10, GM-CSF i C-reaktivnog proteina (CRP) je određivana u eksudatima izolovanim iz suđera nakon 24 časa ili 10 dana od implantacije. Korišćeni su sledeći komercijalni ELISA kitovi proizvođača R&D Systems (Mineapolis, SAD): Mouse IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA, nivo senzitivnosti 15.60 - 1,000 pg/mL; Mouse IL-12 p70 DuoSet ELISA, nivo senzitivnosti 39.10 - 2,500 pg/mL; Mouse IL-17 DuoSet ELISA, nivo senzitivnosti 15.60 - 1,000 pg/mL; Mouse IL-33 DuoSet ELISA, nivo senzitivnosti 15.60 - 1,000 pg/mL; Mouse IFN-gamma DuoSet ELISA, nivo senzitivnosti 31.20 - 2,000 pg/mL; Mouse TNF-alpha DuoSet ELISA, nivo senzitivnosti 31.20 - 2,000 pg/mL; Mouse IL-1ra/IL-1F3 DuoSet ELISA, nivo senzitivnosti 156.00 - 10,000 pg/mL; Mouse CXCL10/IP-10/CRG-2 DuoSet ELISA, nivo senzitivnosti 62.50 - 4,000 pg/mL; Mouse GM-CSF DuoSet ELISA, nivo

senzitivnosti 7.81 - 500 pg/mL; Mouse C-Reactive Protein/CRP DuoSet ELISA, nivo senzitivnosti 23.40 - 1,500 pg/mL. Celokupna procedura je izvršena prema uputstvu proizvođača.

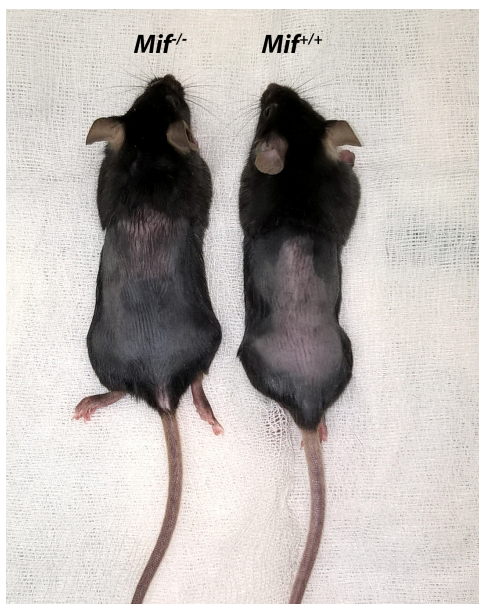
3.7 Obrada podataka

Prilikom obrade podataka korišćen je Student-ov t test, a vrednosti sa $p < 0.05$, $p < 0.01$ i $p < 0.001$ smatrane su statistički značajno različitim. Statistička obrada podataka urađena je pomoću statističkog programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., San Dijego, SAD).

4 Rezultati

4.1 Biološke karakteristike $Mif^{-/-}$ i $Mif^{+/+}$ miševa

Pre početka eksperimenta miševi sa delecijom *Mif* gena su gajeni dve godine u vivarijumu Instituta za medicinska istraživanja (IMI) VMA gde su detaljno upoznate njihove biološke karakteristike. Rezultati prikazani u tabeli 1 i na slici 1 pokazuju veliku sličnost u svim posmatranim parametrima između $Mif^{-/-}$ miševa i kontrolnog $Mif^{+/+}$ soja C57BL/6 miševa, a koje su detaljno opisane u uvodu (C57BL/6 inbredni soj). Jedina fenotipska razlika se odnosila na nešto svetliju kožu $Mif^{+/+}$ miševa u odnosu na $Mif^{-/-}$ miševima koja se videla nakon šišanja životinja, a pre implantacije polivinilskih sundera.

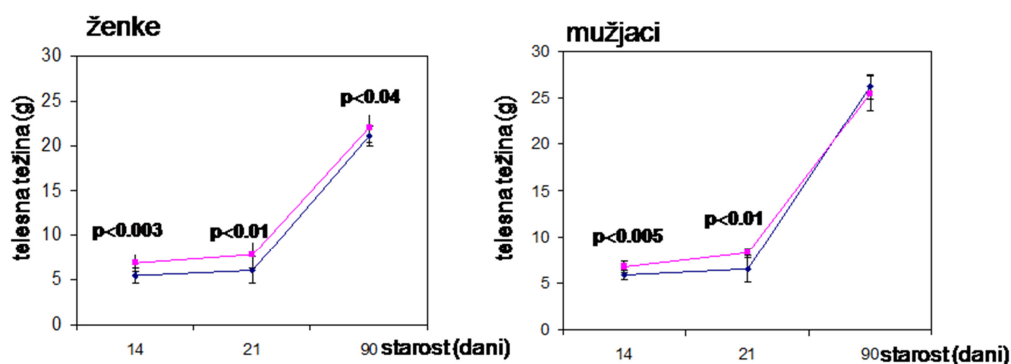


Slika 1. Fenotipske karakteristike $Mif^{-/-}$ i $Mif^{+/+}$ miševa. Uočava se tamnija boja ošišanog dela kože kod $Mif^{-/-}$ miševa

Kada su u pitanju ostale biološke osobine pokazano je sledeće. Primećene su razlike u broju okoćenih i preživelih mladunaca. Broj okoćenih mladunaca kod $Mif^{+/+}$ soja je bio u proseku 5.42, dok je broj preživelih mladunaca bio 4.68. Istovremeno, broj okoćenih mladunaca kod $Mif^{-/-}$ soja je iznosio 7.7, a broj pteživelih mladunaca je iznosio prosečno 6.7.

Estralni ciklus kod oba tipa ispitivanih miševa se javljao između pete i šeste nedelje starosti i trajao je četiri do pet dana. Ciklus je bio redovan i fazni (proestrus, estrus, metestrus i diestrus), bez bitnijih razlika između sojeva.

Oba soja miševa u trenutku okota su imala ujednačenu telesnu masu (oko 1.5g). Do 14. dana telesna masa je praćena objedinjeno zbog teškoća u razlikovanju pola kod mladunaca. Kada je analizirana dinamika rasta miševa, na osnovu porasta njihove telesne mase može se zaključiti da je između 14. i 21. dana porast telesne mase i ženki i mužjaka $Mif^{-/-}$ miševa bio statistički značajno veći u odnosu na ženke i mužjake $Mif^{+/+}$ miševa. Takođe je, kako 14. tako i 21. dana, nađena statistički značajno veća telesna masa kod oba pola u $Mif^{-/-}$ miševa. Na Grafikonu 1 se vidi da su 21. dana nakon okota $Mif^{-/-}$ ženke imale telesnu masu 7.78 ± 1.43 g u odnosu na $Mif^{+/+}$ ženke koje čija je masa iznosila 6.1 ± 1.48 g ($p < 0.01$). Mužjaci $Mif^{-/-}$ soja mereni u istom terminu imali su masu 8.27 ± 0.51 g, a mužjaci soja $Mif^{+/+}$ 6.52 ± 1.44 g ($p < 0.01$). Dostizanjem životnog perioda od 3 meseca, ta razlika više nije bila statistički značajna u slučaju mužjaka, dok su ženke $Mif^{-/-}$ miševa i u ovom terminu bile značajno teže od ženki $Mif^{+/+}$ miševa (grafikon 1).



Grafikon 1. Dinamika porasta telesne mase u $Mif^{-/-}$ i $Mif^{+/+}$ miševa

4.2 Hematološki parametri odraslih $Mif^{-/-}$ i $Mif^{+/+}$ miševa

S obzirom da se ovaj projekat odnosio na izučavanje procesa inflamacije u kojoj ključnu ulogu imaju ćelije krvi bilo je neophodno analizirati osnovne hematološke parametre između ispitivanih sojeva miševa u cilju utvrđivanja eventualnih razlika, koje bi mogle uticati na ishod eksperimenta. Rezultati prikazani u Tabeli 1 pokazuju da su mužjaci $Mif^{-/-}$ miševa imali statistički značajno veće vrednosti broja eritrocita i

koncentraciju hemoglobina ($p < 0.05$) u odnosu na mužjake divljeg soja miševa. S druge strane, ženke $Mif^{-/-}$ miševa su imale statistički značajno manji broj leukocita ($p < 0.01$) i to na račun smanjenja ukupnog broja limfocita ($p < 0.001$) u odnosu na ove parametre u ženki $Mif^{+/+}$ miševa. Nisu nađene statistički značajne razlike u relativnim i ukupnim vrednostima broja neutrofilnih granulocita, eozinofila i bazofila između sojeva, kako kod mužjaka, tako i kod ženki.

Tabela 1. Hematološki parametri kod miševa sa delecijom Mif gena ($Mif^{-/-}$) i kontrolnog divljeg soja ($Mif^{+/+}$) miševa

parametri	$Mif^{+/+}$	$Mif^{-/-}$	$Mif^{+/+}$	$Mif^{-/-}$
	mužjaci		ženke	
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	9.89 \pm 0.56	10.59 \pm 0.28 *	10.12 \pm 0.28	10.46 \pm 0.49
Leukociti ($\times 10^9/L$)	11.12 \pm 2.76	9.02 \pm 0.79	11.33 \pm 2.94	7.67 \pm 0.51 **
Trombociti ($\times 10^9/L$)	828.25 \pm 109.27	664.50 \pm 151.37	639.83 \pm 157.26	510.75 \pm 142.33
Neutrofilni granulociti ($\times 10^9/L$)	2.57 \pm 0.22	2.47 \pm 0.52	3.50 \pm 2.24	2.39 \pm 0.59
Neutrofilni granulociti (%)	25.88 \pm 7.78	27.90 \pm 7.67	29.17 \pm 9.12	31.40 \pm 8.21
Limfociti ($\times 10^9/L$)	8.83 \pm 2.55	6.17 \pm 1.27	7.36 \pm 0.56	5.01 \pm 0.83 ***
Limfociti (%)	70.53 \pm 7.43	67.93 \pm 8.61	67.03 \pm 10.16	65.25 \pm 8.18
Monociti ($\times 10^9/L$)	0.24 \pm 0.11	0.19 \pm 0.01	0.33 \pm 0.27	0.13 \pm 0.07
Monociti (%)	2.08 \pm 0.43	2.13 \pm 0.17	2.67 \pm 1.31	1.75 \pm 0.87
Eozinofilni granulociti ($\times 10^9/L$)	0.05 \pm 0.03	0.05 \pm 0.02	0.05 \pm 0.02	0.04 \pm 0.02
Eozinofilni granulociti (%)	0.55 \pm 0.29	0.50 \pm 0.19	0.60 \pm 0.24	0.55 \pm 0.24
Bazofilni granulociti ($\times 10^9/L$)	0.15 \pm 0.20	0.12 \pm 0.08	0.08 \pm 0.03	0.08 \pm 0.08
Bazofilni granulociti (%)	0.98 \pm 1.22	0.72 \pm 0.33	1.45 \pm 1.02	1.05 \pm 1.17
Hemoglobin (g/L)	138.50 \pm 5.26	147.75 \pm 5.44 *	137.67 \pm 9.33	145.25 \pm 6.34

Vrednosti su prikazane kao srednja vrednost (\bar{X}) \pm standardna devijacija (SD) za $n=6$ životinja u svakoj grupi

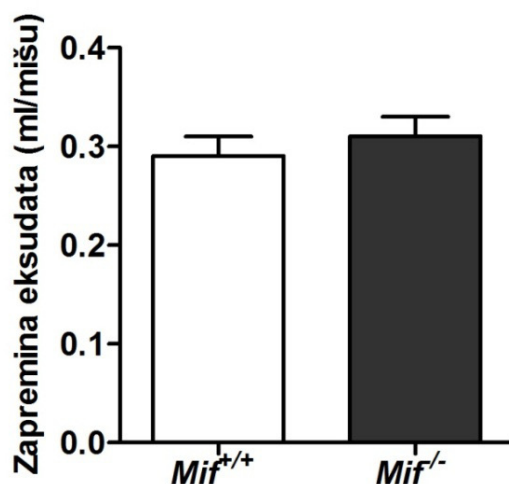
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ u odnosu na odgovarajući pol kod $Mif^{+/+}$ miševa

4.3 Rana faza inflamacije

Rana faza inflamacije je analizirana 24 časa nakon implantacije sunđera u miševa sa delecijom *Mif* gena (*Mif*^{-/-}) i kontrolnog divljeg soja (*Mif*^{+/+}) C57BL/6 miševa. Iz sunđera je izdvojen eksudat, a nakon merenja zapremine eksudata ćelije su izcentrifugirane, izbrojane, a zatim su korišćene za morfološka i funkcionalna ispitivanja. U eksudatu je određena koncentracija NO i citokina.

4.3.1 Zapremina eksudata

Na grafikonu 2 je prikazana zapremina eksudata. Ne uočava se statistički značajna razlika u zapremini eksudata između *Mif*^{-/-} i divljeg soja *Mif*^{+/+} miševa ($p > 0.05$).

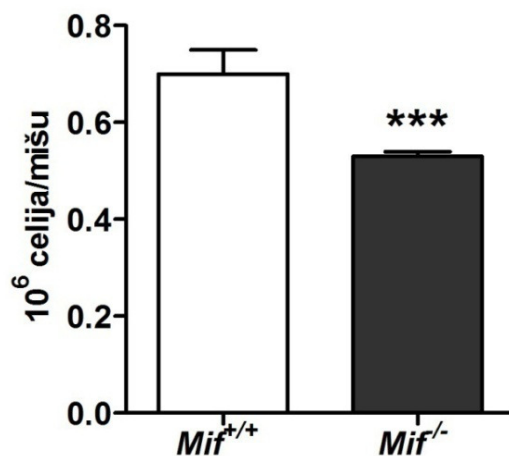


Grafikon 2. Zapremina eksudata sakupljenog iz sunđera koji su subkutano implantirani u miševe sa delecijom *Mif* gena (*Mif*^{-/-}) i kontrolnog divljeg soja (*Mif*^{+/+}) miševa.

Vrednosti su date kao $\bar{X} \pm SD$ za $n=6$ životinja u obe grupe.

4.3.2 Ukupna celularnost

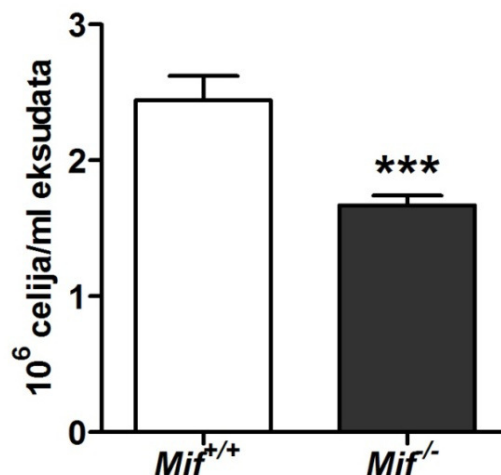
Poređenjem ukupnog broja inflamacijskih ćelija izolovanih iz miševa, zapaža se značajno manja celularnost u *Mif*^{-/-} miševa u odnosu na kontrolni *Mif*^{+/+} soj ($p < 0.001$) (Grafikon 3). Slična razlika je dobijena i kada je broj inflamacijskih ćelija izražen po mililitru eksudata (Grafikon 4).



Grafikon 3. Ukupna celularnost u eksudatu sakupljenog iz sundera 24 časa nakon subkutane implantacije u miševe sa delecijom *Mif* gena (*Mif*^{-/-}) i kontrolnog divljeg soja (*Mif*^{+/+}) miševa.

Stubići predstavljaju srednje vrednosti ukupnog broja ćelija, ($\bar{X} \pm SD$) za po 6 životinja u grupi.

*** $p < 0.001$ u odnosu na kontrolni soj *Mif*^{+/+} miševa



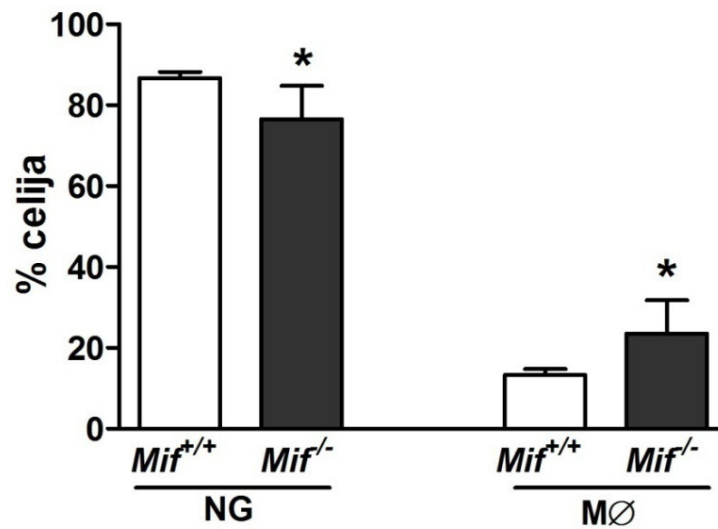
Grafikon 4. Relativna celularnost u eksudatu dobijenog iz sundera 24 časa nakon subkutane implantacije u miševе sa delecijom *Mif* gena (*Mif*^{-/-}) i kontrolnog divljeg soja (*Mif*^{+/+}) miševa.

Stubići predstavljaju srednje vrednosti broja inflamacijskih ćelija izražene po mililitru eksudata ($\bar{X} \pm SD$) za po 6 životinja u grupi.

*** $p < 0.001$ u odnosu na kontrolni soj *Mif*^{+/+} miševa

4.3.3 Sastav inflamacijskih ćelija

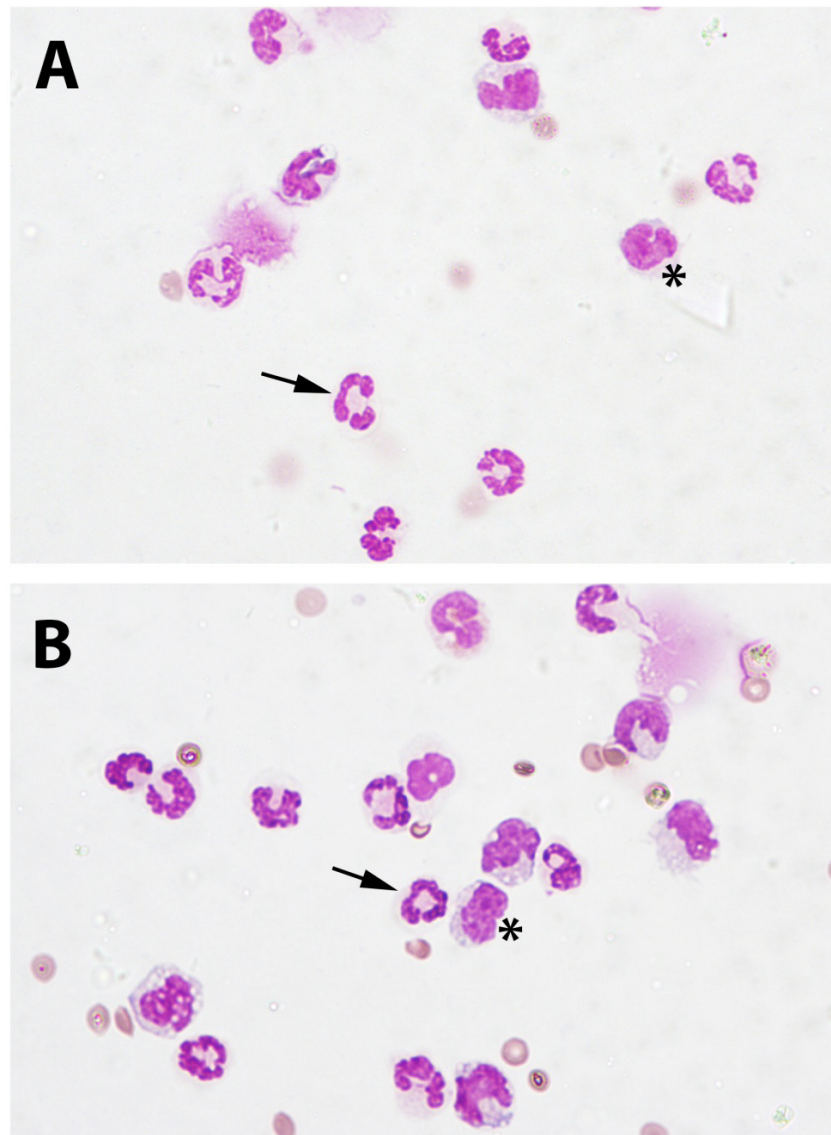
Analizom citospin preparata inflamacijskih ćelija 24 časa nakon subkutane implantacije polivinilskih sundera zapaženo je da u oba soja miševa dominiraju neutrofilni granulociti. Međutim, u miševa sa delecijom *Mif* gena procenat ovih ćelija je bio statistički značajno manji ($76.5 \pm 8.3\%$) u odnosu na kontrolni divlji soj miševa ($86.7 \pm 1.5\%$) ($p < 0.05$). Procentualno smanjenje neutrofilnih granulocita u *Mif*^{-/-} miševa je bio na račun povećanja procenta makrofaga ($23.5 \pm 8.3\%$) i ta razlika je bila statistički značajna ($p < 0.05$) u odnosu na procenat makrofaga kod *Mif*^{+/+} miševa ($13.3 \pm 1.5\%$). (Grafikon 5; slika 2A i 2B)



Grafikon 5. Relativna zastupljenost neutrofilnih granulocita i makrofaga u eksudatu dobijenog iz sundera implantiranih u miševе sa delecijom *Mif* gena (*Mif*^{-/-}) i kontrolnog divljeg soja (*Mif*^{+/+}) miševa.

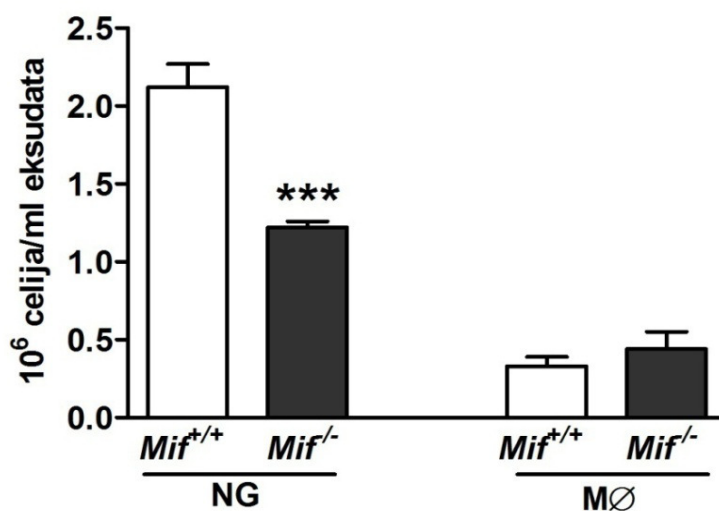
Stubići predstavljaju srednje vrednosti procenta neutrofilnih granulocita (NG) odnosno makrofaga (MØ)±SD za n=6 miševa po grupi.

