

**NAU NOM VE U MEDICINSKOG FAKULTETA
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

Na sednici Nau nog ve a Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 31.01.2014. godine, određena je komisija za ocenu završene doktorske disertacije kandidata mr sc. med. Slavka Mojsilovi a, pod nazivom „**Uticaj interleukina-17 na mezenhimske mati ne elije kostne srži miša u *in vitro* uslovima**“.

Mentor za izradu doktorske disertacije je prof. dr Vladimir Trajkovi , dok je komentor nau ni savetnik dr Diana Bugarski.

Imenovana je Komisija u sastavu:

1. Prof. dr Dušan Popadi , Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
2. Prof. dr Aleksandra Isakovi , Institut za medicinsku i klini ku biohemiju, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu
3. Dr Aleksandra Jaukovi , nau ni saradnik, Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu.

Nakon detaljnog pregleda priložene dokumentacije, konsultacija sa mentorom, komentorom i kandidatom, a prema kriterijumima za ocenu doktorske disertacije, članovi komisije Nau nom ve u Medicinskog fakulteta u Beogradu jednoglasno podnose slede i

IZVEŠTAJ

A. Prikaz sadržaja doktorske disertacije:

Doktorska disertacija „Uticaj interleukina-17 na mezenhimske mati ne elije kostne srži miša u *in vitro* uslovima“ podeljena je u sedam poglavlja: Uvod (26 strana), Ciljevi istraživanja (4 strane), Materijal i metode (18 strana), Rezultati (26 strana), Diskusija (12 strana), Zaključci (2 strane) i Literatura (24 strane). Disertacija uključuje 29 slika, 2 tabele, kao i 222 citata iz nau nih asopisa.

UVOD se sastoji iz 2 celine i ilustrovan je sa 4 slike. Prvi deo se odnosi na mezenhimske mati ne elije, pojam, karakteristike i njihovu ulogu u organizmu. Opisan je

istorijat otkrića matinih ćelija, od matinih ćelija hematopoeze do indukovanih pluripotentnih matinih ćelija. Izneta je problematika definisanja pojma matinih ćelija i data radna definicija mezenhimskih matinih ćelija. Iznete su i specifičnosti mišjeg sistema, pri čemu je skrenuta pažnja na posebne probleme u izolovanju i radu sa mišjim mezenhimskim matinih ćelijama. Jedna od osnovnih karakteristika matinih ćelija je sposobnost diferencijacije u više ćelijskih linija, pa je u daljem tekstu detaljno objašnjen ovaj proces i specifičnosti vezane za diferencijaciju mezenhimskih matinih ćelija i navedena su tkiva iz kojih je danas moguće izolovati mezenhimske matine ćelije. Na kraju prvog dela detaljno su opisana najnovija saznanja o ulogama mezenhimskih matinih ćelija u regulaciji hematopoeze i imunskog odgovora. U drugom delu poglavlja opisani su struktura, funkcija i mehanizmi delovanja interleukina-17 (IL-17), plejotropnog citokina sa značajnim ulogama u mnogim fiziološkim i patološkim procesima. Dat je pregled značajnih otkrića koja su dovela do sadašnjih saznanja o strukturi i funkciji IL-17 receptor-ligand familije. Navedeni su do sada poznati izvori ovog citokina i faktori koji regulišu njegovu produkciju. Zatim su objašnjeni mehanizmi prenosa signala preko IL-17 receptora. Detaljno su opisani mnogobrojni biološki efekti IL-17, uključujući i ulogu u odbrani organizma, kao i održavanju homeostaze. Na kraju, izneta su dosadašnja saznanja o delovanju ovog citokina na mezenhimske matine ćelije.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA su jasno definisani i obuhvataju pre svega izolaciju mezenhimskih matinih ćelija iz kostne srži miša (mBM-MSC) i njihovu karakterizaciju koja obuhvata adhezivnost, određene fenotipske karakteristike, sposobnost višelinijске diferencijacije, imunomodulatornu sposobnost i kapacitet održavanja hematopoeze. Sledeći segment istraživanja se odnosi na analizu uticaja IL-17 na navedene karakteristike mBM-MSC, njihovu proliferaciju, kao i na ispitivanje mehanizama delovanja ovog citokina na mBM-MSC, uključujući i aktivaciju specifičnih signalnih puteva i ulogu NO kao posrednika u ovim efektima.

