

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA KRAMBERGER
MAGISTRSKA NALOGA
MAGISTRSKI PROGRAM LABORATORIJSKA BIOMEDICINA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA KRAMBERGER

**VREDNOTENJE IMUNOSUPRESIVNEGA DELOVANJA ČLOVEŠKIH
MEZENHIMSKIH/STROMALNIH MATIČNIH CELIC, PRIDOBLJENIH IZ
RAZLIČNIH TKIV, *IN VITRO***

***IN VITRO* EVALUATION OF IMMUNOSUPPRESSIVE ACTIVITY OF HUMAN
MESENCHYMAL/STROMAL STEM CELLS ISOLATED FROM DIFFERENT
TISSUES**

MASTER'S STUDY LABORATORY BIOMEDICINE

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za klinični biokemijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvomizr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorjuizr. prof. dr. Matjažu Jerasu, mag. farm. in dr. Ariani Barlič, univ. dipl. biol. za strokovno usmerjanje in pomoč pri izvedbi magistrske naloge, podjetju Educell d.o.o. za darovane mezenhimske matične celice, družini ter prijateljem za podporo med pisanjem naloge.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izvedla pod mentorstvomizr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm.

Urška Kramberger

Predsednica izpitne komisije:izr. prof. dr. Anamarija Zega

Član izpitne komisije: asist. dr. Nanča Čebren Lipovec

Kazalo vsebine

KAZALO PREGLEDNIC.....	5
KAZALO SLIK.....	5
POVZETEK	7
ABSTRACT	8
SEZNAM OKRAJŠAV.....	9
1.1 Človeške mezenhimske stromalne celice (MMC).....	1
1.2 Mehanizmi vplivov MMC na imunske odzive.....	2
1.2.1 Vpliv MMC na limfocite T.....	3
1.2.2 Vpliv MMC na dendritične celice (DC)	6
1.2.3 Vpliv MMC na makrofage.....	6
1.2.4 Vpliv MMC na naravne celice ubijalke (celice NK).....	6
1.2.5 Vpliv MMC na limfocite B.....	7
1.2.6 Topni dejavniki MMC, vpleteni v imunsko regulacijo.....	7
1.2.7 Imunoregulatorne vloge površinsko izraženih molekul na MMC.....	8
1.3 Klinična uporabnost MMC	9
1.3.1 MMC in akutna bolezen presadka zoper gostitelja (aGvHD).....	10
1.4 Primerjava imunosupresivne učinkovitosti človeških MMC iz različnih tkiv.....	12
1.5 Testi za vrednotenje proliferacije limfocitov T <i>in vitro</i>	13
1.5.1 Radioaktivna metoda za vrednotenje celične proliferacije <i>in vitro</i>	13
1.5.2 Neradioaktivne metode za vrednotenje celične proliferacije <i>in vitro</i>	14
2 NAMEN DELA.....	15
3 MATERIALI IN METODE.....	16
3.1 Materiali in laboratorijska oprema	16
3.1.1 Reagenti.....	16
3.1.2 Aparati in laboratorijska oprema	16
3.2 Priprava delovnih suspenzij monuklearnih celic (MNC).....	17
3.3 Gojenje in tripsinizacija MMC ter priprava celičnih suspenzij MMC, obdelanih z mitomicinom C18	
3.4.1 Ugotavljanje obsega celične proliferacije, izzvane z mitogenskim lektinom PHA, v prisotnosti različnega števila MMC iz različnih tkiv.....	19
3.4.2 Ugotavljanje obsega celične proliferacije v dvosmerni MLC, v prisotnosti različnega števila MMC iz različnih tkiv.....	21
3.5 Zbiranje, izračunavanje in statistična analiza rezultatov	23
4 REZULTATI IN RAZPRAV.....	24
4.1 Morfologije gojenih MMC, izoliranih iz različnih tkivnih virov različnih darovalcev	24
.....	24