*p<0.05 u odnosu na odgovarajuće vrednosti kod kontrolnog soja *Mif*^{+/+} miševa



Slika 2. Morfološki izgled inflamacijskih ćelija izolovanih iz eksudata 24 časa nakon implantacije sundera. Uočava se relativno veća zastupljenost makrofaga (*), a manja neutrofilnih granulocita (strelica) kod miševa sa delecijom *Mif* gena (B) u odnosu na kontrolni soj (A).

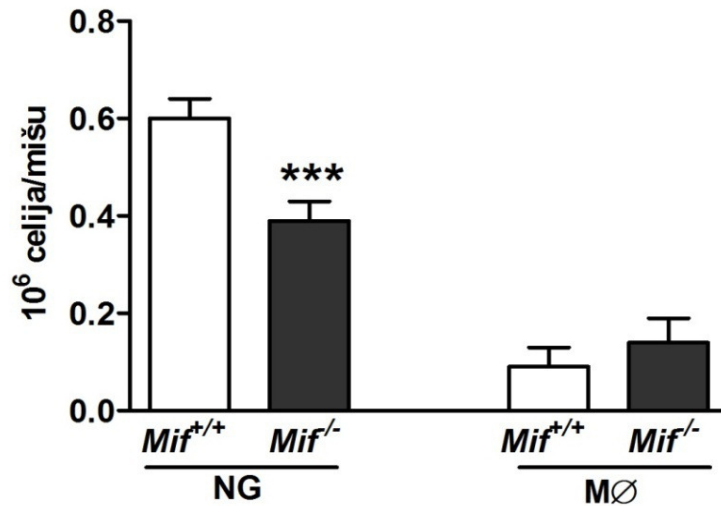
Kada je analiziran ukupan broj ovih ćelija izražen po mililitru eksudata (grafikon 6), odnosno kada je izvršeno preračunavanje ukupnog broja neutrofilnih granulocita, odnosno makrofaga po mišu (grafikon 7) dobijeni su drugačiji rezultati. Naime, pokazano je da je smanjenje ukupnog broja neutrofilnih granulocita u $Mif^{-/-}$ miševa bilo izraženije nego relativno smanjenje broja ovih ćelija ($p < 0.001$) u odnosu na ukupnu celularnost u kontrolnog divljeg soja miševa, zbog smanjenja ukupne celularnosti u miševa sa delecijom Mif gena. Međutim, nije nađena statistički značajna razlika u ukupnom broju makrofaga bez obzira na način njihovog preračunavanja.



Grafikon 6. Ukupan broj neutrofilnih granulocita i makrofaga u eksudatu dobijenog iz sundera 24 časa nakon subkutane implantacije u miševе sa delecijom Mif gena ($Mif^{-/-}$) i kontrolnog divljeg soja ($Mif^{+/+}$) miševa.

Stubići predstavljaju srednje vrednosti broja neutrofilnih granulocita (NG) odnosno makrofaga (MØ) \pm SD izražene po mililitru eksudata za $n=6$ miševa po grupi.

*** $p < 0.001$ u odnosu na broj NG kod kontrolnog soja $Mif^{+/+}$ miševa



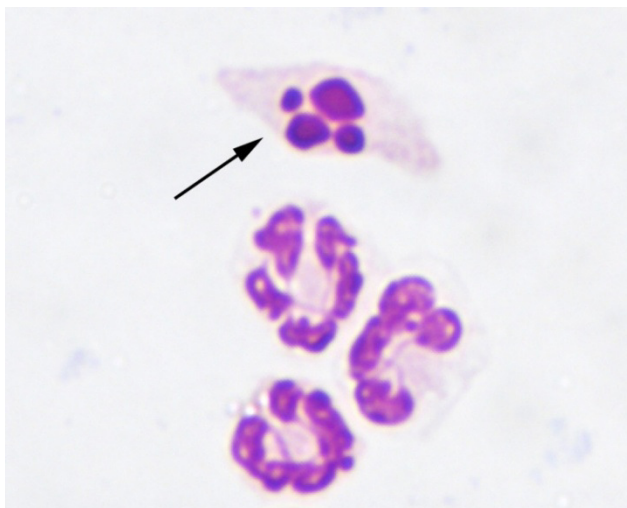
Grafikon 7. Ukupan broj neutrofilnih granulocita i makrofaga u eksudatu dobijenog iz sudaera, 24 časa nakon subkutane implantacije u miševе sa delecijom *Mif* gena (*Mif*^{-/-}) i kontrolnog divljeg soja (*Mif*^{+/+}) miševa.

Stubići predstavljaju srednje vrednosti broja neutrofilnih granulocita (NG) odnosno makrofaga (MØ) ±SD izražene po mišu (n=6 miševa po grupi).

***p<0.001 u odnosu na broj NG kod kontrolnog soja *Mif*^{+/+} miševa

4.3.4 Apoptoza

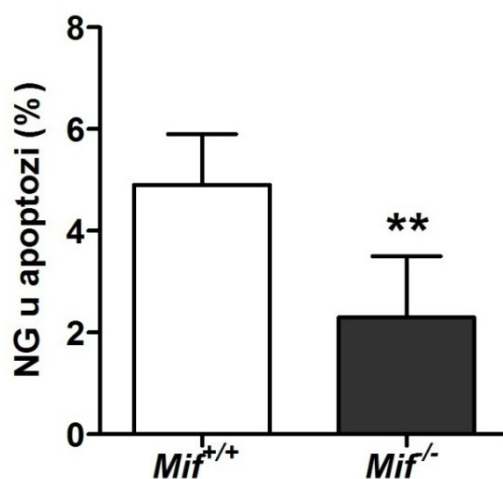
Analizom citospin preparata jasno se uočavaju pojedini neutrofilni granulociti u apoptozi (fragmentacija jedra i kondenzacija hromatina), za razliku od očuvane morfologije makrofaga (Slika 3).



Slika 3. Neutrofilni granulocit u apoptozi

Grafikon 8 pokazuje da je procenat apoptotskih neutrofilnih granulocita relativno mali, ali da je statistički značajno manji ($p < 0.05$) u miševa sa delecijom *Mif* gena ($2.3 \pm 1.2\%$) u odnosu na kontrolni divlji soj ($4.9 \pm 1.0\%$).

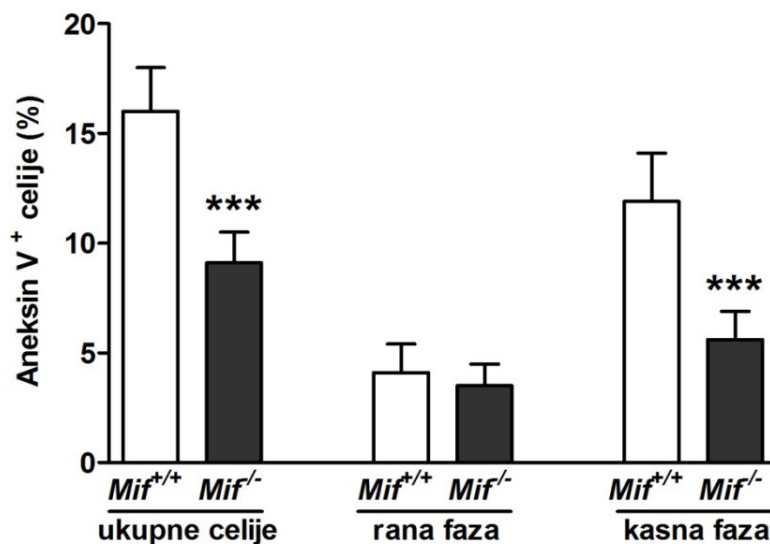
Do sličnih rezultata se došlo analizom apoptotskih ćelija u populaciji inflamatornih ćelija na osnovu membranske ekspresije Annexin-a V i primene protočne citofluorimetrije, s tim što je procenat Annexin- V^+ ćelija bio značajno veći u obe grupe životinja (Grafikoni 9 i 10). Kada su analizirane faze apoptoze zapaža se da je ukupan procenat apoptotskih ćelija (Annexin- V^+) kod *Mif*^{-/-} miševa ($9.1 \pm 1.4\%$) bio statistički značajno manji u odnosu na kontrolni soj *Mif*^{+/+} miševa ($16.0 \pm 2.0\%$), i ta razlika se odnosila na kasnu fazu apoptoze/sekundarne nekroze ($5.6 \pm 1.3\%$ u odnosu na $11.9 \pm 2.2\%$; $p < 0.001$).



Grafikon 8. Procenat apoptotskih granulocita u eksudatu dobijenog 24 časa posle implantacije sundera u miševe identifikovanih morfološkom analizom

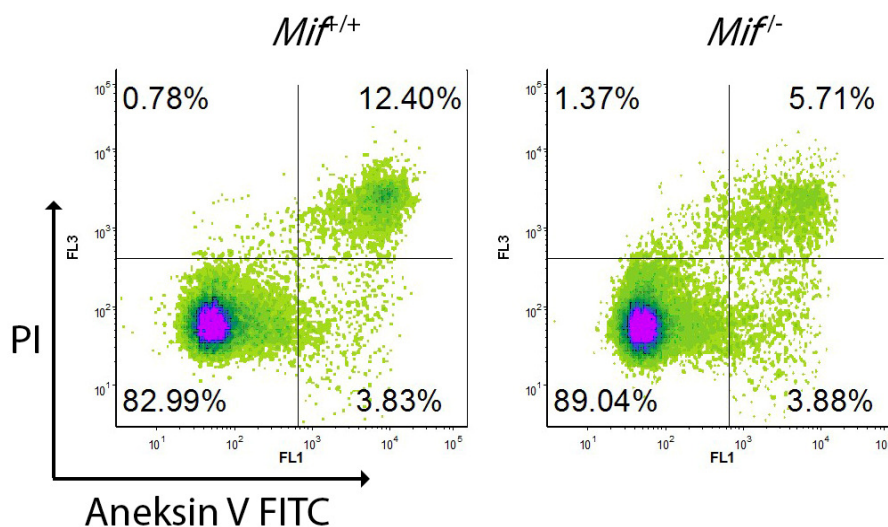
Citospin preparati inflamacijskih ćelija iz eksudata su obojeni MGG metodom. Na svakom preparatu (n=6 po grupi) je izbrojano po 500 neutrofilnih granulocita (NG), nakon čega je izračunat procenat NG sa morfološkim karakteristikama apoptoze kako je prikazano na slici 2. Stubići predstavljaju srednje vrednosti procenta apoptotskih NG±SD za n=6 miševa po grupi.

*p<0.05 u odnosu na odgovarajuće vrednosti kod kontrolnog soja Mif^{+/+} miševa



Grafikon 9. Procenat apoptotskih ćelija identifikovanih na osnovu membranske ekspresije Annexin-a V i protočne citofluorometrije u eksudatu izolovanog iz subkutano implantiranih sudeera u miševе sa delecijom *Mif* gena i kontrolnog divljeg soja (*Mif*^{+/+}) miševa.

Inflamacijske ćelije su izolovane iz sudeera, 24 časa nakon subkutane implantacije u *Mif*^{-/-} i *Mif*^{+/+} miševa, a zatim obojene pomoću Annexin V-FITC i PI kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju srednje vrednosti ukupnog % apoptotskih (Annexin-V⁺) ćelija, % ćelija u ranoj fazi apoptoze (Annexin-V⁺, PI) i ćelija u kasnoj fazi apoptoze (Annexin-V⁺, PI) ±SD za n=6 miševa u grupi.

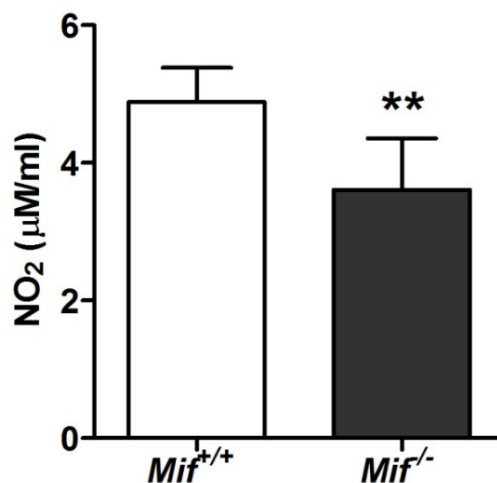


Grafikon 10. Različiti stadijumi apoptoze ćelija na osnovu membranske ekspresije Annexin-a V i protočne citofluorometrije u eksudatu izolovanog iz subkutano implantiranih sunđera u miševima sa delecijom *Mif* gena i kontrolnog divljeg soja (*Mif*^{+/+}) miševa.

Inflamacijske ćelije su izolovane iz sunđera, 24 časa nakon subkutane implantacije u *Mif*^{-/-} i *Mif*^{+/+} miševa, a zatim obojene pomoću Annexin V-FITC i PI kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Prikazani su različiti stadijumi apoptoze u obliku histograma jednog reprezentativnog eksperimenta.

4.3.5 *Produkcija NO in vivo*

Produkcija NO u eksudatu je određivana indirektno na osnovu koncentracije nitrata. Grafikon 11 pokazuje statistički značajno niži nivo NO₂ u eksudatu *Mif*^{-/-} miševa (p<0.01) u odnosu na kontrolni soj miševa.



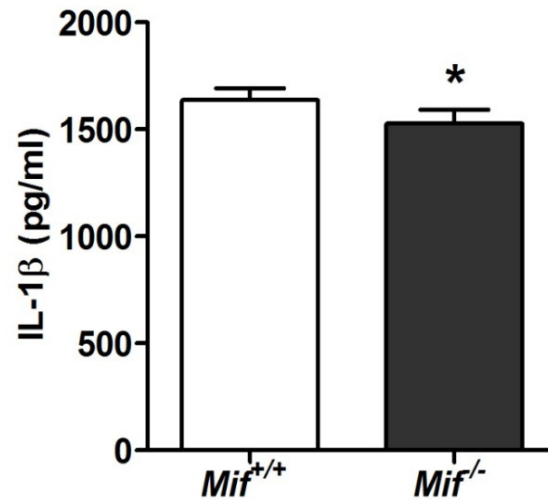
Grafikon 11. Koncentracija NO₂ u eksudatu suđera u ranoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 24 časa posle implantacije suđera u miševе, nakon čega je određena koncentracija NO₂ kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za n=5 (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno n=6 za *Mif*^{-/-} miševе

**p<0.01 u poređenju sa kontrolom (nivo IL-1β u eksudatu *Mif*^{+/+} miševa)

4.3.6 *Produkcija citokina in vivo*

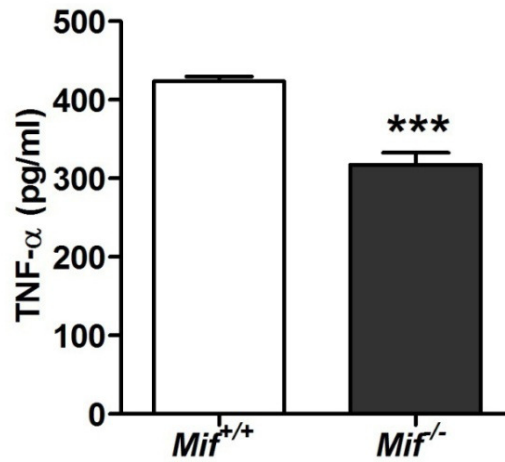
U eksudatu je određen nivo više citokina. U miševa sa delecijom *Mif* gena nivoi IL-1β (1528±65 pg/ml) su bili statistički značajno niži u odnosu na vrednosti ovog citokina u eksudatu divljeg soja miševa (1638±55pg/ml), (p<0.05) (grafikon 12). Razlike su još izraženije kada se analiziraju nivoi TNF-α (grafikon 13) gde su nivoi kod *Mif*^{-/-} miševa iznosili (317.3±15.39 pg/ml), a u kontrolnih *Mif*^{+/+} miševa (423.3±6.43pg/ml) (p<0.001). Interesantno je da su nivoi i IL-1RA (antagonist IL-1β) takođe bili statistički značajno niži (7470±487.6 pg/ml) u *Mif*^{-/-} miševa u odnosu na kontrolni soj (8956±556.4 pg/ml) miševa (p<0.001). (grafikon 14).



Grafikon 12. Nivoi IL-1 β u eksudatu sunđera u ranoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 24 časa posle implantacije sunđera u miševе, nakon čega je određena koncentracija IL-1 β ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševе

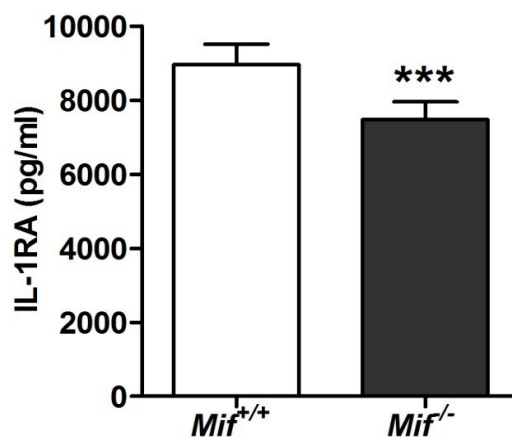
* $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolom (nivo IL-1 β u eksudatu *Mif*^{+/+} miševa)



Grafikon 13. Nivoi TNF- α u eksudatu sunđera u ranoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 24 časa posle implantacije sunđera u miševe, nakon čega je određena koncentracija TNF- α ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševe

*** $p < 0.001$ u poređenju sa kontrolom (nivo TNF- α u eksudatu *Mif*^{+/+} miševa)

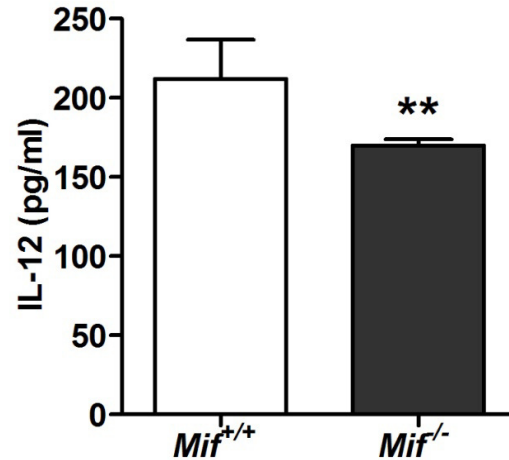


Grafikon 14. Nivoi IL-1RA u eksudatu suđera u ranoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 24 časa posle implantacije suđera u miševe, nakon čega je određena koncentracija IL-1RA ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševe

*** $p < 0.001$ u poređenju sa kontrolom (nivo IL-1RA u eksudatu *Mif*^{+/+} miševa)

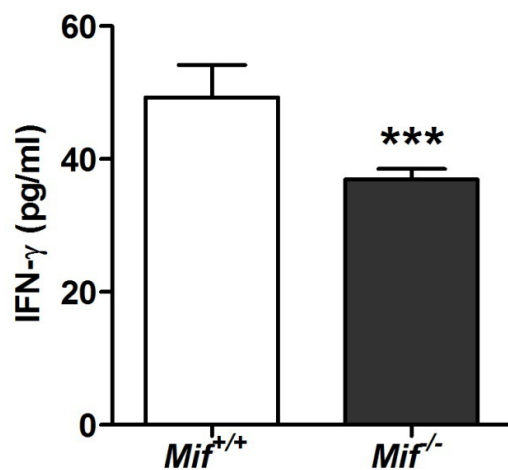
Koncentracije IL-12 (169.8 ± 3.97 pg/ml) i IFN- γ (36.94 ± 1.6 pg/ml) su takođe bile statistički značajno niže u *Mif*^{-/-} miševa u odnosu na kontrolni soj (211.9 ± 24.94 pg/ml -IL-12) ($p < 0.01$), odnosno (49.29 ± 4.9 pg/ml -IFN- γ) ($p < 0.001$). (grafikoni 15 i 16).



Grafikon 15. Nivoi IL-12 u eksudatu sunđera u ranoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 24 časa posle implantacije sunđera u miševе, nakon čega je određena koncentracija IL-12 ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševе

** $p < 0.01$ u poređenju sa kontrolom (nivo IL-12 u eksudatu *Mif*^{+/+} miševa)

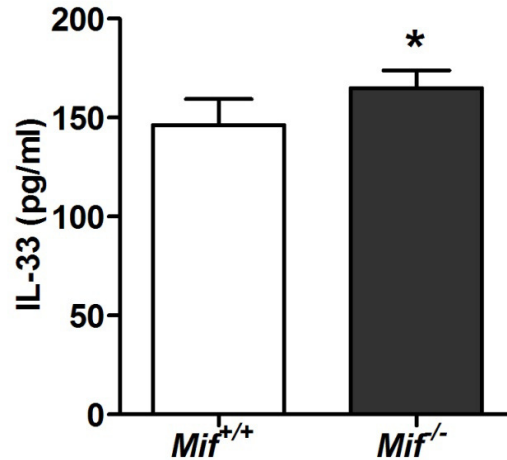


Grafikon 16. Nivoi IFN- γ u eksudatu sundera u ranoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 24 časa posle implantacije sundera u miševe, nakon čega je određena koncentracija IFN- γ ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševe

*** $p < 0.001$ u poređenju sa kontrolom (nivo IFN- γ u eksudatu *Mif*^{+/+} miševa)

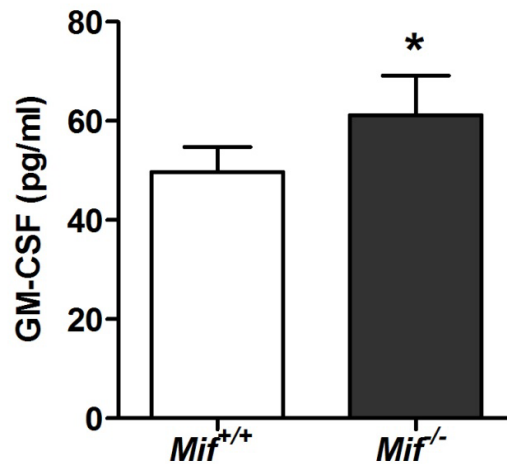
Suprotni rezultati su dobijeni analizom nivoa IL-33 i GM-CSF-a. Koncentracije IL-33 u eksudatu miševa sa delecijom *Mif*-gena su iznosile (164.9 \pm 9.01 pg/ml), a u divljeg soja (146.2 \pm 13.23 pg/ml) ($p < 0.05$). Koncentracije GM-CSF-a u eksudatu miševa sa delecijom *Mif*-gena su iznosile (61.19 \pm 8.0 pg/ml), a u kontrolnog soja (49.67 \pm 5.1 pg/ml) ($p < 0.05$) (grafikoni 17 i 18).