U poglavlju **MATERIJAL I METODE** detaljno i jasno su opisane sve metode koje su korišćene u različitim segmentima istraživanja u skladu sa postavljenim ciljevima. Opisan je postupak izolovanja mBM-MSC CBA soja miševa. Za određivanje uсталosti i klonogene sposobnosti mBM-MSC korišćen je CFU-F test, dok je proliferativna aktivnost određivana MTT testom. Ekspresija karakterističnih markera analizirana je primenom tehnike imunofluorescentne mikroskopije za proteinske antigene, odnosno RT-PCR tehnikom za genske markere. Diferencijacija u pravcu hondrogene, osteogene, adipogene i miofibroblastne linije indukovana je odgovarajućim medijumima, a stepen diferencijacije je odreivan

citohemijskim i imunofluorescentnim bojenjem, kao i tehnikom RT-PCR. Imunomodulatorna svojstva ispitivana su testovima mitogenom stimulirane proliferacije limfocita i mešane limfocitne reakcije. Kapacitet održavanja hematopoeze analiziran je u sistemu dugotrajne kulture kostne srži, određivanjem broja ukupnih ćelija u kulturi, opredeljenih hematopoetskih progenitora i morfološki prepoznatljivih ćelija hematopoeze. Uticaj IL-17 na aktivaciju signalnih puteva ispitivan je detektovanjem nivoa aktivacije signalnih molekula korišćenjem Western blot metode i primenom odgovarajućih farmakoloških inhibitora signalnih puteva. Uloga NO kao medijatora u efektima IL-17 analizirana je određivanjem stepena ekspresije iNOS i eNOS gena RT-PCR metodom, merenjem produkcije NO u kulturama Griess-ovom reakcijom i korišćenjem L-NAME kao neselektivnog inhibitora NO sintaza. Rezultati su analizirani odgovarajućim metodama deskriptivne i analitičke statistike. Za određivanje verovatnoće značajnosti razlike između dva uzorka korišćen je Student t-test u slučaju normalne raspodele podataka, dok je za uzorke koji nisu pokazivali normalnu raspodelu podataka korišćen Mann-Whitney test. Normalnost raspodele je testirana Kolmogorov-Smirnov testom. Za statističku obradu korišćeni su programi Microsoft Excel i Origin Pro 8. Verovatnoća nulte hipoteze manja od 0,05 smatrana je statistički značajnom.

U poglavlju **REZULTATI** su kroz devet poglavlja sistematično i detaljno prikazani rezultati istraživanja. Dobijeni rezultati su prikazani na 25 slika dopunjenih pratećim tekstualnim objašnjenjima. Detaljan opis dobijenih rezultata dat je u odeljku B. ovog izveštaja.

U poglavlju **DISKUSIJA** kandidat je na sveobuhvatan i detaljan način povezoao rezultate ovog istraživanja sa rezultatima sličnih istraživanja objavljenih u međunarodnim naučnim časopisima. Na osnovu toga, kandidat je izneo svoje zaključke i hipoteze koji objašnjavaju rezultate ove doktorske disertacije u kontekstu rezultata drugih autora koji imaju isti naučni interes. Rezultati istraživanja koja su izvedena po prvi put i o kojima ne postoje dostupni podaci u naučnoj literaturi, objašnjeni su na odgovarajući način.

U poglavlju **ZAKLJUČCI** navedeni su najznačajniji zaključci koji su potpuno u skladu sa navedenim ciljevima istraživanja i dobijenim rezultatima.