4.2 Modulacija proliferacije MNC, izzvane z mitogenskim lektinom PHA	25
4.2.1 Določanje obsegov proliferacije MNC osebe A in B, izzvane s PHA, v prisotnosti MMC, izoliranih iz kostnega mozga dveh darovalcev (KM1 in KM2)	25
4.2.2 Določanje obsegov proliferacije MNC oseb A in B, izzvane s PHA, v prisotnosti MMC, izoliranih iz popkovničnega tkiva dveh darovalcev (PK1 in PK2)	31
4.2.3 Določanje obsegov proliferacije MNC oseb A in B, izzvane s PHA, v prisotnosti MMC, izoliranih iz maščobnega tkiva dveh darovalcev (AD1 in AD2)	35
4.3 Modulacija celične proliferacije, izzvane z aloantigeni v dvosmernih kulturah pomešanih MNC oseb A in B (MLC)	40
4.3.1 Določanje obsegov proliferacije v dvosmernih reakcijah pomešanih MNC oseb A in B (MLR), v prisotnosti MMC, izoliranih iz kostnega mozga dveh darovalcev (KM1 in KM2)	40
4.3.2 Določanje obsegov proliferacije v dvosmernih reakcijah pomešanih MNC oseb A in B (MLR), v prisotnosti MMC, izoliranih iz popkovničnega tkiva dveh darovalcev (PK1 in PK2)	43
4.3.3 Določanje obsegov proliferacije v dvosmernih reakcijah pomešanih MNC oseb A in B (MLR), v prisotnosti MMC, izoliranih iz maščobnega tkiva dveh darovalcev (AD1 in AD2)	45
4.3.4 Ponovljivost rezultatov neradioaktivnega testiranja zaviranja proliferacije pomešanih MNC oseb A in B v dvosmernih MLR, z MMC, izoliranimi iz kostnega mozga dveh darovalcev (KM1 in KM2)	47
4.4 Primerjava imunosupresivnih učinkov MMC iz različnih tkiv na mitogeno in alogensko izzvano proliferacijo MNC različnih oseb	52
5 SKLEP	55
6 LITERATURA	56

KAZALO PREGLEDNIC

<i>Preglednica 1: Uporabljeni reagenti</i>	16
<i>Preglednica 2 Uporabljeni aparati in laboratorijski material</i>	16

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Načrt plošč za ugotavljanje celiče proliferacije MNC oseb A in B, izzvane z mitogenskim lektinom PHA, v odsotnosti prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz kostnega mozga prvega darovalca (KM_i).</i>	19
<i>Slika 2: Načrt plošč za ugotavljanje celične proliferacije MNC oseb A in B, izzvane z mitogenskim lektinom PHA, v odsotnosti in prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz kostnega mozga drugega darovalca (KM_{ii}).</i>	19
<i>Slika 3: Načrt plošč za ugotavljanje celične proliferacije MNC oseb A in B, izzvane z mitogenskim lektinom PHA, v odsotnosti in prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz maščobnega tkiva prvega darovalca (AD_i).</i>	20
<i>Slika 4: Načrt plošč za ugotavljanje celične proliferacije MNC, oseb A in B, izzvane z mitogenskim lektinom PHA, v odsotnosti in prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz maščobnega tkiva drugega darovalca (AD_{ii}).</i>	20