Grafikon 17. Nivoi IL-33 u eksudatu sunđera u ranoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 24 časa posle implantacije sunđera u miševe, nakon čega je određena koncentracija IL-33 ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševe

* $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolom (nivo IL-33u eksudatu *Mif*^{+/+} miševa)

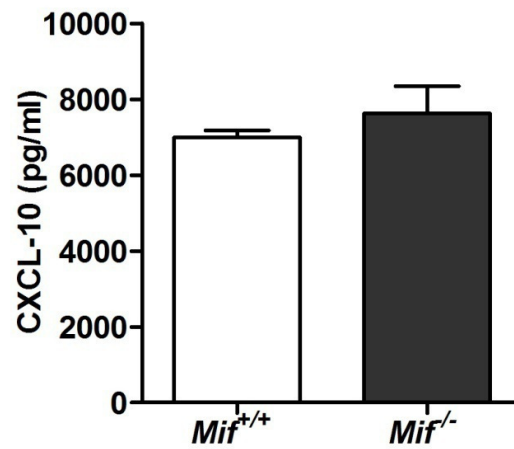


Grafikon 18. Nivoi GM-CSF u eksudatu sundera u ranoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 24 časa posle implantacije sundera u miševе, nakon čega je određena koncentracija GM-CSF ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševе

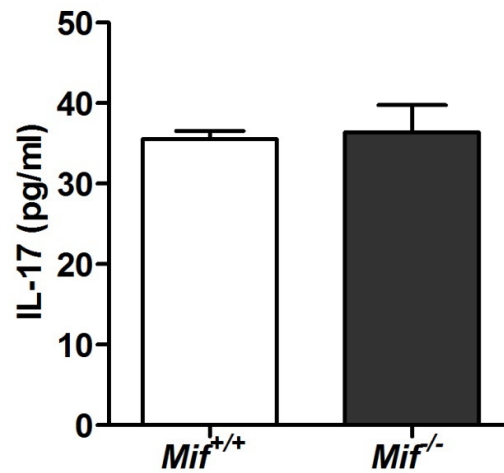
* $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolom (nivo GM-CSF u eksudatu *Mif*^{+/+} miševa)

Nisu uočene statistički značajne razlike u nivoima CXCL-10, IL-17 i CRP ($p > 0.05$) u eksudatu između ispitivanih sojeva miševa (grafikoni 19, 20 i 21).



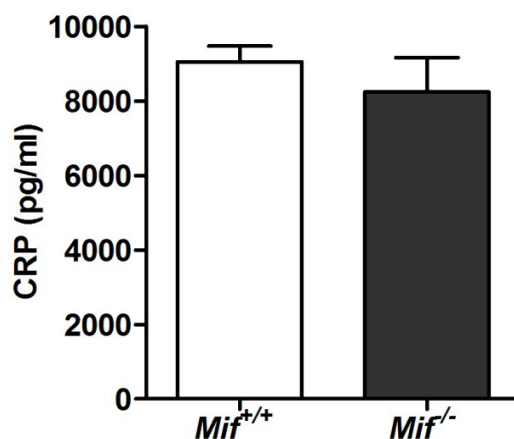
Grafikon 19. . Nivoi CXCL-10 u eksudatu sundera u ranoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 24 časa posle implantacije sundera u miševе, nakon čega je određena koncentracija CXCL-10 ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševе



Grafikon 20. Nivoi IL-17 u eksudatu sundera u ranoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 24 časa posle implantacije sundera u miševe, nakon čega je određena koncentracija IL-17 ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševe

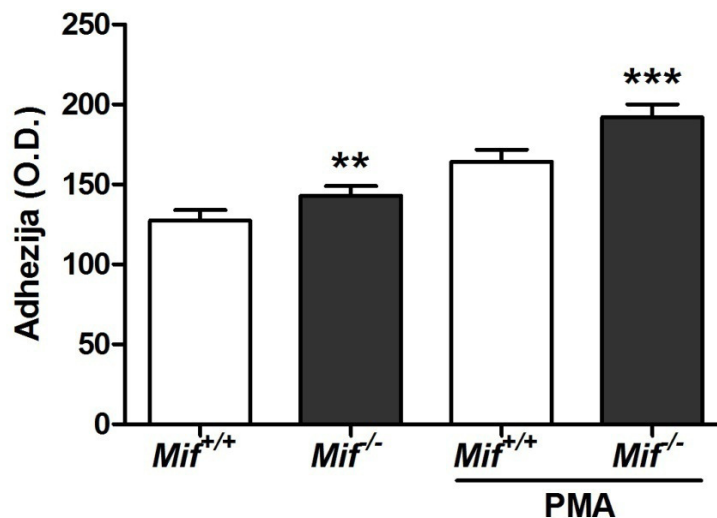


Grafikon 21. Nivoi CRP u eksudatu sundera u ranoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 24 časa posle implantacije sundera u miševе, nakon čega je određena koncentracija CRP ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševе

4.3.7 Adhezija inflamacijskih ćelija *in vitro*

Adhezija inflamacijskih ćelija u *Mif*^{-/-} miševa u kulturi je bila statistički značajno veća u odnosu na inflamacijske ćelije izolovane iz sundera kontrolnih *Mif*^{+/+} miševa ($p < 0.05$). Stimulacija inflamacijskih ćelija sa PMA je dovela do povećane adhezivnosti ćelija, ali je nakon stimulacije adhezija u miševa sa delecijom *Mif* gena bila još izraženija nego kod nestimulisanih ćelija ($p < 0.01$). (Grafikon 22)



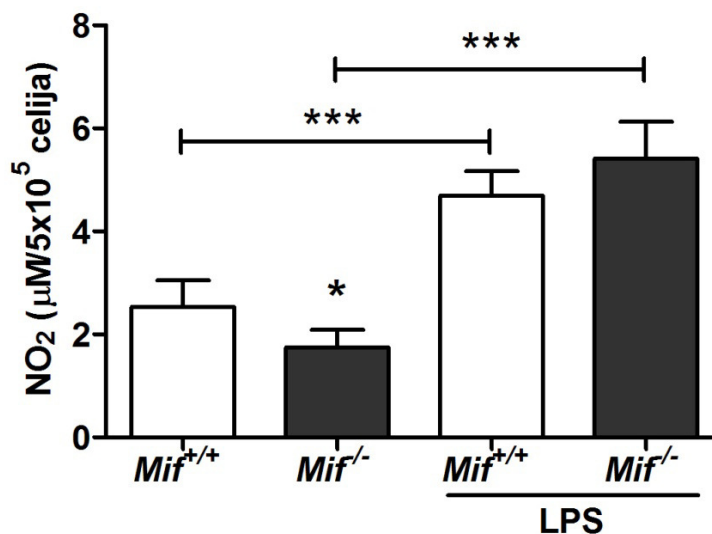
Grafikon 22. Adhezija inflamacijskih ćelija u ranoj fazi inflamacije *in vitro*

Inflamacijske ćelije su izolovane iz sunđera 24 časa nakon implantacije u miševе, a zatim zasađene u plastične ploče sa ravnim dnom sa 96 bazena (2×10^5 ćelija/bazenu) kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stimulacija je vršena pomoću PMA. Stubići predstavljaju srednje vrednosti optičke gustine (O.D.) ($\bar{X} \pm SD$) za $n=5$ životinja u grupi

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

4.3.8 *Produkcija NO in vitro*

Inflamacijske ćelije su kultivisane sa i bez LPS-a, a nakon 24 časa je određena koncentracija NO_2 u supernatantima kultura. Koncentracija NO_2 je bila statistički značajno niža u supernatantima kultura ćelija izolovanih iz eksudata *Mif*^{-/-} miševa ($p < 0.05$). Dodavanje LPS-a je dovelo do statistički značajnog porasta nivoa NO_2 u kulturama oba soja miševa ($p < 0.001$), ali međusobne razlike nisu bile statistički značajne. (Grafikon 23)



Grafikon 23. Produkcija NO₂ od strane inflamacijskih ćelija u ranoj fazi inflamacije *in vitro*

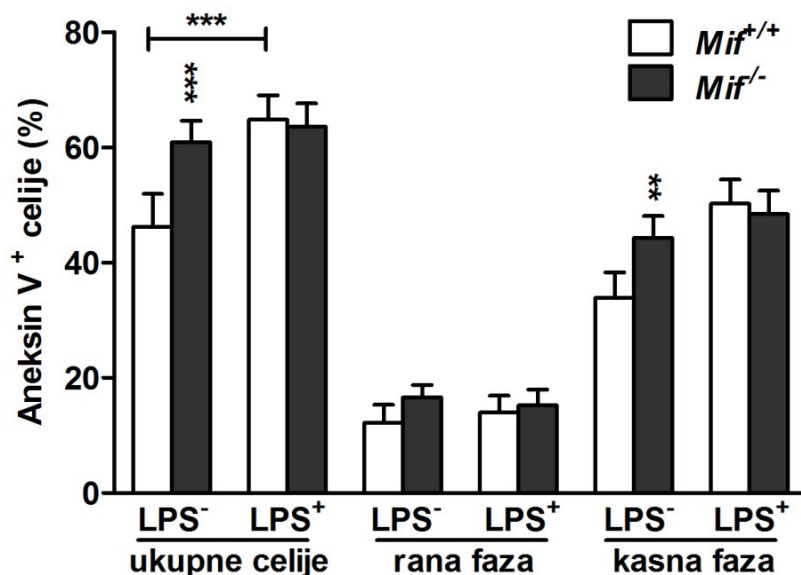
Inflamacijske ćelije su izolovane iz sundera 24 časa nakon implantacije u miševе, a zatim zasađene u plastične ploče sa ravnim dnom sa 96 bazena (2 x 10⁵ ćelija/bazenu) u prisustvu ili odsustvu LPS-a. Nakon 24 časa supernatanti su sakupljeni i određivana je koncentracija NO₂ kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju srednje vrednosti koncentracije NO₂ ($\bar{X} \pm SD$) za n=5 životinja u grupi

*p<0.05; ***p<0.001

4.3.9 Apoptoza inflamacijskih ćelija u kulturi

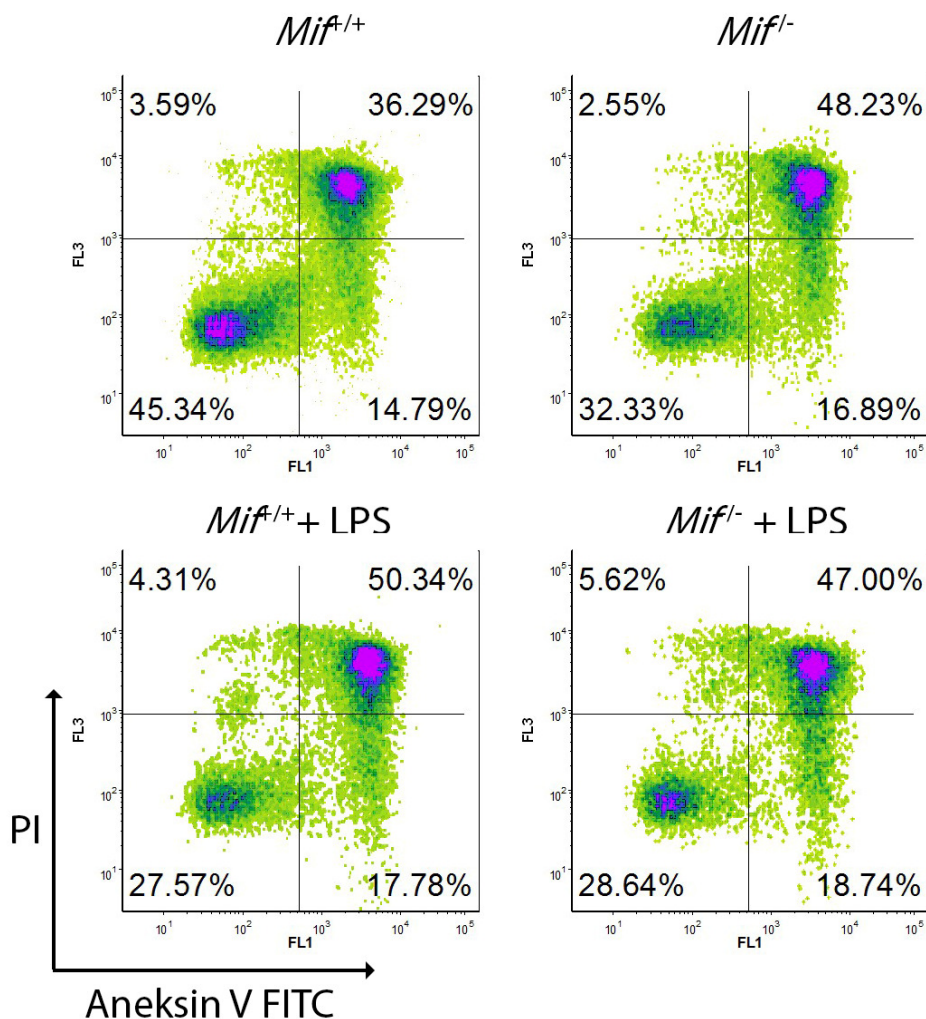
Apoptoza inflamacijskih ćelija u kulturi je određivana protočnom citofluorometrijom. Rezultati prikazani na grafikonima 24 i 25 pokazuju suprotne rezultate u odnosu na rezultate *in vivo*. Apoptoza inflamacijskih ćelija je bila statistički značajno veća (60.9±3.7%) u Mif^{-/-} miševa u odnosu na kontrolni, divlji soj (46.2±5.7%) (p<0.001), i ta se razlika odnosila na veći % ćelija u kasnoj fazi apoptoze/sekundarne nekroze (44.3±3.8% kod Mif^{-/-} miševa u odnosu na 33.9±4.4% kod divljeg soja miševa; p<0.01). Dodavanjem LPS-a u ćelijske kulture bilo je praćeno povećanjem apoptoze inflamacijskih ćelija kod divljeg soja miševa i to na

račun većeg procenta ćelija u kasnoj fazi apoptoze ($p < 0.001$), ali ne i kod miševa sa delecijom *Mif* gena.



Grafikon 24. Procenat apoptotskih ćelija identifikovanih na osnovu membranske ekspresije Annexin-a V i protočne citofluorometrije u u ranoj fazi inflamacije *in vitro*

Inflamacijske ćelije su izolovane iz sunđera 24 časa nakon implantacije u miševe, a zatim zasađene u plastične ploče sa ravnim dnom sa 96 bazena (2×10^5 ćelija/bazenu) u prisustvu i odsustvu LPS-a kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Nakon 24 časa, ćelije su sakupljene, obeležene Annexin V Alexa Fluor 488/PI i analizirane na protočnom citofluorimetru. Stubići predstavljaju srednje vrednosti ukupnog % apoptotskih (Annexin-V⁺) ćelija, % ćelija u ranoj fazi apoptoze (Annexin-V⁺, PI⁻) i ćelija u kasnoj fazi apoptoze (Annexin-V⁺, PI⁺) \pm SD za n=5 miševa u grupi. *** $p < 0.001$



Grafikon 25. Različiti stadijumi apoptoze ćelija identifikovanih na osnovu membranske ekspresije Annexin-a V i protočne citofluorometrije u ranoj fazi inflamacije *in vitro*

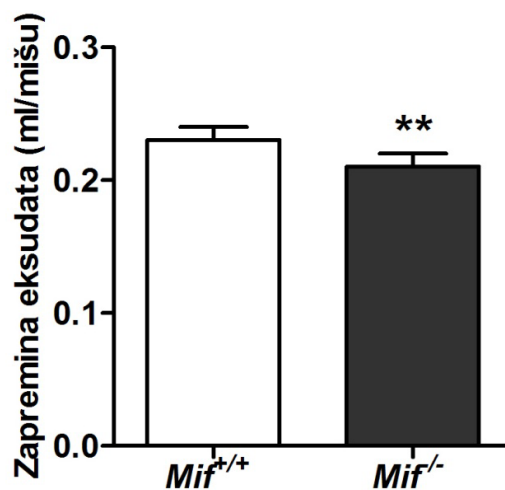
Inflamacijske ćelije su izolovane iz sunđera 24 časa nakon implantacije u miševe, a zatim zasađene u plastične ploče sa ravnim dnom sa 96 bazena (2×10^5 ćelija/bazenu) u prisustvu i odsustvu LPS-a kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Nakon 24 časa, ćelije su sakupljene, obeležene Annexin V Alexa Fluor 488/PI i analizirane na protočnom citofluorimetru. Prikazani su različiti stadijumi apoptoze u obliku histograma jednog reprezentativnog eksperimenta.

4.4 Kasna faza inflamacije u $Mif^{-/-}$ i $Mif^{+/+}$

Kasna faza inflamacije je analizirana 10 dana nakon implantacije sunđera u miševa sa delecijom Mif gena ($Mif^{-/-}$) i kontrolnog divljeg soja ($Mif^{+/+}$) C57BL/6 miševa. Kao i u ranoj fazi iz sunđera je izdvojen eksudat i nakon merenja njegove zapremine, ćelije su izcentrifugirane, izbrojane, a zatim su korišćene za morfološka i funkcionalna ispitivanja.

4.4.1 Zapremina eksudata

Na grafikonu 26 je prikazana zapremina eksudata. Za razliku od rane faze, zapremina eksudata je bila statistički značajno manja u $Mif^{-/-}$ miševa ($p > 0.01$).



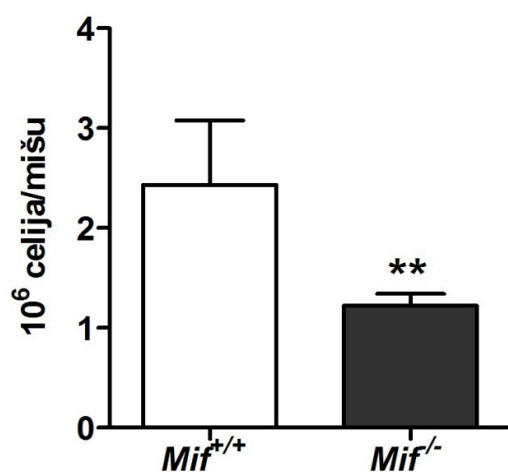
Grafikon 26. Zapremina eksudata dobijenog iz sunđera implantiranih u miševa sa delecijom Mif gena ($Mif^{-/-}$) i kontrolnog divljeg soja ($Mif^{+/+}$) miševa.

Eksudat je izdvojen iz sunđera 10. dana nakon implantacije u miševima, kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju srednje vrednosti zapremine eksudata (\bar{X}) \pm SD za n=6 miševa po grupi

** $p < 0.01$ u poređenju sa $Mif^{+/+}$ miševima

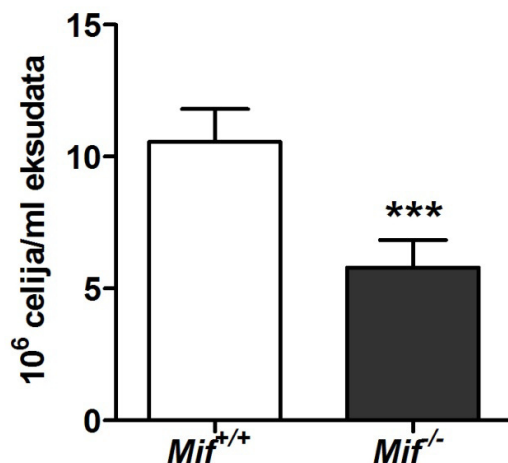
4.4.2 Ukupna celularnost

Poređenjem ukupnog broja inflamacijskih ćelija iz eksudata, zapaža se, slično nalazima u ranoj fazi, značajno manja celularnost u *Mif*^{-/-} miševa u odnosu na kontrolni *Mif*^{+/+} soj ($p < 0.01$) (Grafikon 27). Slična razlika je dobijena i kada je broj inflamacijskih ćelija izražen po mililitru eksudata (Grafikon 28).



Grafikon 27. Ukupna celularnost u eksudatu dobijenog iz suđera implantiranih u miševu sa delecijom *Mif* gena (*Mif*^{-/-}) i kontrolnog divljeg soja (*Mif*^{+/+}) miševa u kasnoj fazi inflamacije. Stubići predstavljaju srednje vrednosti ukupnog broja ćelija, $\bar{X} \pm SD$ za po 6 životinja u grupi.

** $p < 0.01$ u odnosu na kontrolni soj *Mif*^{+/+} miševa



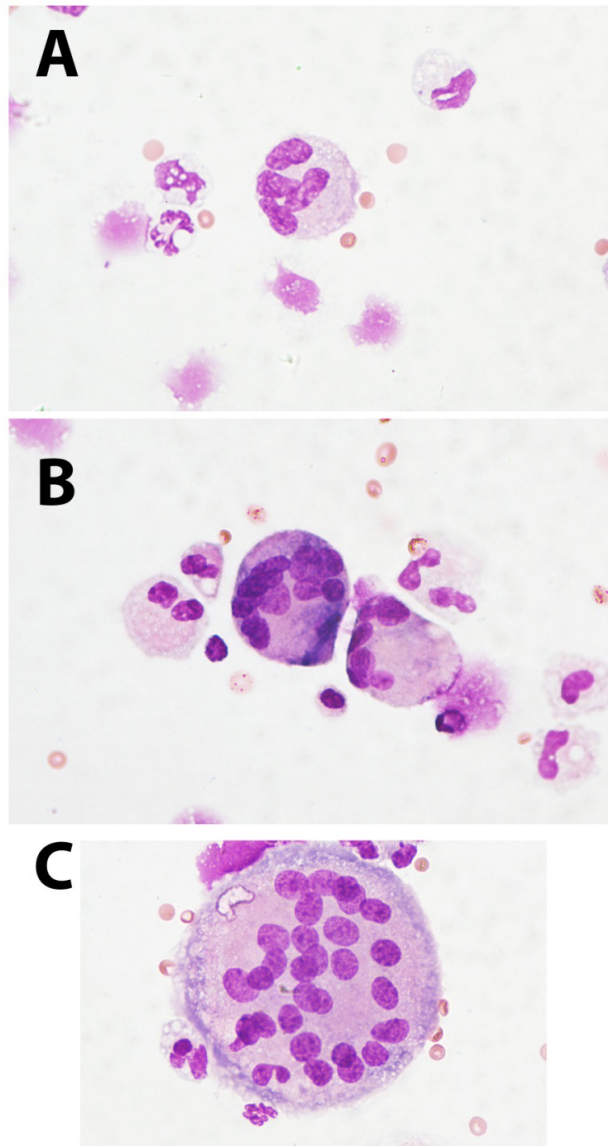
Grafikon 28. Relativna celularnost u eksudatu dobijenog iz sunđera implantiranih u miševa sa delecijom *Mif* gena (*Mif*^{-/-}) i kontrolnog divljeg soja (*Mif*^{+/+}) miševa u kasnoj fazi inflamacije.