U poglavlju **LITERATURA** navedene su 222 bibliografske jedinice iz stranih i domaćih publikacija, uključujući i publikacije kandidata, koje su citirane vankuverskim stilom.

B. Opis postignutih rezultata

Rezultati ovog istraživanja ukazali su da elije izolovane iz kostne srži CBA miševa na opisani način i umnožene višestrukim pasažiranjem, pokazuju karakteristike mezenhimalnih matičnih elija u skladu sa kriterijumima Komiteta za mezenhimalne matične elije Međunarodnog društva za elijsku terapiju, i to: adhezivnost za plastiku, prisustvo karakterističnih mezenhimalnih markera, odsustvo hematopoetskih linijskih markera i sposobnost diferencijacije u najmanje 3 različite mezenhimalne linije. Morfološki, mBM-MSC su imale izgled i osobine adherentnih elija u kulturi i nakon 7 do 10 dana formirale su pojedinačne kolonije (CFU-F). Broj CFU-F kolonija je bio linearno zavisen od broja zasejanih elija i njihova učestalost je bila u proseku 8,1 kolonija na milion zasađenih elija kostne srži. Fenotipski, mBM-MSC su ispoljavale karakteristične mezenhimalne markere, endoglin, vimentin, α -SMA, fibronektin i STRO-1, kao i gene za vimentin, α -SMA, fibronektin i Snail-1. Markeri hematopoetskih elija, CD5, CD45R/B220, CD11b, Gr-1, TER-119 i 7/4, nisu bili ispoljeni na ovim elijama. Odsustvo kontaminiranih elija hematopoeze me u mBM-MSC je potvrđeno i pomoću testa formiranja kolonija poreklom od opredeljenih hematopoetskih progenitora u polu vrstoj podlozi, gde nakon druge pasaže nije bilo prisutnih kolonija na 100.000 zasađenih elija. Sposobnost višelinijске diferencijacije je potvrđena uspešnim indukovanim diferencijacijama u hondrogene, osteogene, adipogene i miofibroblastne linije, što je pokazano specifičnim bojenjima na glikozaminoglikane, alkalnu fosfatazu, lipine kapi i α -SMA.

U narednom delu ispitivan je uticaj IL-17 na mBM-MSC. Prvo je Western Blot metodom pokazano prisustvo receptora za IL-17 na ovim elijama. Kako bi se utvrdilo da li IL-17 utiče na osnovne osobine matičnosti ovih elija, analizirani su efekti ovog citokina na imunofenotipske karakteristike i potencijal višelinijске diferencijacije mBM-MSC. Ekspresija ispitivanih markera, Stro-1, vimentina i α -SMA bila je pozitivna i nakon petodnevne kultivacije sa IL-17, kao i kapacitet diferencijacije u osteoblaste i adipocite, što je potvrđeno kako specifičnim citohemijskim bojenjem, tako i ekspresijom karakterističnih gena osteogene, odn. adipogene diferencijacije, poput Cbfa-1, osteokalcina i PPAR 1. Dalja istraživanja su bila usmerena na ispitivanje uticaja IL-17 na proliferaciju i klonogeni potencijal mBM-MSC, samostalno i u kombinaciji sa baznim fibroblastnim faktorom rasta (bFGF), s obzirom da je ovaj faktor sastavni deo medijuma za ekspanziju ovih elija kao stimulator rasta mezenhimalnih matičnih elija. Iako oba ova faktora, sama i u kombinaciji,

nisu imala statistički značajnog uticaja na formiranje CFU-F kolonija, proliferacija mBM-MSC je bila značajno veća u odnosu na kontrolu nakon 3 i 6 dana kultivacije u prisustvu kako IL-17, tako i bFGF, mada bez aditivnog efekta kombinacije ova dva faktora.