<i>Slika 5: Načrt plošč za ugotavljanje celične proliferacije, oseb A in B, izzvane z mitogenim lektinom PHA, v odsotnosti in prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz popkovničnega tkiva prvega darovalca (PKi).....</i>	<i>20</i>
<i>Slika 6: Načrt plošč za ugotavljanje celične proliferacije, oseb A in B, izzvane z mitogenim lektinom PHA, v odsotnosti in prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz popkovničnega tkiva drugega darovalca (PKii).....</i>	<i>20</i>
<i>Slika 7: Ugotavljanje obsega celične proliferacije v dvosmernih MLC, v prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz kostnega mozga prvega darovalca (KMi).....</i>	<i>21</i>
<i>Slika 8: Ugotavljanje obsega celične proliferacije v dvosmernih MLC, v prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz kostnega mozga drugega darovalca (KMii).....</i>	<i>21</i>
<i>Slika 9: Ugotavljanje obsega celične proliferacije v dvosmernih MLC, v prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz maščobnega tkiva prvega darovalca (ADi).....</i>	<i>22</i>
<i>Slika 10: Ugotavljanje obsega celične proliferacije v dvosmernih MLC, v prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz maščobnega tkiva drugega darovalca (ADii).....</i>	<i>22</i>
<i>Slika 11: Ugotavljanje obsega celične proliferacije v dvosmernih MLC, v prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz popkovničnega tkiva prvega darovalca (PKi).....</i>	<i>22</i>
<i>Slika 12: Ugotavljanje obsega celične proliferacije v dvosmernih MLC, v prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz popkovničnega tkiva drugega darovalca (PKii).....</i>	<i>22</i>
<i>Slika 13: MMC iz kostnega mozga prvega darovalca (KM1), 100-kratna povečava.....</i>	<i>24</i>
<i>Slika 14: MMC iz kostnega mozga drugega darovalca (KM2), 100-kratna povečava.....</i>	<i>24</i>
<i>Slika 15: MMC iz popkovničnega tkiva prvega darovalca (PK1), 100-kratna povečava.....</i>	<i>24</i>
<i>Slika 16: MMC iz popkovničnega tkiva drugega darovalca (PK2), 100-kratna povečava.....</i>	<i>24</i>
<i>Slika 17: MMC iz maščobnega tkiva prvega darovalca (AD1), 100-kratna povečava.....</i>	<i>25</i>
<i>Slika 18: MMC iz maščobnega tkiva drugega darovalca (AD2), 100-kratna povečava.....</i>	<i>25</i>

POVZETEK

Človeške mezenhimske stromalne matične celice (MMC) so odrasle multipotentne matične celice, ki jih lahko izoliramo tako iz odraslih kot iz fetalnih tkiv. MMC imajo širok diferenciacijski potencial, poleg tega pa izkazujejo tudi imunomodulatorne lastnosti, vplivajo namreč na mehanizme prirojene in pridobljene imunosti, posebej izrazit pa je njihov učinek na zaviranje proliferacije in aktivacije limfocitov T. MMC na imunske odzive vplivajo z izločanjem specifičnih topnih dejavnikov in preko celičnih stikov med MMC ter imunskimi celicami. MMC lahko zato ugodno vplivajo na potek imunsko posredovanih bolezni in izboljšajo stanje akutne bolezni presadka zoper gostitelja (aGvHD), ki je glavni zaplet po presaditvi alogenskih krvotvornih matičnih celic (KMC). Sprva so bile MMC izolirane iz kostnega mozga, ker pa je njihovo pridobivanje invazivno, se je pojavilo zanimanje ali MMC, izolirane iz alternativnih tkivnih virov, izražajo podobne diferenciacijske in predvsem imunomodulatorne lastnosti. V okviru magistrske naloge smo si zastavili, da bomo primerjali ali imajo MMC, izolirane iz popkovničnega (PT) in maščobnega tkiva (MT), podobne imunosupresivne učinke *in vitro* kot tiste, izolirane iz kostnega mozga. Za vrednotenje imunosupresivnih učinkov MMC, izoliranih iz različnih tkiv različnih darovalcev, smo uporabili neradioaktivni test z uporabo reagenta MTS, s katerim smo izmerili obseg proliferacije mononuklearnih celic (MNC) dveh oseb. Proliferacijo MNC smo izzvali z mitogenim rastlinskim lektinom fitohemaglutininom (PHA) in z aloantigeni v dvosmernih mešanih kulturah MNC dveh nesorodnih oseb, pri čemer smo ugotovili, da je slednja bolj primerna za vrednotenje imunosupresivnih učinkov MMC *in vitro*. MMC so uspešno zavrle proliferacijo MNC tako po mitogeni kot po stimulaciji z aloantigeni, obseg inhibicije pa je bil odvisen od količine dodanih MMC. Pokazali smo, da imajo MMC iz PT in MT primerljive imunosupresivne učinke na proliferacijo MNC kot tiste iz KM. MMC iz PT pa so izkazale največji učinek med vsemi. Ugotovili smo, da so razlike med imunosupresivnimi učinki posledica lastnosti MNC, lastnosti MMC in njihovih donorjev, kot tudi tkiv, iz katerih so bile MMC izolirane.