Stubići predstavljaju srednje vrednosti broja inflamacijskih ćelija izraženih po mililitru eksudata ($\bar{X} \pm SD$ za po 6 životinja u grupi).

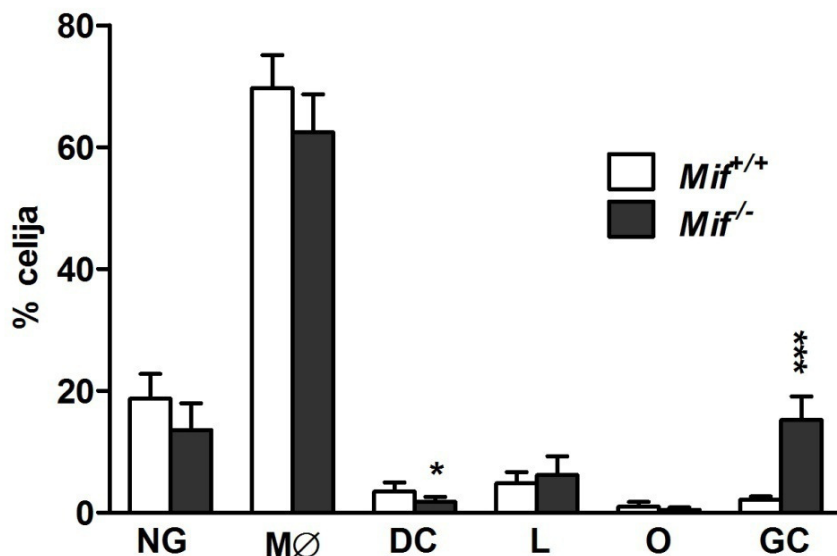
** $p < 0.01$ u odnosu na kontrolni soj *Mif*^{+/+} miševa

4.4.3 Sastav inflamacijskih ćelija

Analizom citospin preparata inflamacijskih ćelija zapaženo je da u oba soja miševa dominiraju makrofagi, a zatim neutrofilni granulociti. Međutim, relativne vrednosti ovih ćelija se međusobno nisu statistički značajno razlikovale. Razlika nije zapažena ni kada su analizirane relativne vrednosti limfocita i ćelija koje po morfološkim karakteristikama podsećaju na dendritske ćelije. Međutim procentualne vrednosti džinovskih makrofaga ($15.2 \pm 3.9\%$) u miševa sa delecijom *Mif* gena su bile statistički značajno veće u odnosu na kontrolni divlji soj ($2.2 \pm 0.5\%$) ($p < 0.001$).. (Grafikon 29; slika 4A, B i C)



Slika 4. Morfološki izgled džinovskih makrofaga u kasnoj fazi inflamacije. Broj džinovskih makrofaga kod *Mif*^{+/+} miševa (A) je manji u odnosu na *Mif*^{-/-} miševa (B). Ekstremno veliki džinovski makrofag sa preko 25 jedara u eksudatu *Mif*^{-/-} miševa (C).

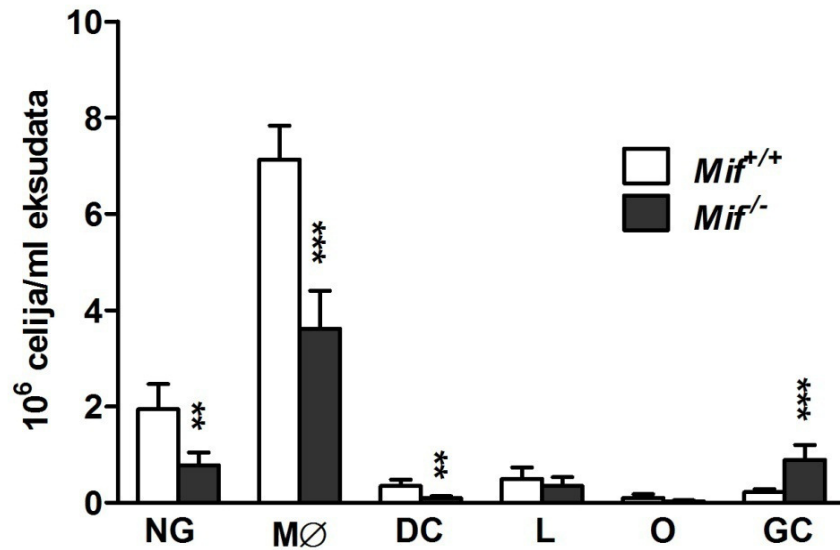


Grafikon 29 Relativna zastupljenost ćelijskih elemenata u eksudatu dobijenog iz sundera implantiranih u miševa sa delecijom *Mif* gena (*Mif*^{-/-}) i kontrolnog divljeg soja (*Mif*^{+/+}) miševa u kasnoj fazi inflamacije.

Stubići predstavljaju srednje vrednosti procenta neutrofilnih granulocita (NG), makrofaga (MØ), dendritskih ćelija (DĆ), limfocita (L), džinovskih (gigantocelularnih) (GC) makrofaga i ostalih morfološki jasno ne-definisanih ćelija (O)±SD za n=6 miševa po grupi.

*p<0.05; ***p<0.001 u odnosu na odgovarajuće vrednosti kod kontrolnog soja *Mif*^{+/+} miševa

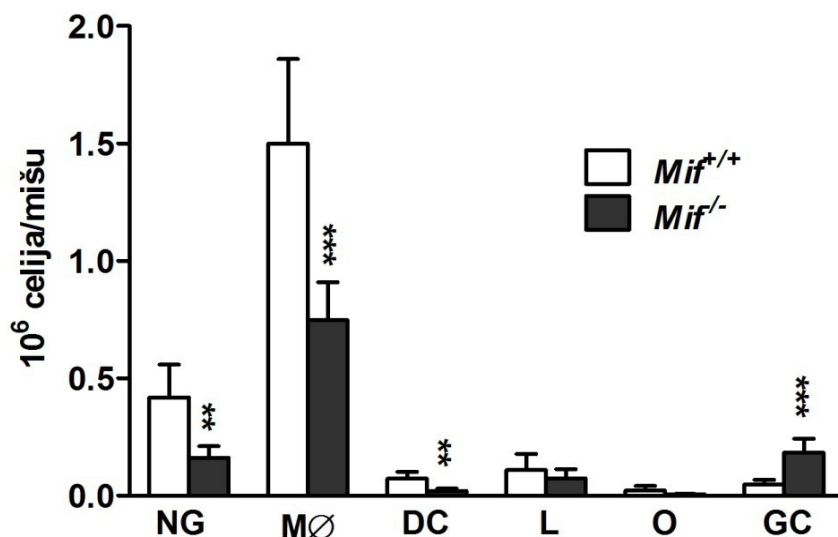
Kada je analiziran ukupan broj ovih ćelija izražen po mililitru eksudata (Grafikon 30) ili kada je izvršeno preračunavanje ukupnog broja ćelija po mišu (Grafikon 31) dobijeni su drugačiji rezultati. Naime, u *Mif*^{-/-} miševa je dobijen značajno manji broj neutrofilnih granulocita, makrofaga i dendritskih ćelija u odnosu na divlji soj miševa. Međutim, ukupan broj džinovskih makrofaga je bio statistički značajno veći bez obzira na način njihovog preračunavanja.



Grafikon 30. Ukupan broj subpopulacija ćelija u eksudatu dobijenog iz sundera implantiranih u miševa sa delecijom *Mif* gena (*Mif*^{-/-}) i kontrolnog divljeg soja (*Mif*^{+/+}) miševa u kasnoj fazi inflamacije.

Stubići predstavljaju srednje vrednosti broja neutrofilnih granulocita (NG), makrofaga (MØ), dendritskih ćelija (DĆ), limfocita (L), džinovskih (gigantocelularnih) (GC) makrofaga i ostalih morfološki jasno ne-definisanih ćelija (O)±SD izraženog po mililitru eksudata za n=6 miševa po grupi.

p<0.01;*p<0.001 u odnosu na odgovarajući broj ćelija kod kontrolnog soja *Mif*^{+/+} miševa



Grafikon 31. Ukupan broj subpopulacija ćelija u eksudatu dobijenog iz suđera implantiranih u miševa sa delecijom *Mif* gena (*Mif*^{-/-}) i kontrolnog divljeg soja (*Mif*^{+/+}) miševa u kasnoj fazi inflamacije.

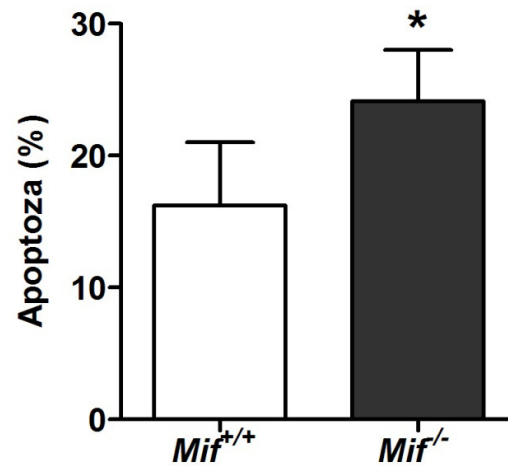
Stubići predstavljaju srednje vrednosti broja neutrofilnih granulocita (NG), makrofaga (MØ), dendritskih ćelija (DĆ), limfocita (L), džinovskih (gigantocelularnih) (GC) makrofaga i ostalih morfološki jasno ne-definisanih ćelija (O)±SD izraženog po mišu (n=6 miševa po grupi).

p<0.01; *p<0.001 u odnosu na broj NG kod kontrolnog soja *Mif*^{+/+} miševa

4.4.4 Apoptoza

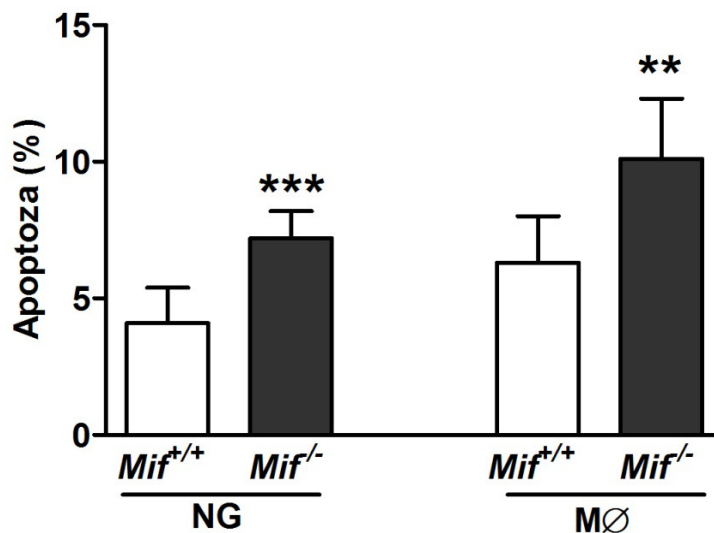
Apoptoza je određivana na osnovu morfološke analize ćelija izolovanih iz suđera, koje su zatim obojene rastvorom Türka. Na grafikonu 32 se vidi da je u *Mif*^{-/-} miševa % apoptoze ukupnih inflamacijskih ćelija povećan u odnosu na kontrolni divlji soj (p<0.05).

Radi identifikacije apoptotičnih granulocita i apoptotičnih makrofaga, analiza je vršena na citospin preparatima. Grafikon 33 pokazuje veći procenat apoptoze, kako neutrofilnih granulocita (p<0.001) tako i makrofaga (p<0.01) u *Mif*^{-/-} miševa u odnosu na *Mif*^{+/+} miševe.



Grafikon 32. Procenat apoptoze ćelija u kasnoj fazi inflamacije

Nakon izolacije iz implantiranih sunđera, ćelije su obojene rastvorom Türka, a zatim je određen % apoptoze na osnovu morfoloških kriterijuma. Analizirano je najmanje 500 ćelija u svakom uzorku. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za n=5 miševa po grupi. *p<0.05



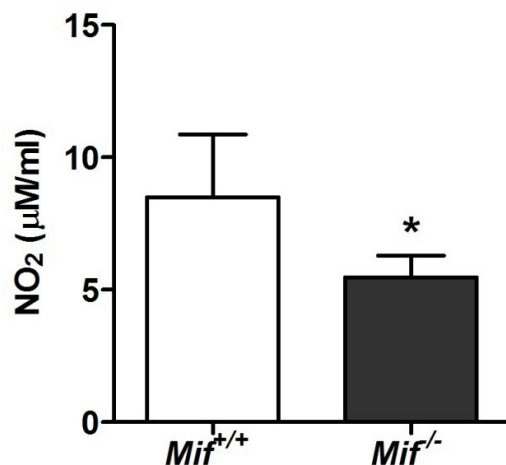
Grafikon 33. Procentualne vrednosti apoptotskih neutrofilnih granulocita i apoptotskih makrofaga u kasnoj fazi inflamacije identifikovanih morfološkom analizom.

Citospinovi inflamacijskih ćelija iz eksudata su obojeni pomoću MGG. Na svakom preparatu (n=5 po grupi) je izbrojano po 500 neutrofilnih granulocita, odnosno makrofaga, nakon čega su izračunati procenti ovih ćelija sa morfološkim karakteristikama apoptoze. Stubići predstavljaju srednje vrednosti procenta apoptotskih ćelija \pm SD za n=5 miševa po grupi.

p<0.01;*p<0.001 u odnosu na odgovarajuće vrednosti kod kontrolnog soja *Mif*^{+/+} miševa

4.4.5 *Produkcija NO in vivo*

Produkcija NO u eksudatu je određivana indirektno na osnovu koncentracije nitrita. Grafikon 34 pokazuje statistički značajno niži nivo NO₂ u eksudatu *Mif*^{-/-} miševa (p<0.05) u odnosu na kontrolni soj miševa.



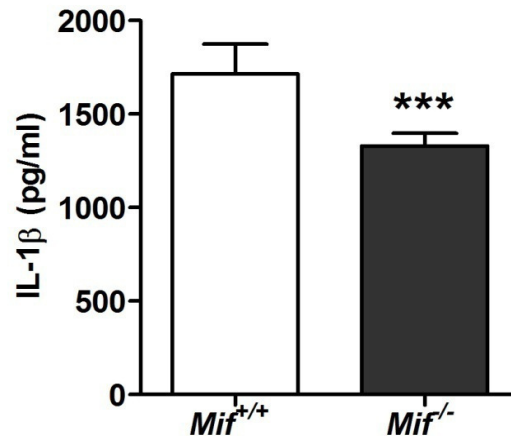
Grafikon 34. Koncentracija NO₂ u eksudatu suđera u kasnoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 10. dana posle implantacije suđera u miševe, nakon čega je određena koncentracija NO₂ kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za n=5 (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno n=6 za *Mif*^{-/-} miševe

*p<0.05 u poređenju sa kontrolom (nivo IL-1 β u eksudatu *Mif*^{+/+} miševa)

4.4.6 *Produkcija citokina in vivo*

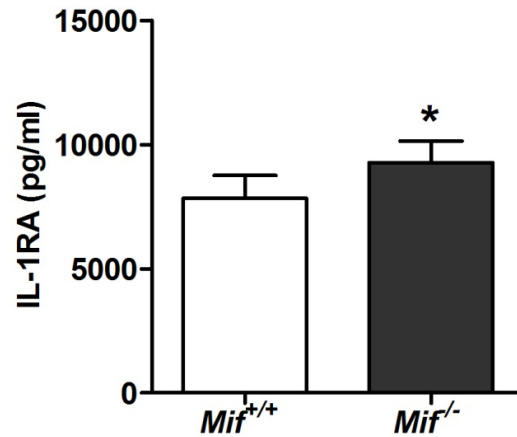
U eksudatu iz suđera je određen nivo citokina kao i u ranoj fazi. U miševa sa delecijom *Mif* gena nivoi IL-1 β (1329 \pm 69.58 pg/ml) su bili statistički značajno niži u odnosu na vrednosti ovog citokina u eksudatu divljeg soja miševa (1715 \pm 160.2 pg/ml), i to smanjenje je bilo izrazitije nego u ranoj fazi inflamacije (p<0.001) (grafikon 35). Međutim, suprotno rezultatima dobijenih u ranoj fazi, vrednosti IL-RA su kod *Mif*^{-/-} miševa (9275 \pm 871.4 pg/ml), bile statistički značajno veće (p<0.05) u odnosu na vrednosti kod divljeg soja miševa (7827 \pm 924.2 pg/ml) grafikon 36. S druge strane, vrednosti TNF- α , se nisu statistički značajno razlikovale (grafikon 37).



Grafikon 35. Nivoi IL-1 β u eksudatu sundera u kasnoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 10. dana posle implantacije sundera u miševе, nakon čega je određena koncentracija IL-1 β ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševе

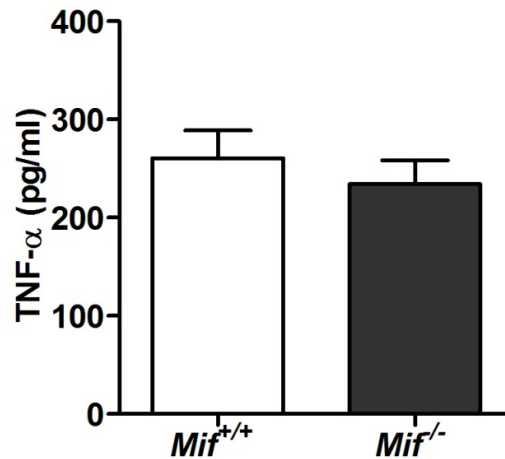
*** $p < 0.001$ u poređenju sa kontrolom (nivo IL-1 β u eksudatu *Mif*^{+/+} miševa)



Grafikon 36. Nivoi IL-1RA u eksudatu sunđera u kasnoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 10. dana posle implantacije sunđera u miševe, nakon čega je određena koncentracija IL-1RA ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševe

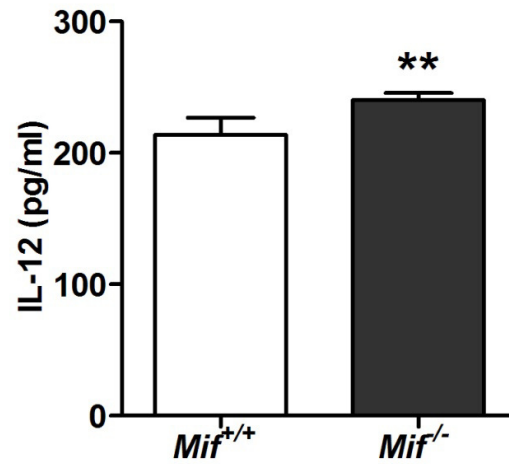
* $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolom (nivo IL-1RA u eksudatu *Mif*^{+/+} miševa)



Grafikon 37. Nivoi TNF- α u eksudatu suđera u kasnoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 10. dana posle implantacije suđera u miševe, nakon čega je određena koncentracija TNF- α ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševe

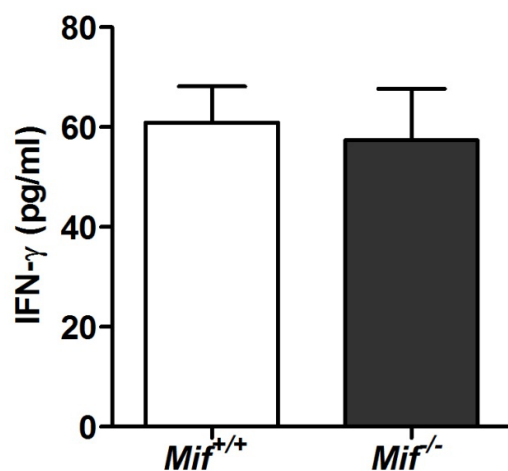
Koncentracije IL-12, su suprotno rezultatima u ranoj fazi inflamacije bile statistički značajno veće ($p < 0.01$). u miševa sa delecijom *Mif* gena (240.2 ± 5.29 pg/ml), u odnosu na divlji soj (213.7 ± 13.22 pg/ml) (Grafikon 38). Međutim, neočekivano, razlike u vrednostima IFN- γ (57.39 ± 10.32 pg/ml) kod *Mif*^{-/-} miševa i (60.88 ± 7.29 pg/ml) kod *Mif*^{+/+} miševa nisu bile statistički značajne (Grafikon 39)



Grafikon 38. Nivoi IL-12 u eksudatu sunđera u kasnoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 10. dana posle implantacije sunđera u miševе, nakon čega je određena koncentracija IL-12 ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševе

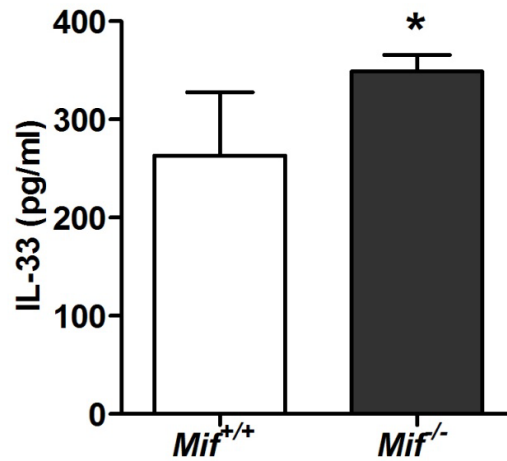
** $p < 0.01$ u poređenju sa kontrolom (nivo IL-12 u eksudatu *Mif*^{+/+} miševa)



Grafikon 39. Nivoi IFN- γ u eksudatu sundera u kasnoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 10. dana posle implantacije sundera u miševе, nakon čega je određena koncentracija IFN- γ ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševе

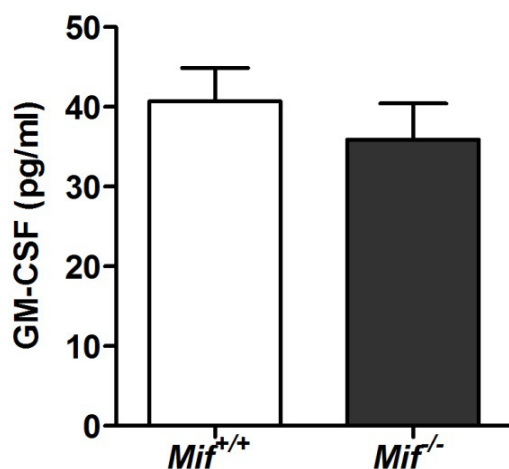
Slično kao u ranoj fazi inflamacije, koncentracije IL-33 u eksudatu miševa sa delecijom *Mif* gena su bile statistički značajno veće (348.8 ± 17.01 pg/ml) u odnosu na divlji soj (263.0 ± 64.69 pg/ml) ($p < 0.05$) (Grafikon 40). Međutim, koncentracije GM-CSF-a se nisu statistički značajno razlikovale između ispitivanih sojeva miševa (Grafikon 41).