Analizom fosforilacije signalnih molekula značajnih za proliferaciju mezenhimskih matičnih ćelija, poput protein tirozin kinaza (PTK) i mitogenom aktiviranih protein kinaza (MAPK), kao i korišćenjem specifičnih inhibitora ovih puteva, došlo se do zaključka da su u mehanizme delovanja IL-17 i bFGF na proliferaciju mBM-MSC uključeni p38 i ERK MAPK signalni putevi. Iako nivo fosforilacije ERK nije bio značajno povećan nakon kultivacije u prisustvu samog IL-17, uloga ovog signalnog puta je potvrđena korišćenjem selektivnog inhibitora, PD98059, u njegovom prisustvu je izostao stimulatívni efekat ovog citokina na proliferaciju mBM-MSC. Za razliku od ova dva signalna puta, ekspresija JNK MAPK je bila izrazito niska, kako u kontrolnim uslovima tako i nakon stimulacije, dok je konstitutivna ekspresija fosfotirozina u ovim ćelijama ostala nepromenjena nakon kultivacije u prisustvu IL-17 i/ili bFGF. Specifični inhibitori ovih puteva takođe nisu imali uticaja na proliferaciju mBM-MSC u prisustvu IL-17 i/ili bFGF.

U daljem toku istraživanja ispitivana je sposobnost mBM-MSC da podržavaju hematopoezu *in vitro* u sistemu dugotrajne kulture kostne srži, kao i uticaj IL-17 na ovu sposobnost. Pokazano je da se nakon sedam dana u kokulturi mBM-MSC i neadherentne frakcije mononuklearnih ćelija kostne srži formiraju kolonije ćelija slične kalcitrini koje predstavljaju najranije hematopoetske prethodnike *in vitro*. Ove formacije su se održavale i nakon tri nedelje kultivacije ćelija. Pozitivan uticaj IL-17 na ovu sposobnost mBM-MSC ogledao se i u većem broju kako ukupnih neadherentnih ćelija, tako i opredeljenih progenitora i morfološki prepoznatljivih prekursora hematopoeze, određeni nakon 7 i 14 dana u kokulturi sa IL-17 pretretiranim mBM-MSC.

Kako je jedan od mogućih medijatora preko kojih IL-17 ostvaruje svoje dejstvo na ćelije hematopoeze i NO, u daljem radu je ispitivan uticaj IL-17 na ekspresiju proteina i iRNK za endotelnu i inducibilnu NO sintazu (eNOS, odn. iNOS) u mBM-MSC, kao i produkcija NO u sistemu dugotrajne kulture kostne srži. Iako je nivo produkcije NO bio na granici detektabilnosti Grisovom metodom, a eNOS i iNOS proteini nisu detektovani u lizatu mBM-MSC Western blot tehnikom, RT-PCR metodom je detektovana ekspresija gena za obe izoforme. Nakon 6h kultivacije sa IL-17, pokazano je značajno povećanje ekspresije iRNK za eNOS.

U završnom delu su prikazani rezultati ispitivanja imunomodulatornog potencijala mBM-MSC i uticaj IL-17 na tu sposobnost. U kokulturi sa elijama slezine singenih miševa, kako kontrolne, tako i IL-17 pretretirane mBM-MSC, nisu uticale na proliferaciju fitohemaglutininom (PHA) stimulisanih slezinskih limfocita. U cilju dalje analize imunomodulatorne sposobnosti ovih elija odredio se njihov uticaj na mitogenom i aloantigenom stimulisanu proliferaciju humanih limfocita. U ovom sistemu mBM-MSC su inhibirale proliferaciju PHA stimulisanih humanih mononuklearnih elija periferne krvi na doznno zavisanoj na in, dok su u sistemu dvosmerne mešane limfocitne reakcije (MLR) imale dvojak efekat. U prisustvu ve eg broja mBM-MSC, proliferativni odgovor na alogene limfocite u mešanoj kulturi je bio smanjen, dok je u prisustvu manjeg broja ovih elija, aloantigeni odgovor limfocita bio pojačan.