KLJUČNE BESEDE: mezenhimske stromalne matične celice (MMC), imunosupresija, kostni mozeg, popkovnično tkivo, maščobno tkivo

ABSTRACT

Human mesenchymal stromal stem cells (MSC) are adult multipotent stem cells, which can be isolated from adult and fetal tissues. MSC have large differential potential and immunomodulatory properties, modulating mechanisms of innate and adaptive immunity, the most significant is their inhibitory effect on activation and proliferation of T lymphocytes. MSC modulate immune responses through the production of soluble factors and through cell to cell contact between MSC and immune cells. Therefore MSC are promising therapy for immune-derived diseases and acute graft versus host disease (aGvHD), which is a major complication after allogenic hematopoietic stem cell (HSC) transplantation. At first, MSC were isolated from bone marrow, but since this procedure is invasive, interest if MSC isolated from alternative tissues possess similar differential and immunomodulatory properties is arising. In this study our goal was to evaluate if MMC, isolated from umbilical cord matrix and adipose tissue express comparable immunosuppressive properties than those derived from bone marrow. We evaluated immunomodulatory activity of MMC, isolated from different tissues and derived from different donors, with non-radioactive functional cell proliferative assay using MTS to determine peripheral blood mononuclear cell (PBMC) proliferation. PBMCs were stimulated with mitogen phytohemagglutinin (PHA) and with alloantigens in two-way mixed PBMCs culture of unrelated donors. Allogenic stimulation was more suitable for evaluation of MMC immunosuppressive activity *in vitro*. MMC successfully inhibited proliferation of PBMCs induced by mitogens or alloantigens in a dose-dependent fashion. Our results showed that MMC isolated from umbilical cord matrix and adipose tissue have comparable immunosuppressive effects than those derived from bone marrow. MMC from umbilical cord matrix displayed the most prominent effect. Differences we observed in immunosuppressive activity of MSC were due to individual properties of PBMCs, properties of MSC and their donors and as well as the different origins that MSC were isolated from.

KEY WORDS: mesenchymal stromal stem cells (MSC), immunosuppression, bone marrow, umbilical cord matrix, adipose tissue

SEZNAM OKRAJŠAV

aGvHD	akutna bolezen presadka zoper gostitelja (ang. acute graft versus host disease)
APC	antigene predstavljajoče celice
CD	označevalec celične pripadnosti (ang. cluster of differentiation)
DC	dendritične celice
DMEM/F12	Dulbeccov rastni medij/hranilna mešanica F12 (ang. Dulbecco's modified medium)
DPBS	Dulbeccov fosfatni pufer
FBS	fetalni goveji serum (ang. fetal bovine serum)
GvHD	bolezen presadka zoper gostitelja (ang. graft versus host disease)
KM	kostni mozeg
KMC	krvotvorne matične celice
MHC	molekule poglavitnega kompleksa tkivne skladnosti (ang. major histocompatibility complex)
MLC	mešana kultura mononuklearnih celic
MLR	mešana reakcija mononuklearnih celic
MMC	mezenhimske stromalne matične celice
MNC	mononuklearne celice iz periferne krvi
MT	maščobno tkivo
NK	naravne celice ubijalke
PHA	fitohemaglutinin, rastlinski mitogenski lektin
PT	popkovnično tkivo
TCR	T-celični receptor
TLR	Tollu podoben receptor

1 UVOD

1.1 Človeške mezenhimske stromalne celice (MMC)