Grafikon 40. Nivoi IL-33 u eksudatu sunđera u kasnoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 10. dana posle implantacije sunđera u miševе, nakon čega je određena koncentracija IL-33 ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševе

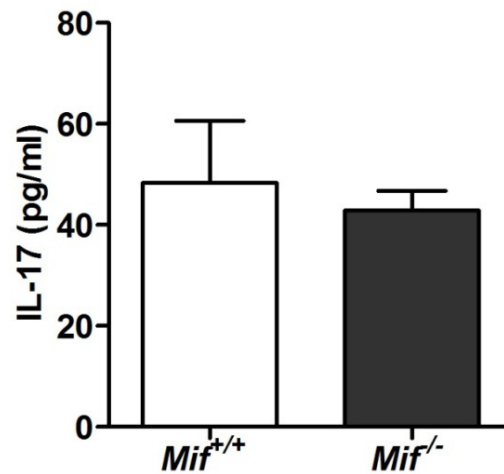
* $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolom (nivo IL-33 u eksudatu *Mif*^{+/+} miševa)



Grafikon 41. Nivoi GM-CSF u eksudatu sundera u kasnoj fazi inflamacije

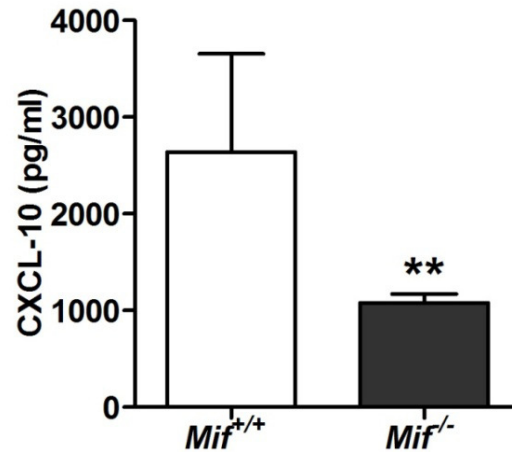
Eksudat je izolovan 10. dana posle implantacije sundera u miševе, nakon čega je određena koncentracija GM-CSF ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševе

Slično rezultatima dobijenih u ranoj fazi inflamacije, nisu uočene statistički značajne razlike u nivoima IL-17 Grafikon 42. Međutim, za razliku od rane faze, vrednosti koncentracija CXCL-10 u *Mif*^{-/-} miševa (1078 ± 91.67 pg/ml) su bile izrazito niže u odnosu na *Mif*^{+/+} miševе (2638 ± 1017 pg/ml) ($p < 0.01$) (Grafikon 43) Takođe su i vrednosti CRP u miševa sa delecijom *Mif* gena bile niže u poređenju sa vrednostima u divljeg soja ($p < 0.05$) (Grafikon 44).



Grafikon 42. Nivoi IL-17 u eksudatu sunđera u kasnoj fazi inflamacije

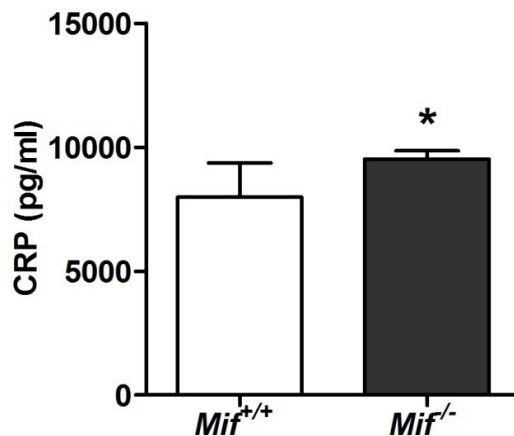
Eksudat je izolovan 10. dana posle implantacije sunđera u miševe, nakon čega je određena koncentracija IL-17 ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševe



Grafikon 43. Nivoi CXCL-10 u eksudatu suđera u kasnoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 10. dana posle implantacije suđera u miševe, nakon čega je određena koncentracija CXCL-10 ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševe

** $p < 0.01$ u poređenju sa kontrolom (nivo CXCL-10 u eksudatu *Mif*^{+/+} miševa)



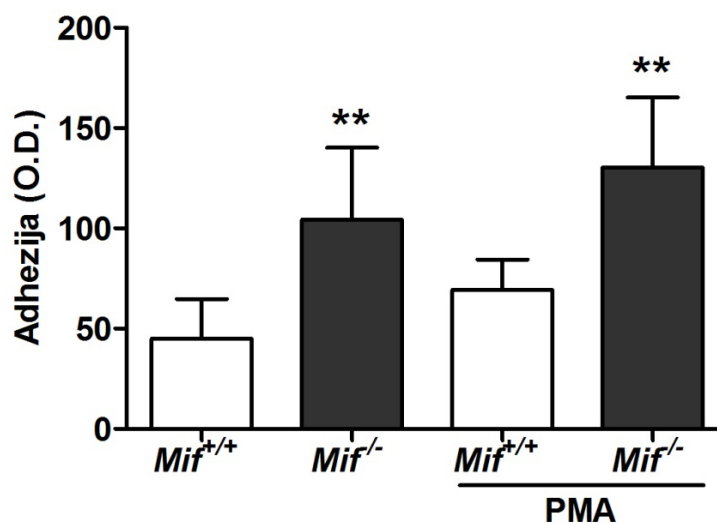
Grafikon 44. Nivoi CRP u eksudatu sunđera u kasnoj fazi inflamacije

Eksudat je izolovan 10. dana posle implantacije sunđera u miševе, nakon čega je određena koncentracija CRP ELISA metodom kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju $\bar{X} \pm SD$ za $n=5$ (*Mif*^{+/+} miševi) odnosno $n=6$ za *Mif*^{-/-} miševе

* $p < 0.05$ u poređenju sa kontrolom (nivo CRP u eksudatu *Mif*^{+/+} miševa)

4.4.7 Adhezija inflamacijskih ćelija *in vitro*

Kao i u ranoj fazi, adhezija inflamacijskih ćelija u *Mif*^{-/-} miševa u kulturi je bila statistički značajno veća u odnosu na inflamacijske ćelije izolovane iz sunđera kontrolnih *Mif*^{+/+} miševa ($p < 0.01$). Takođe, stimulacija inflamacijskih ćelija sa PMA je dovela do povećane adhezivnosti inflamacijskih ćelija kod oba soja, ali je adhezija ćelija u miševa sa delecijom *Mif* gena i dalje bila veća nego kod divljeg soja miševa ($p < 0.01$) (Grafikon 45).

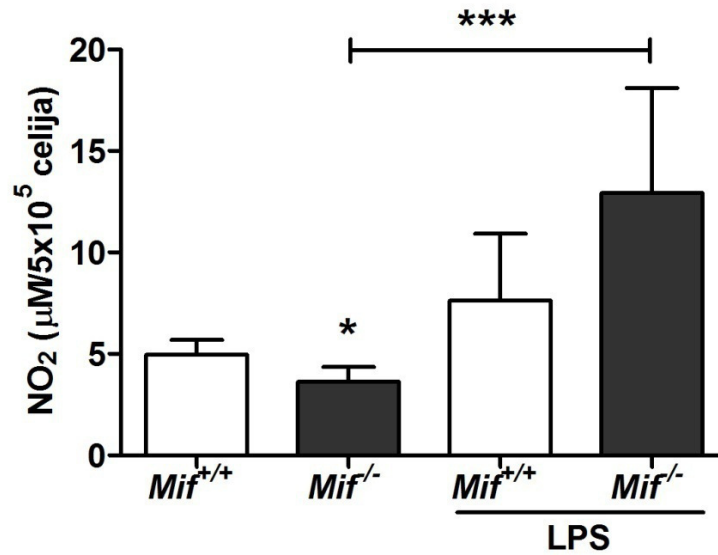


Grafikon 45. Adhezija inflamacijskih ćelija u kasnoj fazi inflamacije *in vitro*

Inflamacijske ćelije su izolovane iz suđera 10. dana nakon implantacije u miševe, a zatim zasađene u plastične ploče sa ravnim dnom sa 96 bazena (2×10^5 ćelija/bazenu) kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stimulacija je vršena pomoću PMA. Stubići predstavljaju srednje vrednosti optičke gustine (O.D.) ($\bar{X} \pm SD$) za $n=5$ životinja u grupi. $**p < 0.01$

4.4.8 *Produkcija NO u kulturi*

Inflamacijske ćelije su kultivisane sa i bez LPS-a, a nakon 24 časa je određena koncentracija NO_2 u supernatantima kultura. Koncentracija NO_2 je bila statistički značajno niža u supernatantima kultura ćelija izolovanih iz eksudata *Mif*^{-/-} miševa ($p < 0.05$). Dodavanje LPS-a nije bitnije uticalo na koncentraciju NO_2 u kulturi ćelija *Mif*^{+/+} miševa, ali je dovelo do povećanja koncentracije NO_2 u kulturi ćelija *Mif*^{-/-} miševa u odnosu na nestimulisane ćelije ($p < 0.01$). Slično kao u ranoj fazi, nisu uočene statistički značajne razlike u produkciji NO između stimulisanih kultura *Mif*^{-/-} i *Mif*^{+/+} miševa (Grafikon 46)



Grafikon 46. Produkcija NO₂ od strane inflamacijskih ćelija u kasnoj fazi inflamacije *in vitro*

Inflamacijske ćelije su izolovane iz suđera 10. dana nakon implantacije u miševе, a zatim zasađene u plastične ploče sa ravnim dnom sa 96 bazena (2 x 10⁵ ćelija/bazenu) u prisustvu ili odsustvu LPS-a. Nakon 24 časa supernatanti su sakupljeni i određivana je koncentracija NO₂ kako je opisano u poglavlju Materijal i metode. Stubići predstavljaju srednje vrednosti koncentracije NO₂ ($\bar{X} \pm SD$) za n=5 životinja u grupi

*p<0.05; ***p<0.001

5 DISKUSIJA

Cilj ove studije je bio da se ispituju karakteristike u toku inflamacijske reakcije u *Mif* deficijentnih miševa nakon subkutane implantacije polivinilskih sunđerica, a u cilju razumevanja uloge MIF-a kao plejotropnog citokina u procesima nesterilne inflamacije i tkivne regeneracije.

Pre započinjanja eksperimenta bilo je neophodno da se ispituju osnovne biološke karakteristike ovog soja i uporede sa kontrolnim, divljim sojem C57BL/6 miševa, o čemu postoje oskudni podaci u literaturi. Naši rezultati pokazuju da *Mif*^{-/-} miševi imaju tamnije prebojenu kožu u odnosu na kontrolni soj, što se može objasniti multiplim efektima MIF-a na brojne funkcije kože (Gilliver i sar., 2011), uključujući verovatno i sintezu melanina u dlaci, o čemu nema publikovanih podataka. Takođe, *Mif*^{-/-} ženke su fertilnije, a zabeležen je i brži postnatalni razvoj mladunaca, koji je bio izraženiji kod ženki. Objašnjenje se može tražiti u već dokazanoj povezanosti MIF-a sa neuroendokrinim sistemom (Gilliver i sar., 2011). Odavno je pokazano da u odraslih žena koncentracije MIF-a u serumu negativno koreliraju sa nivoom testosterona, dok su u muškaraca nivoi testosterona i MIF-a u pozitivnoj korelaciji (Aloisi i sar., 2005; Mizue i sar., 2000). Primena testosterona dovodi do povećane sekrecije MIF-a kod pacova mužjaka (Hedger i sar., 2005). Nivo MIF-a u tkivu kolona se smanjuje nakon ovarijektomije u pacova i ponovo se povećava primenom progesterona i estrogena (Houdeau i sar., 2007). Na molekularnom nivou MIF koaktivira androgeni receptor (Berndt i sar., 2008). Glukokortikoidi u malim dozama indukuju MIF (Leng i sar., 2009), dok estradiol suprimira ekspresiju MIF-a (Hsieh i sar., 2007). Svi ovi nalazi mogu biti od značaja za naše nalaze, iako povezanost MIF-a (kontrolni soj miševa) i odsustvo MIF-a (*Mif*^{-/-} soj) u prepubertetskom periodu tek treba da se dodatno ispita. Svakako da ove nalaze treba uzimati u obzir pri interpretaciji naših ključnih ekspeimenata koji su urađeni na ženkama.

Ključni rezultati ovog istraživanja pokazuju da je u *Mif*^{-/-} miševa inflamacijska reakcija nakon subkutane implantacije polivinilskih sunđerica smanjena, što je u saglasnosti sa rezultatima koji su dobijeni na drugim modelima

inflamacije i koji zajedno potvrđuju važnu ulogu MIF-a u stimulaciji zapaljenskih procesa (Morand i sar., 2006; Santos i sar., 2011).

Smanjenje inflamacije u našem eksperimentalnom modelu kod miševa sa delecijom *Mif* gena je bilo posledica smanjenja broja inflamacijskih ćelija (neutrofilnih granulocita u ranoj fazi; smanjenja broja neutrofilnih granulocita i makrofaga u kasnoj fazi inflamacije, izmene u njihovim funkcijama i promena lokalnog citokinskog miljea.

Santos i sar. (2011) su pokazali u *Mif*-deficijentnih miševa smanjenje zapaljenjskih procesa na modelu artritisa koje je bilo rezultat smanjenja migracije neutrofila u zglobove. Migracija neutrofila u ovih miševa je bila smanjena kako in vivo tako i in vitro u odgovoru na KC hemokin, iako ekspresija hemokinskog receptora (CXCR2) nije bila bitnije promenjena. Ovi procesi su bili praćeni smanjenom fosforilacijom p38 i ERK kinaza što upućuje na zaključak da MIF olakšava intracelularnu signalizaciju u odgovoru na hemokine.

Ovi nalazi potvrđuju da je jedan od mehanizama pro-inflamacijskog delovanja MIF-a povezan sa povećanjem hemotakse neutrofila na mesto inflamacije. To dodatno potkrepljuju istraživanja (Takahashi i sar., 2009) koji su pokazali da intratrahealna aplikacija MIF-a dovodi do povećanja ekspresije KC, značajnog hemokina uključenog u migraciju neutrofila. Na sličnom modelu Makita i sar. (1998) Makita i saradnici 1998 su pokazali da anti-MIF antitela smanjuju nakupljanje neutrofila u plućima pod uticajem LPS-a. U skladu sa tim, u *Mif* transgenih miševa je bila povećana migracija neutrofila na modelu eksperimentalnog kolitisa (Ohkawara i sar., 2005).

Ostali opisani mehanizmi kojima MIF podstiče migraciju neutrofila na mesto inflamacije uključuje povećano oslobađanje MCP-1 (CCL2) hemokina sa površine endotelnih ćelija i sledstvenu adheziju i hemotaksu leukocita interakcijom CCL2 sa CXCR2 i CXCR4 (Gregory i sar., 2006). MIF je bitan za migraciju monocita na mesto inflamacije. Zapravo, njegova uloga je i otkrivena korišćenjem modela reakcije kasne preosetljivosti u miša u kojoj je MIF dovodio do lokalnog nakupljanja makrofaga. Suprotno tome, primena anti-MIF antitela u tkivu nakon aplikacije tuberkulina je u potpunosti blokirala reakciju kasne preosetljivosti i nakupljanje makrofaga (Shimizu, 2005). Međutim, u našem eksperimentalnom

modelu na *Mif*^{-/-} miševima incijalna migracija monocita u implantirani sunder nije bila znatno promenjena, na osnovu čega se može pretpostaviti da MIF nije od ključnog značaja za ranu migraciju monocita, ali je značajan za kasnu fazu inflamacije u kojoj je kod *Mif*^{-/-} miševa nađeno izrazito smanjenje kako broja neutrofila tako i broja makrofaga. Jedan od mehanizama kojima bi MIF mogao smanjivati migraciju monocita na mesto inflamacije i koja je inhibirana u *Mif* deficijentnih miševa je stimulacija kotrljanja ovih ćelija po endotelu P-selektin zavisnim mehanizmima (Gregory i sar., 2006).

Skorašnji nalazi takođe potvrđuju bitnu ulogu MIF-a u migraciji monocita na mesto inflamacije. Fan i sar. (2011) su pokazali da je hemotaksa monocita pod delovanjem CCL2 hemokina bila znatno smanjena kako kod *Mif* deficijentnih miševa, tako i kod *CD74*^{-/-} miševa. Ranije je istaknuto da je *CD74* jedan od receptora za MIF. Smanjenje hemotakse monocita je bilo povezano sa smanjenom fosforilacijom MAPK i smanjenjem RhoA GTP-azne aktivnosti.

Naši nalazi pokazuju da je u kasnoj fazi inflamacije u *Mif*^{-/-} miševa nađen i manji broj dendritskih ćelija. Ove ćelije koje su identifikovane samo na osnovu morfoloških kriterijuma, čine značajnu populaciju antigen-prezentujućih ćelija, koje dominantno imaju tolerogeni potencijal (Vasilijic i sar., 2005). Ostaje da se ispita u narednim istraživanjima da li je i u kom obimu MIF značajan i za migraciju prekursora dendritskih ćelija, a koliko je bitan za procese lokalne, tkivne diferencijacije dendritskih ćelija.

Adhezija neutrofila za plastiku *in vitro* kako nestimulisanih tako i stimulisanih sa PMA, koji su izolovani iz sundera *Mif* deficijentnih miševa u ranoj fazi inflamacije je bila izraženija u odnosu na neutrofile kontrolnog divljeg soja miševa što je takođe neočekivani fenomen, ako se pretpostavi da MIF stimuliše adhezivne mehanizme (Morand i sar., 2006). Poznato je da je adhezija neutrofila za plastiku zavisna od integrina (Draskovic-Pavlovic i sar., 1999) na osnovu čega se može pretpostaviti da u *Mif*^{-/-} miševa granulociti ili više ekspimiraju integrine ili je povećana njihova konverzija iz neaktivne u konformaciono aktivne forme adhezivnih molekula. Ovakva pretpostavka nije potkrepljena nalazima Santos i sar. (2011), koji nisu detektovali promenu ekspresije *CD11a* i *CD11b* ($\beta 2$ integrina) na neutrofilima *Mif*^{-/-} miševa. Razlike se mogu tumačiti time što su Santos i sar. 2011

analizirali neutrofilne granulocite iz krvi a mi smo koristili granulocite iz tkivnog eksudata. Poznato je da se fenotipske karakteristike mirujućih i aktivisanih neutrofila značajno razlikuju uključujući i ekspresiju integrina na njihovoj membrani (Draskovic-Pavlovic i sar., 2012).

Apoptoza neutrofilnih granulocita je jedan od ključnih mehanizama u zaustavljanju inflamacijskih procesa. Kao što je u uvodu istaknuto neutrofilni su kratkoživeće ćelije kod kojih su u terminalnoj fazi diferencijacije već programirani procesi apoptoze (McCracken i sar., 2014). Na mestu inflamacije ovi procesi su inicijalno odloženi, a nakon fagocitoze mikroorganizama i stvaranjem reaktivnih kiseoničkih radikala oni ponovo bivaju aktivirani (Kobayashi i sar., 2003). Odložena apoptoza neutrofila na mestu inflamacije je od ključnog značaja za eliminaciju patogenih mikroorganizama (El Kebir i sar., 2013).

Apoptoza neutrofila je genski programiran proces koji uključuje spoljašnji i unutrašnji put aktivacije. Spoljašnji put se aktivira preko membranskih receptora kao što su Fas ligand, TNF- α ili TRAIL. Unutrašnji put je posredovan pro-apoptotskim molekulima koji se oslobađaju iz mitohondrija nakon pucanja mitohondrijalnih membrana.

Kod neutrofila spoljašnji put apoptoze je slabije izražen i uključuje aktivaciju kaspaze 8 i kaspaze 9 (kaspaze inicijatori), koje zatim aktiviraju kaspazu 3, (kaspaza efektor), kaspaza 3 je odgovorna za brojne morfološke i funkcionalne promene koje se dešavaju tokom apoptoze. Unutrašnji put je posredovan sa dva pro-apoptotska molekula u mitohondrijama iz Bcl-2 porodice (Bax i Bak) koji, kad se ugrade u membranu mitohondrija, dovode do njenog pucanja i oslobađanja citohroma C, Smac/DIABLO i HtrA2/Omi molekula iz mitohondrija u citosol. Zajedno sa APAF molekulom, citohrom C aktivira kaspazu 9. Kontrolu ovih molekula, a time i inhibiciju apoptoze vrše Mcl i A1 članovi Bcl2 proteina. Druga grupa regulatora uključuje IAP molekule (koji inhibiraju kaspaze i molekule iz ciklin zavisnih kaspaza) mijeloidni diferencijacioni antigen i druge faktore (Korsmeyer i sar., 2000; McCracken i sar., 2014). Za razliku od ostalih ćelija, ova dva puta apoptoze se kod neutrofila preklapaju pri čemu spoljašnji put pomaže aktivaciju unutrašnjeg puta aktivacije. Treći mehanizam podrazumeva apoptozu koja je indukovana fagocitozom (McCracken i sar., 2014).