C. Uporedna analiza rezultata kandidata sa rezultatima iz literature

Korišćenje mišjeg modela u izučavanju biologije mezenhimskih matičnih elija ima kako svoje prednosti, tako i mane. S jedne strane, miš je dobar model za izučavanje različitih strategija elijske terapije zasnovanih na mezenhimskim matičnim elijama, kako zbog postojanja već razvijenih eksperimentalnih modela bolesti i ustanovljenih paralela između mišje i humane fiziologije i patologije, tako i zbog relativno jednostavnih procedura za manipulaciju mišjim genomom. Međutim, izolacija i prečišćenje mezenhimskih matičnih elija, posebno iz kostne srži, kod miševa predstavlja mnogo veću izazov nego kod drugih vrsta. Jedan od glavnih problema je mnogo manja učestalost mezenhimskih matičnih elija u kostnoj srži miša u odnosu na druge vrste, koja se, u zavisnosti od soja, prema literaturnim podacima kreće od 0,3 do 45 na milion elija kostne srži (Friedenstein i sar., 1976; Phinney i sar., 1999; Mojsilović i sar., 2011). Pored toga, velike međusobne razlike postoje u proliferativnom kapacitetu, potencijalu za diferencijaciju, ekspresiji površinskih markera i optimalnim uslovima kultivacije (Phinney i sar., 1999; Peister i sar., 2004; Eslaminejad i sar., 2006). Nepostojanje jedinstvenog protokola za izolaciju i kultivaciju mišjih mezenhimskih matičnih elija dodatno doprinosi razlikama u rezultatima različitih laboratorija. Prema do sada dostupnim podacima, u ovom radu je po prvi put opisana izolacija i karakterizacija mezenhimskih matičnih elija iz kostne srži miša CBA soja. Koristi se opisana metodologija, nakon nekoliko pasaja, dobijena je populacija mezenhimskih matičnih elija koja je zadovoljavala kriterijume Komiteta za mezenhimske matične elije Međunarodnog društva za

elijsku terapiju (Dominici i sar., 2006), budu i da su navedene elije rasle kao adherentne na plasti noj podlozi, ispoljavale su karakteristi ne mezenhimske markere, nisu bile kontaminirane elijama hematopoetskih linija i pokazivale su višelinijski potencijal za diferencijaciju.

U skladu sa postoje im podacima o ispoljavanju receptora za IL-17 na razli itim stromalnim elijama, uklju uju i i humane mezenhimske mati ne elije (Silva i sar., 2003; Huang i sar., 2009), u ovom radu je pokazana ekspresija ovog receptora na mBM-MSC. Rezultati dobijeni ovim istraživanjem su potvrdili ranija zapažanja da su IL-17 i bFGF važni faktori rasta stromalnih elija (Bianchi i sar., 2003; Huang i sar., 2006) i ukazali na to da ova dva medijatora ne uti u na mezenhimski karakter mBM-MSC *in vitro*. Bazni FGF se esto dodaje medijumima za kulture kako bi stimulisao proliferaciju razli itih tipova elija uklju uju i i BM-MSC. Poznato je da bFGF pove ava potencijal proliferacije i životni vek humanih mezenhimskih mati nih elija tokom ekspanzije *in vitro*, uz o uvanje njihovog višelinijskog potencijala diferencijacije (Bianchi i sar., 2003; Solchaga i sar., 2005; Sotiropulou i sar., 2006; Levy i sar., 2008). Što se ti e podataka o uticaju IL-17 na diferencijaciju mezenhimskih mati nih elija, rezultati se razlikuju u zavisnosti od primenjenog modela. Tako je pokazano je da IL-17 poja ava osteogenu diferencijaciju humanih mezenhimskih mati nih elija (Huang i sar., 2009), dok, s druge strane, inhibira adipogenu diferencijaciju ovih elija, ali poja ava adipogenezu mišjih mezenhimskih mati nih elija (Shih i sar., 2009; Lee i sar., 2011). Tako e, IL-17 menja diferencijacionu opredeljenost mišje multipotentne elijske linije, C2C12, tako što inhibira miogenu, a indukuje osteogenu diferencijaciju (Koci i sar., 2012).