Apoptoza neutrofila, slično apoptozi drugih ćelija, je praćeno karakterističnim morfološkim promenama (zgušnjavanjem citoplazme, kondenzacijom hromatina, fragmentacijom jedra i formiranjem apoptotskih tela koja se procesom egzocitoze izbacuju iz ćelija (Taylor i sar., 2008). Ovim promenama prethodi translokacija fosfatidil-serina sa unutrašnje na spoljašnju membranu, koga prepoznaju receptori čistači na makrofagima. Fagocitoza apoptotskih neutrofila od strane makrofaga (eferocitoza) predstavlja jedan od ključnih mehanizama rezolucije (zaustavljanje) inflamacije (Bratton i sar., 2011). Za fosfatidil-serin se veže Aneksin V što je iskorišćeno u kreiranju metode za detekciju i kvantifikaciju apoptotskih ćelija. Ova metoda je korišćena takođe u našem radu za kvantifikaciju apoptoze neutrofila. Obzirom da translokacija fosfatidil-serina na spoljšnju membranu prethodi morfološkim promenama, nije iznenađujuće što smo ovom metodom našli veći procenat apoptotskih neutrofila nego što je dobijeno morfološkom kvantifikacijom.

MIF je poznat anti-apoptotski molekul ali njegov uticaj na apoptozu neutrofila nije dovoljno rasvetljen. U radu Baumana i sar (2003) je pokazano da rekombinantni MIF inhibira apoptozu neutrofila periferne krvi in vitro na vremenski i dozno zavisni način. Ovo dejstvo MIF-a se ostvaruje sprečavanjem proteolitičke razgradnje Bid-a i Bax-a, kao i oslobađanja citohroma C i Smac molekula iz mitohondrija, što je praćeno inhibicijom aktivnosti kaspaze-3. Ovi nalazi ukazuju da je MIF jedan od citokina koji pospešuju preživljavanje neutrofila što može biti značajno za oštećenje tkiva kod hroničnih infektivnih bolesti.

Pokazano je da MIF inhibira apoptozu makrofaga preko inhibicije p53, ključnog anti-apoptotskog molekula (Mitchell i sar., 2002). Inhibicija tumor supresorskog onkogeno p53 od strane MIF-a smatra se jednim od ključnih procesa u regulaciji normalnog ćelijskog rasta i uključuje kaskadnu aktivaciju ERK1/ERK2, PLA2, ciklooksigenaze 2 (COX2) i prostaglandina E₂ (PGE₂) (Salminen i sar., 2011). Smatra se da bi nedostatak MIF-a mogao biti jedan od ključnih faktora povećane monocitno/makrofagne apoptoze kod *Mif* deficijentnih miševa nakon stimulacije LPS-om u poređenju sa divljim sojevima što potvrđuje i naše istraživanje. Pretpostavlja se da bi glavni medijator apoptoze u ovom slučaju mogao da bude NO (Mitchell i sar., 2002). Naši nalazi o smanjenoj apoptozi makrofaga i neutrofila u kasnoj fazi inflamacije u miševa sa delecijom *Mif* gena su u saglasnosti

sa ovim nalazima. Sličan efekat je zabeležen analizom apoptoze neutrofila u ranoj fazi inflamacije ali je suprotan efekat dobijen analizom neutrofila *ex vivo*. Razlozi za ovakav negativan nalaz mogu biti mnogobrojni. Prvo treba istaći da je maksimalno nakupljanje neutrofilnih granulocita u sunder koji najizrazitije u prva 24 časa nakon čega dolazi do izrazitije migracije monocita. Moguće je da u *Mif*-deficijentnih miševa, u kojih postoji smanjena migracija neutrofila, postoji potreba za njihovim produženim preživljavanjem kao kompenzatornim mehanizmom. Ako je ova pretpostavka tačna postavlja se pitanje da li je to direktno ili indirektno delovanje MIF-a. Poznato je da brojni pro-inflamacijski medijatori dovode do produženog preživljavanja neutrofila na mestu zapaljenja kao što su IL-1 β , IL-6, TNF- α u niskoj koncentraciji i GM-CSF. Takođe, glukokortikoidi, koji se pojačano izlučuju u sklopu stresa prouzrokovanog inflamacijom, produžavaju život neutrofila (inhibicija apoptoze), za razliku od njihovog pro-apoptotskog efekta na limfocite. Sa druge strane, MIF suprimira anti-inflamacijske efekte glukokortikoida (Leech i sar., 1999).

Nedostatak MIF-a u *Mif*^{-/-} miševa može povećati efekte glukokortikoida a time i njihov anti-apoptotski efekat. Od proinflamacijskih citokina u *Mif*^{-/-} miševa jedino je bio povećan nivo GM-CSF-a u ranoj fazi inflamacije, zbog čega se može pretpostaviti da ovaj faktor rasta takođe doprinosi povećanom preživljavanju neutrofila *in vivo*. IL-6, koji je značajan anti-apoptotski molekul za neutrofilne granulocite (nije određivan u ovom radu) verovatno ima manji značaj s obzirom da je nivo CRP-a (reaktanta akutne faze čija je sinteza pod direktnim uticajem IL-6) bio nepromenjen u odnosu na divlji soj miševa. Interesantno, u kasnoj fazi inflamacije u *Mif*^{-/-} miševa u kojoj preovlađuju anti-inflamacijski citokini (IL-1RA, IL-33), nivo pojedinih pro-inflamacijskih citokina (TNF- α i GM-CSF) je normalizovan, dok je nivo CRP-a bio povećan, što upućuje na kompleksnost citokina i drugih biomolekula u *Mif* deficijentnih miševa u regulaciji procesa apoptoze inflamacijskih ćelija. Zbog svega navedenog, ovi rezultati pružaju osnovu za buduća istraživanja uloge MIF-a u procesima apoptoze inflamacijskih ćelija.

Ovaj problem je od velikog značaja jer je povećana apoptoza neutrofila praćena smanjenjem njihovog nakupljanja na mestu inflamacije, povećanim stepenom eferocitoze, stimulacijom tranzicije M1 u M2 makrofage i povećanjem rezolucije inflamacije (El Kebir i sar., 2013). Svi ovi parametri su indirektno bili

izraženiji u *Mif*^{-/-} deficijentnih miševa u kasnoj fazi inflamacije, što dodatno govori u prilog lokalnog anti-inflamacijskog miljea kod ovih miševa.

Jedan od značajnih nalaza u ovom istraživanju se odnosi na povećanje broja džinovskih makrofaga u miševa sa delecijom *Mif* gena. Kao što je ranije naglašeno formiranje džinovskih makrofaga je tipična karakteristika tkivne reakcije na strano telo (u našem eksperimentu to su implantirani polivinilski sunđer) i ona je najizraženija u drugoj i trećoj nedelji inflamacijske reakcije (Zhao i sar., 1991). Džinovske makrofage koje su multijedarne ćelije nastaju fuzijom makrofaga i predstavljaju osnovnu histološku karakteristiku hronične inflamacije (McNally i sar., 1995). Kada je u pitanju hronična inflamacija kao odbrambena reakcija na strano telo, džinovske makrofage se uvek formiraju u tkivu oko stranog tela s obzirom da ono ne može biti fagocitovano. Džinovske makrofage smanjuju fagocitnu aktivnost u odnosu na klasične tkivne makrofage ali imaju veću sposobnost produkcije proteolitičkih enzima u ekstracelularni prostor u cilju degradacije stranog tela (Nakanishi-Matsui i sar., 2013).

U mehanizmu nastanka džinovskih makrofaga ključnu ulogu imaju citokini, od kojih su najznačajniji IL-4 i IL-13, dva kjučna citokina Th2 ćelija (Anderson i sar., 2008; Rodriguez i sar., 2009). Njihova uloga u fuziji makrofaga je pokazana u brojnim *in vitro* eksperimentima. Za sada nema literaturnih podataka o reakciji na strano telo u miševa sa delecijom *Mif* gena, pa ni podataka o broju džinovskih ćelija i mehanizmima njihovog nastanka i naši nalazi su prvi koji povezuju ulogu MIF-a u ovim procesima. Zbog toga se objašnjenja o povećanom broju džinovskih makrofaga u *Mif*^{-/-} miševa u kasnoj fazi inflamacije mogu potražiti u drugim modelima istraživanja.

Jacquin i sar. (2009) su ispitivali efekat MIF-a na formiranje osteoklasta u kulturama ćelija koštane srži *Mif*^{-/-} soja i kontrolnog divljeg soja (*Mif*^{+/+}) miševa. Kao što je poznato osteoklasti su multijedarni džinovski makrofagi (slične morfologije i funkcije kao i džinovske ćelije oko stranog tela) sa važnom ulogom u resorpciji kosti. Ovi autori su pokazali da endogeni MIF inhibira formiranje osteoklasta u kulturi smanjujući fuziju makrofaga nakon tretiranja kultura sa M-CSF-om i RANKL citokinom. Sa druge strane, u kulturama ćelija koštane srži iz *Mif*^{-/-} miševa tretiranih M-CSF-om, RANKL-om, parathormonom ili vitaminom D

broj osteoklasta je bio znatno povećan u odnosu na kulture divljeg soja miševa sa prisutnim Mif genom. Ovi nalazi su bili praćeni povećanjem broja ćelija koje formiraju granulocitno-makrofagne kolonije i ispoljavaju integrin CD11b (Mac 1). Opisani rezultati su komparabilni sa našim rezultatima u pogledu povećanja kako relativnog tako i ukupnog broja džinovskih makrofaga u *Mif*^{-/-} miševa.

Prethodni rezultati (Jacquin i sar., 2009) i naši rezultati iz ovog istraživanja se međutim, razlikuju od rezultata koji su publikovani od strane Gu i sar. (2015) na modelu artritisa u *Mif*^{-/-} miševa. Naime, oni su pokazali da je broj osteoklasta u sinoviji zgloba zahvaćenog artritismom u miševa sa delecijom gena za CD74 (receptor za MIF) skoro nedetektabilan. Ovi procesi su bili praćeni smanjenom fosforilacijom NF-kB (subjedinice p65) i ERK 1/2 kinaza.

Međutim, drugi eksperimentalni podaci opovrgavaju prethodne i ponovo su u saglasnosti sa našim nalazima (Mun i sar., 2013). U ovom istraživanju je pokazano da ćelije koštane srži iz miševa sa delecijom CD74 gena formiraju oko 15% više osteoklasta *in vitro* u prisustvu M-CSF-a i RANKL-a. Tretiranje kultura MIF-om dovelo je do smanjenja ekspresije NFATc, c-Fas i AP1 proteina pod uticajem RANKL-a. Zajedno ovi nalazi pokazuju da je CD74 neophodan i ključan receptor za dejstvo MIF-a na stvaranje osteoklasta u *in vitro* uslovima. Moguće je da su naizgled kontradiktorni rezultati o ulozi MIF-a u nastanku osteoklasta (džinovskih makrofaga) posledica korišćenja različitih modela (*in vitro* u odnosu na *in vivo*) i razlikama u formiranju džinovskih ćelija *in vivo* kada je u pitanju autoimunska zapaljenska reakcija (reumatoidni artritis) i sterilna inflamacija (reakcija na strano telo), kakav je bio naš eksperimentalni model. Izgleda da formiranje džinovskih makrofaga kod zapaljenske granulomatozne reakcije, kakva je na primer tipična za tuberkulozu ali i neke autoimunske bolesti, drugačije u odnosu na sterilnu granulomatoznu reakciju. U ovim procesima fuziji makrofaga doprinose i Th1 citokini (posebno IFN- γ), posebno u incijalnoj fazi stvaranja džinovskih ćelija (McNally i sar., 1995).

Osim direktnog delovanja MIF-a na procese fuzije makrofaga i formiranje džinovskih ćelija, koji su do sada proučavani na nivou intracelularnih signalnih puteva, moguće je da postoje i indirektni mehanizmi. Naime, mi smo pokazali da je u kasnoj fazi inflamacije u *Mif*^{-/-} miševa u eksudatu iz suđera prisutna veća

koncentracija IL-33, citokina koji stimuliše produkciju Th2 citokina, a već je naglašeno da Th2 citokini imaju direktno delovanje na formiranje džinovskih ćelija.

Jedan od značajnih rezultata dobijenih u ovoj studiji se odnosio na smanjeni nivo nitrita, kao parametra produkcije NO, u miševa sa delecijom *Mif* gena. Smanjenje je bilo statistički značajno kako u eksudatu tako i u kulturi i to u obe faze inflamacije. Niža ukupna produkcija NO u ranoj fazi, u odnosu na kasnu fazu, se može objasniti manjom sintezom NO od strane neutrofilnih granulocita (rana faza) u odnosu na makrofage koji predominiraju u kasnoj fazi inflamacije.

Poznato je da se u toku inflamacije ili povrede tkiva NO stvara iz amino kiseline arginina pod uticajem enzima inducibilne NO-sintaze (iNOS), ali se funkcija stvorenog NO razlikuje u zavisnosti od ćelija koje ih proizvode (Witte i sar., 2002). Takođe, postoje kontradiktorni podaci da li je ovaj molekul protektivan ili učestvuje u tkivnom oštećenju (Schwentker i sar., 2002). Protektivna uloga se objašnjava zaštitom ćelija od prekomernog delovanja proinflamacijskih medijatora, koja između ostalog uključuje i pospešivanje apoptoze različitih ćelija, uključujući neutrofile i makrofage (Albina i sar., 1993). Sa druge strane, vezivanje NO za slobodne kiseoničke radikale dovodi do stvaranja toksičnih peroksinitrita koji mogu dodatno doprinosti oštećenju ćelija (Halliwell i sar., 1999). U ovim procesima u toku rane faze inflamacije važan doprinos ima i mijeloperoksidaza iz neutrofila.

Zunic i sar. (2009a) su izučavali nivo nitrata i nitrita u eksudatu kožne rane u pacova tri dana nakon subkutane implantacije suđera i našli najveću produkciju u prva 24 časa. Ovaj nalaz je kasnije dopunjen i sa povećanjem ekspresije iNOS-a što je koreliralo sa povećanjem koncentracije arginina (Zunic i sar., 2009b). Relativno nizak nivo NO₂ u eksudatu u našem radu se može objasniti brzom oksidacijom NO₂ do nitrata u čemu značajnu ulogu ima i hemoglobin, koji se oslobađa iz eritrocita tokom implantacije suđera izazvanog traumom tkiva (Gross i sar., 1999).

Smanjena produkcija NO kod *Mif*^{-/-} miševa je već pokazana u više različitih modela i taj nalaz je u saglasnosti sa uticajem MIF-a na produkciju NO (Calandra i sar., 2003; Stosic-Grujicic i sar., 2009). Međutim, izgleda da su inflamacijske ćelije *Mif*^{-/-} miševa podložnije delovanju LPS-a, kao stimulatora produkcije NO, iako se to ne bi očekivalo.

U patogenezi zapaljenskih procesa i zarastanju rane ključnu ulogu ima nekoliko citokina urođenog imuniteta sa pro-inflamacijskim svojstvima. Među njima, najznačajniji su IL-1, IL-6, IL-8 i TNF- α . Zajedničko za ove citokine je što ih predominantno proizvode makrofagi i infiltrirajući neutrofili. Međutim, njihova sekrecija je povezana i sa drugim ćelijama u povređenom tkivu kao što su fibroblasti, epitelne i endotelne ćelije i pojedine subpopulacije T limfocita. Ovi citokini deluju na migraciju leukocita na mesto inflamacije, aktiviraju granulocite, makrofage, T limfocite i druge ćelije. Međutim, svaki od njih ispoljava i pojedine specifične efekte (Rai i sar., 2008; Sims i sar., 2010; Yucel-Lindberg i sar., 2013).

IL-1 je prvi otkriveni citokin urođenog imuniteta, koji ostvaruje svoje funkcije delujući kako na komponente urođenog tako i na komponente stečenog imuniteta. Porodica IL-1 molekula obuhvata IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-33, IL-F5 - IL-F10. IL-1 α i IL-1 β poseduju slične biološke aktivnosti i deluju na isti receptor. Nivoi IL-1 β su znatno povišeni u eksudatu rane i koreliraju sa stepenom inflamacije, odnosno oštećenja tkiva (Dinarello, 2010; Pejnović, 1997; Pejnović i sar., 1995), što potvrđuje i naše istraživanje. U miševa sa delecijom *Mif* gena nivoi IL-1 β u eksudatu su bili sniženi u odnosu na kontrolne miševe i to smanjenje je bilo izraženije u kasnoj fazi inflamacije. Ovi nalazi su u saglasnosti sa poznatim podacima da MIF direktno ili indirektno stimuliše produkciju IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, NO, metabolita arahidonske kiseline i nekih matriksnih metaloproteinaza (Lue i sar., 2002; Roger i sar., 2003). Veća inhibicija produkcije IL-1 β u kasnoj fazi inflamacije se može dovesti u vezu sa manjim brojem inflamacijskih ćelija, posebno makrofaga, koji su najpotentniji produktori ovog citokina. Takođe se mogu povezati sa povećanjem nivoa IL-1Ra, koji je najznačajniji inhibitor delovanja IL-1 β i koji ispoljava anti-inflamacijski efekat (Dinarello, 2010).

Smatra se da povećanje ekspresije TLR4 na makrofagima i smanjenje njihove apoptoze su dva osnovna načina kojima MIF indukuje proinflamacijski urođeni imunski odgovor (Calandra i sar., 2003; Lue i sar., 2002). Pokazano je da makrofagi *Mif*-deficijentnih miševa slabije proizvode proinflamacijske medijatore (TNF- α , IL-1 β i PGE₂) nakon stimulacije LPS-om ili infekcije Gram-negativnim bakterijama (*S.Typhi murium*). Razlog ove hiporesponsivnosti jeste posledica slabije ekspresije TLR4 koji se nalazi u sklopu LPS-receptorskog kompleksa.

Poznato je da MIF podstiče transkripciju Tlr4 gena aktivacijom PU.1 transkripcionog faktora (Koebernick i sar., 2002).

IL-6 ispoljava pro- i anti-inflamacijska svojstva. U toku zarastanja rane opisana je različita dinamika produkcije ovog citokina sa najvećim vrednostima u ranoj fazi inflamacije (Pejnovic i sar., 1995). U našem radu nismo uspeli da kvantifikujemo IL-6, ali se shodno literaturnim podacima može pretpostaviti da je u *Mif* deficijentnih miševa njegov nivo snižen. Indirektan zaključak se može izvesti na osnovu analize nivoa CRP-a, reaktanta akutne faze koji se sintetiše u jetri dominantno pod uticajem IL-6. Međutim, naši nalazi pokazuju da je nivo CRP-a u eksudatu miševa sa delecijom *Mif* gena u ranoj fazi inflamacije nepromenjen u odnosu na kontrolni soj miševa a da je nivo ovog proteina povišen u kasnoj fazi. Ovi naizgled paradoksalni rezultati se mogu tumačiti anti-inflamacijskim miljeom u kasnoj fazi inflamacije kod *Mif* deficijentnih miševa u kome bi IL-6 delovao kao anti-inflamacijski medijator.

TNF- α je jedan od najbolje izučenih pro-inflamacijskih citokina čija se funkcija u urođenom imunskom sistemu značajno preklapa sa delovanjem IL-1. Međutim, sistemski efekti im se značajno razlikuju (Colic i sar., 2009; Kantarci i sar., 2003). TNF- α je uključen u rani stadijum inflamacijske kaskade a oslobađa se iz mastocita i neutrofila pod uticajem bakterija i njihovih produkata. U kasnijem toku inflamacije, ovaj citokin produkuje brojne ćelije: monociti, makrofagi, neutrofilni granulociti, fibroblasti, epitelne i endotelne ćelije. Slično IL-1, koncentracije TNF- α su značajno povećane u inflamacijskom eksudatu (Pejnović, 1997). Smanjenje nivo TNF- α je pokazano na modelu autoimunskog dijabetesa i infekcije gljivicama miševa sa delecijom *Mif* gena (Stojanovic i sar., 2011; Stosic-Grujicic i sar., 2008). Naši rezultati pokazuju smanjenje TNF- α u eksudatu *Mif*^{-/-} miševa u kasnoj fazi inflamacije, u poređenju sa divljim sojem miševa, dok u ranoj fazi ta razlika nije uočena. To ukazuje da *Mif* gen nije direktno uključen u kontrolu produkcije TNF- α , ili da je njegova potencijalna regulacija pod delovanjem MIF-a različita u neutrofilnim granulocitima (rana faza inflamacije). Ovaj nalaz bi mogao biti povezan i sa manjim stepenom apoptoze neutrofilnih granulocita u ranoj fazi inflamacije kod *Mif*^{-/-} miševa, imajući u vidu činjenicu da manje koncentracije TNF- α deluju anti-apoptotski. Obrnut je nalaz u kasnoj fazi, kada smanjenje nivoa TNF- α može biti povezano sa povećanom apoptozom inflamacijskih ćelija. Međutim,

najverovatnije se veza MIF-a i TNF- α odvija i indirektnim mehanizmima, što predstavlja osnovu za buduća detaljnija ispitivanja ovog fenomena na ovom modelu inflamacije.

Citokini T „helper“ (Th) limfocita zauzimaju centralno mesto u stečenom imunitetu. Grupa efektorskih Th limfocita je veoma heterogena i obuhvata najmanje 4 dobro definisana podtipa koji su označeni kao Th1, Th2, Th17 i T regulatorni limfociti. Njihova diferencijacija od naivnih CD4 limfocita zavisi od prirode antigenskog stimulusa i okruženja u kome se ovaj proces dešava (Čolić i sar., 2009). Th1 limfociti proizvode IFN- γ pod uticajem IL-12. IL-12 sekretuju ćelije urođenog imuniteta, pre svega dendrične ćelije i makrofagi, u odgovoru na intracelularne mikroorganizme. Proizvedeni IFN- γ je jedan od najpotentnijih aktivatora makrofaga, čime se pospešuje njihova mikrobicidna sposobnost i eradikacija infekcije. Brojna istraživanja pokazuju da IFN- γ ispoljava pro-inflamacijsko dejstvo. Imajući u vidu dosadašnja saznanja da je MIF proinflamacijski medijator, logično je očekivati da će produkcija IFN- γ biti manja u *Mif*^{-/-} miševa. Do takvih rezultata su došli i istraživači koji su izučavali razvoj dijabetesa u *Mif*^{-/-} miševa (Stosic-Grubic i sar., 2008) ili infekciju sa *Aspergillus fumigatus* (Stojanovic i sar., 2011).

Naši nalazi, međutim, pokazuju da je smanjenje koncentracije kako IFN- γ , tako i IL-12 u eksudatu *Mif*^{-/-} miševa bilo prisutno samo u ranoj fazi. U kasnoj fazi je dobijen neočekivano suprotan rezultat, tj. nivo IL-12 je bio povišen, a nivo IFN- γ nepromenjen u odnosu na vrednosti ovih citokina u eksudatu *Mif*^{+/+} miševa. Razlike se mogu tumačiti različitim ćelijskim sastavom eksudata. Naime u kasnoj fazi dominiraju makrofage i dendrične ćelije koje su i glavni produktori IL-12. S obzirom da je njihov broj manji u *Mif*^{-/-} miševa jedino logično objašnjenje povećane produkcije IL-12 u ovih miševa je povećan broj džinovskih makrofaga. Međutim, koliko ove ćelije zaista doprinose produkciji IL-12, ostaje da se istraži.

U odsustvu IL-12 naivni CD4⁺T limfociti se diferenciraju u Th2 subpopulaciju koja proizvodi IL-4, IL-5 i IL-13. Ovi citokini stimulišu humoralni imunski odgovor i alergijske reakcije delujući direktno na produkciju IgE (IL-4) ili na aktivaciju eozinofila (IL-5), takođe stimulišu fuziju makrofaga. Iako nije dovoljno poznato kakva je uloga Th2 odgovora u hroničnoj nesterilnoj inflamaciji, najveći

broj radova sugeriraju anti-inflamacijsko svojstvo ove subpopulacije limfocita (Shioi i sar., 1991). Zbog međusobnog antagonističkog delovanja Th1 na Th2 i obrnuto, u analizi nivoa ovih citokina u tkivu ili telesnim tečnostima, bitan je i njihov međusobni odnos (Liu i sar., 2010; Seymour i sar., 2001).

U našem radu nismo imali mogućnost da odredimo nivo Th2 citokina ali se indirektno može zaključiti da je u *Mif*^{-/-} miševa njihov nivo bio povišen. Ovakva pretpostavka se temelji na povećanom broju džinovskih makrofaga u *Mif*^{-/-} miševa kao i većoj produkciji IL-33. Do sada u literaturi nisu objavljeni nalazi o produkciji IL-33 u miševa sa delecijom *Mif* gena. IL-33 (alarmin) pripada interleukinskoj porodici citokina i jedan je od ključnih faktora urođenog imuniteta, inflamacije i alergije (Cayrol i sar., 2014). On je konstitutivno ispoljen na epitelnim barijerama i u limfnim organima i ima ključnu ulogu u Th2 imunskom odgovoru. IL-33 se vrlo brzo produkuje nakon oštećenja ćelija i različitih oblika ćelijskog stresa. Slično pokazuju i naši rezultati o relativno visokim koncentracijama ovog citokina u oba soja miševa nakon implantacije sunđera (rana i kasna faza). Uloga IL-33 u Th2 imunskom odgovoru je povezana sa njegovim podsticajnim delovanjem na produkciju IL-5 i IL-13 od strane tipa 2 limfoidnih ćelija urođenog imuniteta (Mjosberg i sar., 2011; Schmitz i sar., 2005). Za sada nema podataka o povezanosti IL-33 i MIF-a pa se naši nalazi o povećanoj koncentraciji IL-33 u eksudatu sunđera implantiranih u *Mif*^{-/-} miševa može tumačiti ili međusobnim antagonističkim delovanjem ovih citokina ili indirektnim efektima u okviru kompleksne citokinske mreže u toku inflamacije. Bez obzira na njihov međusobni odnos, povećan broj džinovskih makrofaga u *Mif*^{-/-} miševa se može povezati sa povećanjem nivoa IL-33, koji direktno ili indirektno (preko IL-13) i drugih Th2 citokina pospešuje fuziju makrofaga.

IL-17 porodica citokina, od kojih je najznačajniji IL-17A, pripadaju citokinima Th17 ćelija koje imaju značajnu ulogu u imunskim reakcijama prema ekstracelularnim bakterijama i gljivicama, ali i u patogenezi brojnih autoimunskih oboljenja. S obzirom da su otkriveni tek pre petnaestak godina, nije ni iznenađujuće što pobuđuju veliku pažnju kako kliničara tako i istraživača. Na diferencijaciju Th17 ćelija utiču IL-1, IL-6 i TGF- β a u klonskoj ekspanziji i aktivaciji efektorskih Th17 ćelija ključnu ulogu ima IL-23. IL-23, zajedno sa IL-27 i IL-35, pripada IL-12 familiji citokina koji imaju prevashodni značaj u polarizaciji Th17 odgovora i

regulaciji imunskih funkcija. Mi smo očekivali da će nivo IL-17 biti niži u eksudatu *Mif*^{-/-} miševa, slično rezultatima o smanjenoj produkciji ovog pro-inflamacijskog citokina na drugim modelima inflamacije (Stojanovic i sar., 2011; Stosic-Grujicic i sar., 2008). Očito da je uloga MIF-a u regulaciji IL-17 različita u nespecifičnoj imunosti (naš model) i specifičnoj imunosti (autoimunski modeli).

GM-CSF je značajan hematopoetski faktor rasta i imunomodulator. Takođe, deluje na različite funkcije leukocita. Ovaj citokin produkuje T ćelije, makrofagi, endotelne ćelije i fibroblasti pod uticajem imunskih stimulusa. Iako se produkuje lokalno, GM-CSF deluje parakrino na mobilizaciju neutrofila i limfocita iz cirkulacije u tkiva, doprinoseći odbrani organizma od infekcije (Shi i sar., 2006a). GM-CSF ostvaruje ove funkcije posredstvom specifičnih receptora koji su ispoljeni na leukocitima, endotelnim ćelijama i alveolarnim epitelnim ćelijama. U fiziološkim uslovima, nivo GM-CSF u krvi je skoro nemerljiv. Međutim, u toku inflamacije njegova koncentracija u tkivu se znatno povećava (Metcalf i sar., 1999). Naši nalazi o značajnim koncentracijama GM-CSF u eksudatu dopunjuju prethodne nalaze i ukazuju na pro-inflamacijsku ulogu ovog faktora rasta i kod aseptičnog zapaljenja, kakav je bio naš model. Ono što je neočekivani nalaz je povećanje nivoa GM-CSF-a u eksudatu *Mif*^{-/-} miševa u ranoj fazi inflamacije u odnosu na kontrolni soj miševa, iako je pokazano da MIF stimuliše njegovu produkciju (Shi i sar., 2006b). Razlog za ovakav nalaz nije jasan jer je nivo IL-1 β , jednog od stimulatora produkcije GM-CSF, bio snižen u eksudatu *Mif*^{-/-} miševa. Objašnjenje se može tražiti u specifičnostima rane faze nesterilne inflamacije u našem modelu. U tom kontekstu bi i TNF- α , čija produkcija nije bila smanjena u eksudatu *Mif*^{-/-} miševa, zajedno sa GM-CSF-om i glukokortikoidima mogli biti odgovorni za povećano preživljavanje neutrofila što je takođe neočekivan fenomen, i koji je već ranije komentarisano u ovom radu. Takođe se na osnovu naših rezultata može pretpostaviti da je povezanost MIF-a i GM-CSF-a u kasnoj inflamaciji od manjeg značaja, nego što je to slučaj sa ranom fazom.

CXCL10 ili interferon-inducibilni protein-10 je hemokin koji je uključen u brojne funkcije a najviše u migraciju leukocita, kako kroz endotel, tako i u tkivu. Njega sekretuju leukociti ali i brojne tkivne stromalne ćelije. Funkcije CXCL10 se razlikuju u miša i čoveka (van den Borne i sar., 2014). U miša ovaj hemokin utiče na migraciju Th1 limfocita, aktivaciju i hemotaksu B limfocita, makrofaga i NK

ćelija na mesto inflamacije (Romagnani i sar., 2012). Otuda i ne iznenađuju naši rezultati da je u *Mif*^{-/-} miševa nivo CXCL10 u eksudatu bio snižen u kasnoj fazi kada dominiraju makrofagi, a što je bilo praćeno značajnim smanjenjem broja ovih ćelija. Nasuprot tome, u ranoj fazi njegov nivo u eksudatu se nije bitnije razlikovao u odnosu na kontrolu, na osnovu čega se može pretpostaviti CXCL10 da on nije od bitnijeg značaja za migraciju neutrofila u našem modelu nesterilne inflamacije. Naravno, ovo su samo uprošćena razmišljanja u nedostatku dodatnih informacija koje bi direktno ili indirektno ukazivale na povezanost funkcije MIF-a i CXCL10.

U zaključku se može istaći da je nesterilna inflamacija u *Mif*^{-/-} miševa smanjena u odnosu na inflamaciju u kontrolnog divljeg soja (*Mif*^{+/+}) miševa. Ovaj zaključak se temelji na smanjenoj migraciji inflamacijskih ćelija i njihovoj povećanoj apoptozi, smanjenoj produkciji NO i inflamacijskih citokina (IL-1 β , TNF- α , GM-CSF-a i CXCL10) i Th1 citokina (IL-12 i IFN- γ), a povećanoj produkciji anti-inflamacijskog citokina (IL-1Ra) i IL-33 (citokina koji stimuliše Th2 odgovor). Međutim, dinamika promena ispitivanih parametara se razlikuje u zavisnosti od faze inflamacije i nije uvek u saglasnosti sa očekivanim fenomenom i u skladu sa postavljenim hipotezama. To nameće potrebu da se u daljim istraživanjima ovi mehanizmi bolje razumeju korišćenjem blokirajućih anti-MIF antitela ili inhibitora sinteze/dejstva MIF-a u cilju provere da li su opisani fenomeni karakteristični i specifični samo za model nesterilne hronične inflamacije ili imaju univerzalni biološki značaj.

6 Zaključci

Na osnovu dobijenih rezultata na modelu sterilne inflamacije uzrokovane subkutanom implantacijom polivinilskih sundera u miševa sa uklonjenim *Mif* genom (*Mif*^{-/-}) i poređenjem sa rezultatima kod kontrolnog, divljeg, soja miševa sa prisutnim *Mif* genom (*Mif*^{+/+}), mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Kod *Mif*^{-/-} miševa je smanjeno lokalno nakupljanje inflamacijskih ćelija (neutrofilnih granulocita u ranoj fazi inflamacije; neutrofilnih granulocita i makrofaga u kasnoj fazi inflamacije). Ovaj nalaz nije povezan sa brojem neutrofila i monocita u perifernoj krvi već verovatno sa smanjenom hemotaksom ovih ćelija.
2. Kod *Mif*^{-/-} miševa je smanjena apoptoza neutrofilnih granulocita u eksudatu u ranoj fazi inflamacije, a povećana apoptoza neutrofilnih granulocita u kasnoj fazi inflamacije.
3. Kasna faza inflamacije kod *Mif*^{-/-} miševa je praćena povećanjem broja džinovskih, multijedarnih makrofaga.
4. Inflamacijske ćelije *Mif*^{-/-} miševa imaju veću spontanu i PMA-indukovanu adhezivnost za plastiku a manju spontanu i LPS-om indukovanu produkciju NO u kulturi.
5. Inflamacijske ćelije *Mif*^{-/-} miševa maju veću spontanu ali ne i LPS-om indukovanu apoptozu u kulturi.
6. Ranu fazu inflamacije kod *Mif*^{-/-} miševa karakteriše smanjena produkcija IL-1 β , IL-1Ra, IL-12, IFN- γ , a povećana produkcija IL-33 i GM-CSF-a.
7. Kasnu fazu inflamacije kod *Mif*^{-/-} miševa karakteriše smanjena produkcija IL-1 β , TNF- α i CXCL10, a povećana produkcija IL-12, IL-33, IL-1Ra i CRP.
8. Predominacija anti-inflamacijskih medijatora kod *Mif*^{-/-} miševa, praćena smanjenom mobilizacijom inflamacijskih ćelija u povređeno tkivo i povećanjem njihove apoptoze, mogu delovati povoljno na bržu rezoluciju inflamacije.

7 Literatura

Abe, R., Shimizu, T., Ohkawara, A., Nishihira, J. (2000). Enhancement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in injured epidermis and cultured fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1500: 1-9.

Albina, J. E., Cui, S., Mateo, R. B., Reichner, J. S. (1993). Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *J Immunol*, Vol. 150: 5080-5085.

Aloisi, A. M., Pari, G., Ceccarelli, I., Vecchi, I., Ietta, F., Lodi, L., Paulesu, L. (2005). Gender-related effects of chronic non-malignant pain and opioid therapy on plasma levels of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Pain*, Vol. 115: 142-151.

Anderson, J. M. (2001). Biological Responses to Materials. *Annual Review of Materials Research*, Vol. 31: 81-110.

Anderson, J. M., Rodriguez, A., Chang, D. T. (2008). Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol*, Vol. 20: 86-100.

Arita, M., Ohira, T., Sun, Y. P., Elangovan, S., Chiang, N., Serhan, C. N. (2007). Resolvin E1 selectively interacts with leukotriene B4 receptor BLT1 and ChemR23 to regulate inflammation. *J Immunol*, Vol. 178: 3912-3917.

Ashcroft, G. S., Mills, S. J. (2002). Androgen receptor-mediated inhibition of cutaneous wound healing. *J Clin Invest*, Vol. 110: 615-624.

Ashcroft, G. S., Mills, S. J., Flanders, K. C., Lyakh, L. A., Anzano, M. A., Gilliver, S. C., Roberts, A. B. (2003a). Role of Smad3 in the hormonal modulation of in vivo wound healing responses. *Wound Repair Regen*, Vol. 11: 468-473.

Ashcroft, G. S., Mills, S. J., Lei, K., Gibbons, L., Jeong, M.-J., Taniguchi, M., Burow, M., Horan, M. A., Wahl, S. M., Nakayama, T. (2003b). Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *Journal of Clinical Investigation*, Vol. 111: 1309-1318.

Bacher, M., Metz, C. N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gemsa, D., Donnelly, T., Bucala, R. (1996). An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 93: 7849-7854.

Barbul, A. (1990). Immune aspects of wound repair. *Clin Plast Surg*, Vol. 17: 433-442.

Baugh, J. A., Bucala, R. (2002). Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med*, Vol. 30: S27-S35.

- Baumann, R., Casaulta, C., Simon, D., Conus, S., Yousefi, S., Simon, H. U. (2003). Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *FASEB J*, Vol. 17: 2221-2230.
- Bergenfelz, C., Medrek, C., Ekstrom, E., Jirstrom, K., Janols, H., Wullt, M., Bredberg, A., Leandersson, K. (2012). Wnt5a induces a tolerogenic phenotype of macrophages in sepsis and breast cancer patients. *J Immunol*, Vol. 188: 5448-5458.
- Berndt, K., Kim, M., Meinhardt, A., Klug, J. (2008). Macrophage migration inhibitory factor does not modulate co-activation of androgen receptor by Jab1/CSN5. *Mol Cell Biochem*, Vol. 307: 265-271.
- Bishop, M. W. H., McLaren, A. (1966). *Advances in reproductive physiology* (Vol. 1). London: Elek Science.
- Bloom, B. R., Bennett, B. (1966). Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*, Vol. 153: 80-82.
- Bojunga, J., Kusterer, K., Bacher, M., Kurek, R., Usadel, K. H., Renneberg, H. (2003). Macrophage migration inhibitory factor and development of type-1 diabetes in non-obese diabetic mice. *Cytokine*, Vol. 21: 179-186.
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, Vol. 33: 657-670.
- Bozza, M., Satoskar, A. R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A. A., Gerard, C., David, J. R. (1999). Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med*, Vol. 189: 341-346.
- Bratton, D. L., Henson, P. M. (2011). Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol*, Vol. 32: 350-357.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, Vol. 303: 1532-1535.
- Burger-Kentischer, A., Gobel, H., Kleemann, R., Zerneck, A., Bucala, R., Leng, L., Finkelmeier, D., Geiger, G., Schaefer, H. E., Schober, A., Weber, C., Brunner, H., Rutten, H., Ihling, C., Bernhagen, J. (2006). Reduction of the aortic inflammatory response in spontaneous atherosclerosis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Atherosclerosis*, Vol. 184: 28-38.
- Cai, J. P., Harris, B., Falanga, V., Eaglstein, W. H., Mertz, P. M., Chin, Y. H. (1990). Recruitment of mononuclear cells by endothelial cell binding into wounded skin is a selective, time-dependent process with defined molecular interactions. *J Invest Dermatol*, Vol. 95: 415-421.
- Calandra, T., Echtenacher, B., Roy, D. L., Pugin, J., Metz, C. N., Hultner, L., Heumann, D., Mannel, D., Bucala, R., Glauser, M. P. (2000). Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med*, Vol. 6: 164-170.

- Calandra, T., Roger, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, Vol. 3: 791-800.
- Capecchi, M. R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science*, Vol. 244: 1288-1292.
- Carlos, T. M., Harlan, J. M. (1990). Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunol Rev*, Vol. 114: 5-28.
- Cayrol, C., Girard, J.-P. (2014). IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr Opin Immunol*, Vol. 31: 31-37.
- Chauchereau, A., Georgiakaki, M., Perrin-Wolff, M., Milgrom, E., Loosfelt, H. (2000). JAB1 interacts with both the progesterone receptor and SRC-1. *J Biol Chem*, Vol. 275: 8540-8548.
- Chesney, J., Metz, C., Bacher, M., Peng, T., Meinhardt, A., Bucala, R. (1999). An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med*, Vol. 5: 181-191.
- Cicchetti, G., Allen, P. G., Glogauer, M. (2002). Chemotactic signaling pathways in neutrophils: from receptor to actin assembly. *Crit Rev Oral Biol Med*, Vol. 13: 220-228.
- Čolić, M., Gašić, S., Vučević, D., Pavičić, L., Popović, P., Jandrić, D., Medić-Mijačević, L., Rakić, L. (2000). Modulatory effect of 7-thia-8-oxoguanosine on proliferation of rat thymocytes in vitro stimulated with concanavalin A. *International Journal of Immunopharmacology*, Vol. 22: 203-212.
- Colic, M., Gazivoda, D., Vucevic, D., Vasilijic, S., Rudolf, R., Lukic, A. (2009). Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol*, Vol. 47: 101-113.
- Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani, S., Mantovani, A. (1992). Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood*, Vol. 80: 2012-2020.
- Cros, J., Cagnard, N., Woollard, K., Patey, N., Zhang, S. Y., Senechal, B., Puel, A., Biswas, S. K., Moshous, D., Picard, C., Jais, J. P., D'Cruz, D., Casanova, J. L., Trouillet, C., Geissmann, F. (2010). Human CD14^{dim} monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity*, Vol. 33: 375-386.
- Danon, D., Kowatch, M. A., Roth, G. S. (1989). Promotion of wound repair in old mice by local injection of macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 86: 2018-2020.
- Daun, J. M., Cannon, J. G. (2000). Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic I κ B α . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, Vol. 279: R1043-1049.

- David, J. R. (1966). Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 56: 72-77.
- del Vecchio, M. T., Tripodi, S. A., Arcuri, F., Pergola, L., Hako, L., Vatti, R., Cintonino, M. (2000). Macrophage migration inhibitory factor in prostatic adenocarcinoma: correlation with tumor grading and combination endocrine treatment-related changes. *Prostate*, Vol. 45: 51-57.
- Dinarelo, C. A. (2010). IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol*, Vol. 40: 599-606.
- Donnelly, S. C., Haslett, C., Reid, P. T., Grant, I. S., Wallace, W. A., Metz, C. N., Bruce, L. J., Bucala, R. (1997). Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat Med*, Vol. 3: 320-323.
- Draskovic-Pavlovic, B., Van Der Laan, L. J., Pejnovic, N., Dijkstra, C. D., Colic, M. (1999). Differential effects of anti-rat CD11b monoclonal antibodies on granulocyte adhesiveness. *Immunology*, Vol. 96: 83-89.
- Draskovic-Pavlovic, B., Vucevic, D., Bozic, B., Majstorovic, I., Colic, M. (2012). Functional properties of granulocytes after thermal injury. *Immunol Res*, Vol. 52: 133-138.
- El Kebir, D., Filep, J. G. (2013). Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through beta2 Integrins. *Front Immunol*, Vol. 4: 60.
- Fan, H., Hall, P., Santos, L. L., Gregory, J. L., Fingerle-Rowson, G., Bucala, R., Morand, E. F., Hickey, M. J. (2011). Macrophage migration inhibitory factor and CD74 regulate macrophage chemotactic responses via MAPK and Rho GTPase. *J Immunol*, Vol. 186: 4915-4924.
- Ford, H. R., Hoffman, R. A., Wing, E. J., Magee, D. M., McIntyre, L., Simmons, R. L. (1989). Characterization of wound cytokines in the sponge matrix model. *Arch Surg*, Vol. 124: 1422-1428.
- Foster, H. L., Small, J. D., Fox, J. G. (1981). *The mouse in biomedical research*. New York ; London: Academic Press.
- Fox, S., Leitch, A. E., Duffin, R., Haslett, C., Rossi, A. G. (2010). Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun*, Vol. 2: 216-227.
- Galli, S. J., Borregaard, N., Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology*, Vol. 12: 1035-1044.
- Gilliver, S. C., Emmerson, E., Bernhagen, J., Hardman, M. J. (2011). MIF: a key player in cutaneous biology and wound healing. *Exp Dermatol*, Vol. 20: 1-6.