Rezultati ovog istraživanja su u skladu sa objavljenim podacima koji pokazuju da IL-17 zna ajno stimuliše *in vitro* formiranje CFU-F kolonija stromalnih elija humane kostne srži, ali je kod miševa ovaj stimulatorni efekat prime en samo *in vivo* i to uz prethodno ošte enje hematopoetskog sistema mijeloablativnim dozama zra enja (Huang i sar., 2006; Huang i sar., 2009). U ovom istraživanju, IL-17 je uzrokovao dozno zavisno, mada ne i statisti ki zna ajno, pove anje broja CFU-F kolonija. Sam bFGF nije zna ajno uticao na formiranje CFU-F kolonija, ali je doveo do pove ane proliferacije mBM-MSC, što je saglasno ve pokazanoj ulozi bFGF kao faktora rasta humanih MSC (Sotiropoulou i sar., 2006; Levy i sar., 2008). Tako e, IL-17 je stimulisao proliferaciju mBM-MSC. Me utim, u eksperimentalnim uslovima primenjenim u ovim istraživanjima, zajedni ko delovanje IL-17 i bFGF nije dovelo do aditivnog stimulativnog efekta na proliferaciju mBM-MSC. Kandidat ovaj nedostatak

kooperacije objašnjava mogu im preklapanjem signalnih puteva, na sli an na in kao što je objašnjen nedostatak sinergizma između IL-17 i IL-1 pri aktivaciji iNOS (Miljković i Trajković, 2004).

Od signalnih puteva koji imaju važnu ulogu u proliferaciji mBM-MSC, a koje pokreću ova dva faktora, u ovom radu je ispitivano učestvovanje PTK i MAPK. Iako su PTK dobro poznate kao važni medijatori elijske proliferacije, njihovo učestvovanje u aktivnosti IL-17 i bFGF na proliferaciju BM-MSC nije pokazano u ovom modelu. Dosadašnja istraživanja signalizacije IL-17 su pokazala da se brojni efekti ovog citokina na različite tipove elija ostvaruju preko aktivacije svih tri tipa MAPK, ERK, JNK i p38, ali na način specifičan za svaki pojedinačni elijski tip (Miljković i Trajković, 2004; Gaffen, 2009). Rezultati ovog istraživanja pokazuju važnu ulogu p38 i ERK MAPK signalnih puteva i u proliferativnoj aktivnosti IL-17 na mBM-MSC. Ovo je u saglasnosti sa prethodnim nalazima da IL-17 pojačava fosforilaciju p38 MAPK u ukupnim elijama kostne srži (Krstić i sar., 2009), kao i sa nalazima da je IL-17 indukovana proliferacija humanih BM-MSC regulisana aktivacijom MEK-ERK puta (Huang i sar., 2009). Što se tiče bFGF indukovanih signalnih puteva, iako je ranije pokazano da je proliferacija različitih elijskih tipova, uključujući i fibroblaste, stimulirana od strane bFGF, zavisna od aktivacije p38 MAPK (Maher, 1999; Garcia-Maya i sar., 2006), učestvovanje ove MAPK u proliferativnom delovanju bFGF na mišje BM-MSC je prvi put pokazano u ovoj studiji.