- Gilliver, S. C., Ruckshanthi, J. P., Hardman, M. J., Nakayama, T., Ashcroft, G. S. (2008). Sex dimorphism in wound healing: the roles of sex steroids and macrophage migration inhibitory factor. *Endocrinology*, Vol. 149: 5747-5757.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, Vol. 3: 23-35.
- Gordon, S., Taylor, P. R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*, Vol. 5: 953-964.
- Green, E. L. (1975). *Biology of the laboratory mouse* (2d ed.). New York: Dover Publications.
- Gregory, J. L., Morand, E. F., McKeown, S. J., Ralph, J. A., Hall, P., Yang, Y. H., McColl, S. R., Hickey, M. J. (2006). Macrophage migration inhibitory factor induces macrophage recruitment via CC chemokine ligand 2. *J Immunol*, Vol. 177: 8072-8079.
- Gross, S. S., Lane, P. (1999). Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 96: 9967-9969.
- Gu, R., Santos, L. L., Ngo, D., Fan, H., Singh, P. P., Fingerle-Rowson, G., Bucala, R., Xu, J., Quinn, J. M., Morand, E. F. (2015). Macrophage migration inhibitory factor is essential for osteoclastogenic mechanisms in vitro and in vivo mouse model of arthritis. *Cytokine*, Vol. 72: 135-145.
- Guan, C., Ye, C., Yang, X., Gao, J. (2010). A review of current large-scale mouse knockout efforts. *Genesis*, Vol. 48: 73-85.
- Guan, H., Zhou, Z., Wang, H., Jia, S. F., Liu, W., Kleinerman, E. S. (2005). A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor inhibits Ewing's sarcoma growth in a xenograft mouse model. *Clin Cancer Res*, Vol. 11: 2662-2669.
- Haertel, E., Werner, S., Schafer, M. (2014). Transcriptional regulation of wound inflammation. *Semin Immunol*, Vol. 26: 321-328.
- Halliwell, B., Zhao, K., Whiteman, M. (1999). Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly, the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic Res*, Vol. 31: 651-669.
- Hardman, M. J., Emmerson, E., Campbell, L., Ashcroft, G. S. (2008). Selective estrogen receptor modulators accelerate cutaneous wound healing in ovariectomized female mice. *Endocrinology*, Vol. 149: 551-557.
- Hedger, M., Klug, J., Frohlich, S., Muller, R., Meinhardt, A. (2005). Regulatory cytokine expression and interstitial fluid formation in the normal and inflamed rat testis are under leydig cell control. *J Androl*, Vol. 26: 379-386.
- Heit, B., Robbins, S. M., Downey, C. M., Guan, Z., Colarusso, P., Miller, B. J., Jirik, F. R., Kubes, P. (2008). PTEN functions to 'prioritize' chemotactic cues and prevent 'distraction' in migrating neutrophils. *Nat Immunol*, Vol. 9: 743-752.

- Houdeau, E., Moriez, R., Leveque, M., Salvador-Cartier, C., Waget, A., Leng, L., Bueno, L., Bucala, R., Fioramonti, J. (2007). Sex steroid regulation of macrophage migration inhibitory factor in normal and inflamed colon in the female rat. *Gastroenterology*, Vol. 132: 982-993.
- Hsieh, Y. C., Frink, M., Hsieh, C. H., Choudhry, M. A., Schwacha, M. G., Bland, K. I., Chaudry, I. H. (2007). Downregulation of migration inhibitory factor is critical for estrogen-mediated attenuation of lung tissue damage following trauma-hemorrhage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, Vol. 292: L1227-1232.
- Ishizaka, K., Ishii, Y., Nakano, T., Sugie, K. (2000). Biochemical basis of antigen-specific suppressor T cell factors: controversies and possible answers. *Adv Immunol*, Vol. 74: 1-60.
- Jacquin, C., Koczon-Jaremko, B., Aguila, H. L., Leng, L., Bucala, R., Kuchel, G. A., Lee, S. K. (2009). Macrophage migration inhibitory factor inhibits osteoclastogenesis. *Bone*, Vol. 45: 640-649.
- Javeed, A., Zhao, Y. (2008). Macrophage-migration inhibitory factor: role in inflammatory diseases and graft rejection. *Inflamm Res*, Vol. 57: 45-50.
- Kadoya, Y., al-Saffar, N., Kobayashi, A., Revell, P. A. (1994). The expression of osteoclast markers on foreign body giant cells. *Bone Miner*, Vol. 27: 85-96.
- Kantarci, A., Van Dyke, T. E. (2003). Lipoxins in chronic inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med*, Vol. 14: 4-12.
- Kleemann, R., Hausser, A., Geiger, G., Mischke, R., Burger-Kentischer, A., Flieger, O., Johannes, F. J., Roger, T., Calandra, T., Kapurniotu, A., Grell, M., Finkelmeier, D., Brunner, H., Bernhagen, J. (2000). Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature*, Vol. 408: 211-216.
- Kleemann, R., Kapurniotu, A., Frank, R. W., Gessner, A., Mischke, R., Flieger, O., Juttner, S., Brunner, H., Bernhagen, J. (1998). Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase. *J Mol Biol*, Vol. 280: 85-102.
- Kobayashi, S. D., Braughton, K. R., Whitney, A. R., Voyich, J. M., Schwan, T. G., Musser, J. M., DeLeo, F. R. (2003). Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 100: 10948-10953.
- Koebnick, H., Grode, L., David, J. R., Rohde, W., Rolph, M. S., Mittrucker, H. W., Kaufmann, S. H. (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 99: 13681-13686.
- Kolaczowska, E., Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, Vol. 13: 159-175.
- Korsmeyer, S. J., Wei, M. C., Saito, M., Weiler, S., Oh, K. J., Schlesinger, P. H. (2000). Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into

pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ*, Vol. 7: 1166-1173.

Kostic, T., Andric, S. (2007). *Molecular and Cellular Immunology*: WUS Austria.

Lan, H. Y., Bacher, M., Yang, N., Mu, W., Nikolic-Paterson, D. J., Metz, C., Meinhardt, A., Bucala, R., Atkins, R. C. (1997). The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat. *J Exp Med*, Vol. 185: 1455-1465.

Leech, M., Metz, C., Hall, P., Hutchinson, P., Gianis, K., Smith, M., Weedon, H., Holdsworth, S. R., Bucala, R., Morand, E. F. (1999). Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum*, Vol. 42: 1601-1608.

Leech, M., Metz, C., Santos, L., Peng, T., Holdsworth, S. R., Bucala, R., Morand, E. F. (1998). Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum*, Vol. 41: 910-917.

Leibovich, S. J., Ross, R. (1975). The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol*, Vol. 78: 71-100.

Leng, L., Metz, C. N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R. A., Bucala, R. (2003). MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med*, Vol. 197: 1467-1476.

Leng, L., Wang, W., Roger, T., Merk, M., Wuttke, M., Calandra, T., Bucala, R. (2009). Glucocorticoid-induced MIF expression by human CEM T cells. *Cytokine*, Vol. 48: 177-185.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 7: 678-689.

Lin, S. G., Yu, X. Y., Chen, Y. X., Huang, X. R., Metz, C., Bucala, R., Lau, C. P., Lan, H. Y. (2000). De novo expression of macrophage migration inhibitory factor in atherogenesis in rabbits. *Circ Res*, Vol. 87: 1202-1208.

Liu, H., Zhang, M., Han, H., Yuan, J., Li, Z. (2010). Comparison of the expression of cytokine genes in the bursal tissues of the chickens following challenge with infectious bursal disease viruses of varying virulence. *Virology*, Vol. 7: 364.

Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T., Bernhagen, J. (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect*, Vol. 4: 449-460.

Makita, H., Nishimura, M., Miyamoto, K., Nakano, T., Tanino, Y., Hirokawa, J., Nishihira, J., Kawakami, Y. (1998). Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on lipopolysaccharide-induced pulmonary neutrophil accumulation. *Am J Respir Crit Care Med*, Vol. 158: 573-579.

- Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A., Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol*, Vol. 229: 176-185.
- Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C., Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, Vol. 11: 519-531.
- Mathias, J. R., Perrin, B. J., Liu, T. X., Kanki, J., Look, A. T., Huttenlocher, A. (2006). Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *Journal of Leukocyte Biology*, Vol. 80: 1281-1288.
- McCracken, J. M., Allen, L. A. (2014). Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. *J Cell Death*, Vol. 7: 15-23.
- McNally, A. K., Anderson, J. M. (1995). Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. *Am J Pathol*, Vol. 147: 1487-1499.
- Mekada, K., Abe, K., Murakami, A., Nakamura, S., Nakata, H., Moriwaki, K., Obata, Y., Yoshiki, A. (2009). Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim*, Vol. 58: 141-149.
- Mestas, J., Hughes, C. C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *J Immunol*, Vol. 172: 2731-2738.
- Metcalf, D., Nicola, N. A., Mifsud, S., Di Rago, L. (1999). Receptor clearance obscures the magnitude of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses in mice to endotoxin or local infections. *Blood*, Vol. 93: 1579-1585.
- Michlewska, S., Dransfield, I., Megson, I. L., Rossi, A. G. (2009). Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF-alpha. *FASEB J*, Vol. 23: 844-854.
- Middleton, M. M., Campbell, P. A. (1989). Functions of purified mouse neutrophils isolated from gelatin sponges. *J Leukoc Biol*, Vol. 46: 461-466.
- Mills, S. J., Ashworth, J. J., Gilliver, S. C., Hardman, M. J., Ashcroft, G. S. (2005). The sex steroid precursor DHEA accelerates cutaneous wound healing via the estrogen receptors. *J Invest Dermatol*, Vol. 125: 1053-1062.
- Mitchell, R. A. (2004). Mechanisms and effectors of MIF-dependent promotion of tumourigenesis. *Cell Signal*, Vol. 16: 13-19.
- Mitchell, R. A., Liao, H., Chesney, J., Fingerle-Rowson, G., Baugh, J., David, J., Bucala, R. (2002). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 99: 345-350.

- Mitchell, R. A., Metz, C. N., Peng, T., Bucala, R. (1999). Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem*, Vol. 274: 18100-18106.
- Mizue, Y., Nishihira, J., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Chida, M., Nakamura, K., Kikuchi, K., Mukai, M. (2000). Quantitation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) using the one-step sandwich enzyme immunosorbent assay: elevated serum MIF concentrations in patients with autoimmune diseases and identification of MIF in erythrocytes. *Int J Mol Med*, Vol. 5: 397-403.
- Mjosberg, J. M., Trifari, S., Crellin, N. K., Peters, C. P., van Drunen, C. M., Piet, B., Fokkens, W. J., Cupedo, T., Spits, H. (2011). Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. *Nat Immunol*, Vol. 12: 1055-1062.
- Morand, E. F., Leech, M., Bernhagen, J. (2006). MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov*, Vol. 5: 399-410.
- Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M. E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S. N., Barrera, J. L., Mohar, A., Verastegui, E., Zlotnik, A. (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, Vol. 410: 50-56.
- Mun, S. H., Won, H. Y., Hernandez, P., Aguila, H. L., Lee, S. K. (2013). Deletion of CD74, a putative MIF receptor, in mice enhances osteoclastogenesis and decreases bone mass. *J Bone Miner Res*, Vol. 28: 948-959.
- Nakanishi-Matsui, M., Yano, S., Futai, M. (2013). Lipopolysaccharide-induced multinuclear cells: increased internalization of polystyrene beads and possible signals for cell fusion. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 440: 611-616.
- Nathan, C. F., Karnovsky, M. L., David, J. R. (1971). Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J Exp Med*, Vol. 133: 1356-1376.
- Oez, S., Welte, K., Platzer, E., Kalden, J. R. (1990). A Simple Assay for Quantifying the Inducible Adherence of Neutrophils. *Immunobiology*, Vol. 180: 308-315.
- Ogata, A., Shimizu, T., Abe, R., Shimizu, H., Sakai, M. (2004). Expression of c-maf and mafB genes in the skin during rat embryonic development. *Acta Histochem*, Vol. 106: 65-67.
- Ohkawara, T., Miyashita, K., Nishihira, J., Mitsuyama, K., Takeda, H., Kato, M., Kondo, N., Yamasaki, Y., Sata, M., Yoshiki, T., Sugiyama, T., Asaka, M. (2005). Transgenic over-expression of macrophage migration inhibitory factor renders mice markedly more susceptible to experimental colitis. *Clin Exp Immunol*, Vol. 140: 241-248.
- Ortega-Gomez, A., Perretti, M., Soehnlein, O. (2013). Resolution of inflammation: an integrated view. *EMBO Mol Med*, Vol. 5: 661-674.

- Pejnović, N. (1997). [Immune mechanisms in wound healing]. *Vojnosanit Pregl*, Vol. 54: 73-84.
- Pejnovic, N., Lilic, D., Zunic, G., Colic, M., Kataranovski, M., Dujic, A. (1995). Aberrant levels of cytokines within the healing wound after burn injury. *Arch Surg*, Vol. 130: 999-1006.
- Peters, A. M. (1998). Just How Big is the Pulmonary Granulocyte Pool? *Clinical Science*, Vol. 94: 7-19.
- Rai, M. F., Rachakonda, P. S., Manning, K., Vorwerk, B., Brunnberg, L., Kohn, B., Schmidt, M. F. (2008). Quantification of cytokines and inflammatory mediators in a three-dimensional model of inflammatory arthritis. *Cytokine*, Vol. 42: 8-17.
- Rappolee, D. A., Mark, D., Banda, M. J., Werb, Z. (1988). Wound macrophages express TGF-alpha and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science*, Vol. 241: 708-712.
- Rock, K. L., Latz, E., Ontiveros, F., Kono, H. (2010). The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol*, Vol. 28: 321-342.
- Rodriguez, A., Macewan, S. R., Meyerson, H., Kirk, J. T., Anderson, J. M. (2009). The foreign body reaction in T-cell-deficient mice. *J Biomed Mater Res A*, Vol. 90: 106-113.
- Roger, T., Froidevaux, C., Martin, C., Calandra, T. (2003). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of Toll-like receptor 4 (TLR4). *J Endotoxin Res*, Vol. 9: 119-123.
- Romagnani, P., Crescioli, C. (2012). CXCL10: a candidate biomarker in transplantation. *Clin Chim Acta*, Vol. 413: 1364-1373.
- Roovers, K., Davey, G., Zhu, X., Bottazzi, M. E., Assoian, R. K. (1999). Alpha5beta1 integrin controls cyclin D1 expression by sustaining mitogen-activated protein kinase activity in growth factor-treated cells. *Mol Biol Cell*, Vol. 10: 3197-3204.
- Rosengren, E., Bucala, R., Aman, P., Jacobsson, L., Odh, G., Metz, C. N., Rorsman, H. (1996). The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol Med*, Vol. 2: 143-149.
- Rowlatt, C., Chesterman, F. C., Sheriff, M. U. (1976). Lifespan, age changes and tumour incidence in an ageing C57BL mouse colony. *Lab Anim*, Vol. 10: 419-442.
- Salminen, A., Kaarniranta, K. (2011). Control of p53 and NF-kappaB signaling by WIP1 and MIF: role in cellular senescence and organismal aging. *Cell Signal*, Vol. 23: 747-752.
- Santos, L., Fan, H., Hall, P., Ngo, D., Mackay, C. R., Fingerle-Rowson, G., Bucala, R., Hickey, M. J., Morand, E. F. (2011). Macrophage migration inhibitory factor regulates neutrophil chemotactic responses in inflammatory arthritis in mice. *Arthritis Rheum*, Vol. 63: 960-970.

- Santos, L., Hall, P., Metz, C., Bucala, R., Morand, E. F. (2001). Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clin Exp Immunol*, Vol. 123: 309-314.
- Sauer, B., Henderson, N. (1988). Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 85: 5166-5170.
- Schmitz, J., Owyang, A., Oldham, E., Song, Y., Murphy, E., McClanahan, T. K., Zurawski, G., Moshrefi, M., Qin, J., Li, X., Gorman, D. M., Bazan, J. F., Kastelein, R. A. (2005). IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*, Vol. 23: 479-490.
- Schwartz, V., Lue, H., Kraemer, S., Korbiel, J., Krohn, R., Ohl, K., Bucala, R., Weber, C., Bernhagen, J. (2009). A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett*, Vol. 583: 2749-2757.
- Schwentker, A., Vodovotz, Y., Weller, R., Billiar, T. R. (2002). Nitric oxide and wound repair: role of cytokines? *Nitric Oxide*, Vol. 7: 1-10.
- Serhan, C. N. (2010). Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *Am J Pathol*, Vol. 177: 1576-1591.
- Serhan, C. N., Chiang, N., Van Dyke, T. E. (2008). Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*, Vol. 8: 349-361.
- Seymour, G. J., Gemmell, E. (2001). Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand*, Vol. 59: 167-173.
- Sherr, C. J., Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, Vol. 13: 1501-1512.
- Shi, X., Leng, L., Wang, T., Wang, W., Du, X., Li, J., McDonald, C., Chen, Z., Murphy, J. W., Lolis, E., Noble, P., Knudson, W., Bucala, R. (2006a). CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity*, Vol. 25: 595-606.
- Shi, Y., Liu, C. H., Roberts, A. I., Das, J., Xu, G., Ren, G., Zhang, Y., Zhang, L., Yuan, Z. R., Tan, H. S. W., Das, G., Devadas, S. (2006b). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Research*, Vol. 16: 126-133.
- Shimizu, T. (2005). Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in the skin. *J Dermatol Sci*, Vol. 37: 65-73.
- Shimizu, T., Nishihira, J., Watanabe, H., Abe, R., Honda, A., Ishibashi, T., Shimizu, H. (2004). Macrophage migration inhibitory factor is induced by thrombin and factor Xa in endothelial cells. *J Biol Chem*, Vol. 279: 13729-13737.

- Shioi, A., Teitelbaum, S. L., Ross, F. P., Welgus, H. G., Suzuki, H., Ohara, J., Lacey, D. L. (1991). Interleukin 4 inhibits murine osteoclast formation in vitro. *J Cell Biochem*, Vol. 47: 272-277.
- Sims, J. E., Smith, D. E. (2010). The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 10: 117.
- Smithies, O., Gregg, R. G., Boggs, S. S., Koralewski, M. A., Kucherlapati, R. S. (1985). Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature*, Vol. 317: 230-234.
- Soehnlein, O., Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 10: 427-439.
- Stojanovic, I., Mirkov, I., Kataranovski, M., Glamoclija, J., Stosic-Grujicic, S. (2011). A role for macrophage migration inhibitory factor in protective immunity against *Aspergillus fumigatus*. *Immunobiology*, Vol. 216: 1018-1027.
- Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Maksimovic-Ivanic, D., Momcilovic, M., Popadic, D., Harhaji, L., Miljkovic, D., Metz, C., Mangano, K., Papaccio, G., Al-Abed, Y., Nicoletti, F. (2008). Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is necessary for progression of autoimmune diabetes mellitus. *J Cell Physiol*, Vol. 215: 665-675.
- Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Nicoletti, F. (2009). MIF in autoimmunity and novel therapeutic approaches. *Autoimmun Rev*, Vol. 8: 244-249.
- Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M., Chilvers, E. R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*, Vol. 31: 318-324.
- Sundd, P., Pospieszalska, M. K., Cheung, L. S., Konstantopoulos, K., Ley, K. (2011). Biomechanics of leukocyte rolling. *Biorheology*, Vol. 48: 1-35.
- Takahashi, K., Koga, K., Linge, H. M., Zhang, Y., Lin, X., Metz, C. N., Al-Abed, Y., Ojamaa, K., Miller, E. J. (2009). Macrophage CD74 contributes to MIF-induced pulmonary inflammation. *Respir Res*, Vol. 10: 33.
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. 9: 231-241.
- Tofts, P. S., Chevassut, T., Cutajar, M., Dowell, N. G., Peters, A. M. (2011). Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*, Vol. 117: 6050-6052; author reply 6053-6054.
- Truman, L. A., Ford, C. A., Pasikowska, M., Pound, J. D., Wilkinson, S. J., Dumitriu, I. E., Melville, L., Melrose, L. A., Ogden, C. A., Nibbs, R., Graham, G., Combadiere, C., Gregory, C. D. (2008). CX3CL1/fractalkine is released from apoptotic lymphocytes to stimulate macrophage chemotaxis. *Blood*, Vol. 112: 5026-5036.

- van den Borne, P., Quax, P. H., Hoefler, I. E., Pasterkamp, G. (2014). The multifaceted functions of CXCL10 in cardiovascular disease. *Biomed Res Int*, Vol. 2014: 893106.
- Vasilijic, S., Savic, D., Vasilev, S., Vucevic, D., Gasic, S., Majstorovic, I., Jankovic, S., Colic, M. (2005). Dendritic cells acquire tolerogenic properties at the site of sterile granulomatous inflammation. *Cell Immunol*, Vol. 233: 148-157.
- Ward, B., Anderson, J., Ebert, M., McVenes, R., Stokes, K. (2006). In vivo biostability of polysiloxane polyether polyurethanes: resistance to metal ion oxidation. *J Biomed Mater Res A*, Vol. 77: 380-389.
- Weiser, W. Y., Temple, P. A., Witek-Giannotti, J. S., Remold, H. G., Clark, S. C., David, J. R. (1989). Molecular cloning of a cDNA encoding a human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 86: 7522-7526.
- Witte, M. B., Barbul, A. (2002). Role of nitric oxide in wound repair. *Am J Surg*, Vol. 183: 406-412.
- Wynn, T. A. (2004). Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol*, Vol. 4: 583-594.
- Xu, L., Li, Y., Sun, H., Zhen, X., Qiao, C., Tian, S., Hou, T. (2013). Current developments of macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibitors. *Drug Discov Today*, Vol. 18: 592-600.
- Yucel-Lindberg, T., Bage, T. (2013). Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med*, Vol. 15: e7.
- Zdolsek, J., Eaton, J. W., Tang, L. (2007). Histamine release and fibrinogen adsorption mediate acute inflammatory responses to biomaterial implants in humans. *J Transl Med*, Vol. 5: 31.
- Zhao, Q., Topham, N., Anderson, J. M., Hiltner, A., Lodoen, G., Payet, C. R. (1991). Foreign-body giant cells and polyurethane biostability: in vivo correlation of cell adhesion and surface cracking. *J Biomed Mater Res*, Vol. 25: 177-183.
- Zhao, Y., Shimizu, T., Nishihira, J., Koyama, Y., Kushibiki, T., Honda, A., Watanabe, H., Abe, R., Tabata, Y., Shimizu, H. (2005). Tissue regeneration using macrophage migration inhibitory factor-impregnated gelatin microbeads in cutaneous wounds. *Am J Pathol*, Vol. 167: 1519-1529.
- Zunic, G., Colic, M., Vuceljic, M. (2009a). Nitrite to nitrate molar ratio is inversely proportional to oxidative cell damages and granulocytic apoptosis at the wound site following cutaneous injury in rats. *Nitric Oxide*, Vol. 20: 264-269.
- Zunic, G., Supic, G., Magic, Z., Draskovic, B., Vasiljevska, M. (2009b). Increased nitric oxide formation followed by increased arginase activity induces relative lack of arginine at the wound site and alters whole nutritional status in rats almost within the early healing period. *Nitric Oxide*, Vol. 20: 253-258.