Stromalne elije se razlikuju u sposobnosti podržavanja hematopoeze i mali je procenat onih koji mogu da održe dovoljan broj primitivnih matičnih elija hematopoeze sposobnih za dugotrajno obnavljanje hematopoeze odraslog miša (Wineman i sar., 1996). Deksterov metod kultivisanja hematopoetskih elija zajedno sa slojem adherentnih stromalnih elija kostne srži (Dexter i sar., 1977) široko je prihvaćen za ispitivanje bioloških karakteristika hematopoetskih elija *in vitro* (Petakov i sar., 1998; van Os i sar., 2008), kao i za ispitivanje kvaliteta stromalnih elija (Epperly i sar., 2005; Weisel i sar., 2006; Tujapukrkar i sar., 2012). Prisustvo elija koje formiraju kolonije slične kaldrmi (eng. *cobblestone area-forming cells*) sedmog dana kokulture ukazuje na uspešno uspostavljanje ovog sistema sa mBM-MSC. Efekti IL-17 na hematopoezu, kao i neophodno prisustvo akcesornih elija u ostvarivanju ovih efekata, prepoznati su na samom početku izučavanja IL-17 (Fossiez i sar., 1996). Rezultati ove studije su pokazali da je u kokulturama sa IL-17 pretretiranim mBM-MSC, nakon 7 i 14 dana, ukupan broj hematopoetskih elija, ukupnih opredeljenih progenitora, apsolutni broj CFU-GM, kao i broj zrelijih prethodnika granulocitne loze, bio veći u odnosu

na kokulture sa kontrolnim, netretiranim mBM-MSC. Ovo je u skladu sa mnogim podacima iz literature koji ukazuju da IL-17 poveća broj različitih tipova opredeljenih progenitora uključujući i zajednički progenitor za mijeloidnu lozu (CFU-GEMM), opredeljeni progenitor za granulocitno-monocitnu lozu (CFU-GM) i mladi progenitor opredeljen za eritroidnu lozu (BFU-E), kao i zrelih granulocita u različitim *in vitro* i *in vivo* mišjim modelima (Jović i sar., 2001; Schwarzenberger i sar., 1998; Krstić i sar., 2010). Slično, u kokulturi humanih CD34⁺ ćelija sa humanim BM-MSC, nakon 5 dana kultivacije u prisustvu različitih koncentracija IL-17, došlo je do povećanja procenta BFU-E i CFU-GM kao i apsolutnog broja ukupnih opredeljenih progenitora u odnosu na netretirane kokulture (Krstić i sar., 2009).

Prethodne studije ukazuju na ulogu NO u efektima IL-17 na ćelije hematopoeze (Bugarski i sar., 2004; Krstić i sar., 2009). Tako je pokazano da IL-17 stimuliše ekspresiju iRNK za eNOS u ukupnim ćelijama kostne srži (Krstić i sar., 2009), kao i da se eNOS prevashodno ispoljava u stromalnim ćelijama kostne srži (Angulo i sar., 1995; Helfrich i sar., 1997; Li i sar., 2002; Krasnov i sar., 2008). Iako definitivna potvrda uloge ove izoforme NO sintaze kao posrednika u efektima IL-17 na hematopoezu preko BM-MSC zahteva detaljnija ispitivanja, rezultati ovog rada koji pokazuju povećanje ekspresije iRNK za eNOS u mBM-MSC pod uticajem IL-17 svakako idu u prilog toj pretpostavci.

Imunoregulatorna uloga MSC je jedna od značajnih karakteristika ovih ćelija koja pruža velike mogućnosti i za kliničku primenu. Iako je imunosupresivni efekat MSC pokazan u mišjim *in vitro* i *in vivo* modelima (Carrión i sar., 2011; Zappia i sar., 2005; MacDonald i sar., 2011; Tuljapurkar i sar., 2012; Ren i sar., 2008; Ren i sar., 2009; Sun i sar., 2003; English i sar., 2007), u ovom istraživanju nije detektovan značajan uticaj mBM-MSC na proliferaciju PHA-stimulisanih mišjih ćelija slezine. Ipak, u dvosmernoj MLR, kao i PHA-stimulisanoj proliferaciji humanih mononuklearnih ćelija krvi, mBM-MSC su pokazale imunosupresivni efekat. Kao moguće uzroke ovakvog različitog odgovora ćelija slezine miša u odnosu na humane ćelije periferne krvi kandidat navodi moguće različite mehanizme supresije mišjih i humanih limfocita, potencijalnu različitu osetljivost ove dve vrste ćelija prema inhibitornim medijatorima produkovanim od strane mBM-MSC, veću heterogenost ćelija slezine u odnosu na mononuklearne periferne krvi i različiti aktivacioni status ova dva tipa respondera. Imunomodulatorni efekat mezenhimskih matičnih ćelija zavisi od mnogih faktora, poput prisustva inflamatornih citokina i hemokina (Krampera i sar., 2006; Ren i sar., 2008), različitih TLR agonista (DelaRosa i Lombardo, 2010; Waterman i sar., 2010), stepena aktivacije limfocita (Carrión i sar., 2011), mitogena koji je korišćen za stimulaciju (Le Blank i

sar., 2003) i drugo. U mišjem sistemu, NO igra glavnu ulogu u supresiji proliferacije limfocita od strane mezenhimskih matičnih ćelija (Li i sar., 2012; Ren i sar., 2009; Sato i sar., 2007), pa niske koncentracije NO, koje su bile na granici detektabilnosti primenjenog testa, mogu donekle da objasne izostanak supresije mišjih ćelija slezine od strane mBM-MSC.

D. Objavljeni radovi koji su povezani sa doktorskom disertacijom

1. Mojsilović S, Krstić A, Ilić V, Okrić I, Kocić J, Trivanović D, Santibañez JF, Jović G, Bugarski D. IL-17 and FGF signaling involved in mouse mesenchymal stem cell proliferation. *Cell Tissue Res.* 2011;346(3):305-16

E. Zaključak (obrazloženje naučnog doprinosa disertacije)

Rezultati ove doktorske disertacije predstavljaju originalan, aktuelan i značajan naučni doprinos rasvetljavanju delovanja IL-17 na različite karakteristike mezenhimskih matičnih ćelija kostne srži, uključujući i fenotip, kapacitet za proliferaciju, diferencijaciju u pravcu različitih mezenhimskih linija, regulaciju hematopoeze i imunomodulatorna svojstva i pružaju nova saznanja o ovim efektima IL-17. Takođe, određivanje uloge određenih medijatora i signalnih puteva koji učestvuju u regulaciji ovih efekata značajno doprinosi razjašnjavanju mehanizma delovanja IL-17 na mezenhimske matične ćelije. Dobijeni podaci podvlače kompleksnost biologije mezenhimskih matičnih ćelija i njihove interakcije sa faktorima sredine, kao i specifičnosti mišjih u odnosu na humane sisteme, otvaraju i put za dalja istraživanja u cilju pronalaženja najboljih modaliteta potencijalnih primena ovih ćelija u terapijske svrhe.

F. Predlog komisije za ocenu završene doktorske disertacije

Doktorska disertacija pod nazivom „**Uticaj interleukina-17 na mezenhimske matične ćelije kostne srži miša u *in vitro* uslovima**“, kandidata mr sci. med. dr Slavka Mojsilovića, po svom sadržaju i formi, dobro napisanom uvodnom delu, jasno postavljenim istraživačkim ciljevima, dobro osmišljenoj metodologiji, precizno iznetim rezultatima rada, razložnoj diskusiji i dobro formulisanim zaključcima ispunjava sve kriterijume dobro napisanog naučnog rada.

Stoga, Komisija sa zadovoljstvom predlaže Naučnom veće u Medicinskom fakultetu u Beogradu da prihvati doktorsku disertaciju pod nazivom „**Uticaj interleukina-17 na mezenhimske matične ćelije kostne srži miša u *in vitro* uslovima**“, kandidata mr sci. med. dr Slavka Mojsilovića i odobri javnu odbranu.

Mentor:

Prof. dr Vladimir Trajković

Komentor:

Dr Diana Bugarski, naučni savetnik

Članovi Komisije

Prof. dr Dušan Popadić

Prof. dr Aleksandra Isaković

Dr Aleksandra Jauković, naučni saradnik