Mezenhimske stromalne matične celice so raznolika skupina odraslih multipotentnih matičnih celic, ki so v kulturi *in vitro* morfološko podobne fibroblastom. Izoliramo jih lahko tako iz odraslih (kostni mozeg, maščobno tkivo, zobna pulpa, periferna in menstrualna kri, sklepne ovojnice, skeletno mišičje) kot iz fetalnih tkiv (popkovnično tkivo, popkovnična kri, posteljica, plodovnica). MMC imajo sposobnost samoobnavljanja in diferenciacije v celice mezoderma (hrustančne, mišične, kostne, maščobne in celice vezivnega tkiva) (1,2). Pod ustreznimi pogoji gojenja in v prisotnosti specifičnih rastnih dejavnikov pa so sposobne tudi usmerjenega razvoja v celice ektoderma (kardiomiocite, astrocite, nevrone) in endoderma (hepatocite, β -celice trebušne slinavke) (1,3). Mednarodno združenje za mezenhimske in tkivne matične celice (ang. *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee*) je izdalo naslednje smernice, na osnovi katerih izolirane celice opredelimo kot MMC:

- 1) sposobnost pritrjanja na plastično gojitveno površino (pri standardnih pogojih gojenja v inkubatorju – 37°C, 5% CO₂ v zraku, 95% vlažnost);
- 2) vsaj 95% jih mora izražati označevalce celične pripadnosti CD73, CD90, CD105, obenem pa manj kot 2% molekulske označevalce za krvotvorne matične (KMC) in endotelijske celice (CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 in HLA-DR);
- 3) sposobnost diferenciacije *in vitro* v kostno, hrustančno in maščobno tkivo (4).

Zaradi njihove sposobnosti pritrjanja na gojitveno površino, lahko MMC razmeroma preprosto osamimo, čeprav s tem dobimo precej heterogeno populacijo celic. Izoliramo jih lahko tudi z ločevanjem na gostotnem gradientu (npr. z uporabo Ficoll-a), s pretočno citometrijo, z uporabo specifičnih protiteles in z metodo mejnih redčitev (1,5). Kadar MMC pridobivamo iz tkiv, ki niso kostni mozeg (KM) ali popkovnična kri (PK), jih moramo najprej encimsko razgraditi (1). MMC lahko razmeroma preprosto gojimo *in vitro*, pri čemer v kulturi vzdržujejo stabilen imunofenotip in kromosomsko strukturo ter se tudi po večjem številu pasaž maligno ne spreminjajo (2).

Sprva so MMC uporabljali predvsem v regenerativni medicini, saj imajo širok diferenciacijski potencial, izločajo številne rastne dejavnike in so sposobne migriranja v poškodovana in vneta tkiva. Kmalu pa je postalo jasno, da vplivajo tudi na imunske odzive, še posebej izrazito na aktivacijo in proliferacijo limfocitov T, kar je še povečalo zanimanje zanje (6,7). Klinično uporabnost MMC preizkušajo predvsem na področjih: regeneracije tkiv (hrustančno, mišično,

kostno, vezivno in nevroni), genskih terapij, izboljšanja rezultatov alogenskih presaditev KMC (preprečevanje ali obvladovanje akutne bolezni presadka zoper gostitelja – aGvHD) in zdravljenja različnih imunsko posredovanih bolezni (revmatoidni artritis, sepsa, akutni pankreatitis, multipla skleroza, Crohnova bolezen, ...) (5,7). MMC na svojih površinah le šibko izražajo molekule poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti (MHC) razreda I, ne izražajo pa molekul MHC razreda II in kostimulatornih molekul (B7-1, B7-2, CD40, CD40L), zato so šibko imunogene in ne izzovejo alogenskih imunskih odzivov. Zato lahko uporabimo alogenske MMC "tretje osebe", za katere ni potrebno, da ustrezajo zahtevam glede tkivne skladnosti med darovalcem in prejemnikom (8).

Za MMC je tudi značilno, da migrirajo v tumorsko tkivo, kjer s svojim imunosupresivnim delovanjem tumorskim celicam olajšajo pobeg oz. izogibanje nadzoru imunskega sistema. Ta učinek MMC je seveda neželen in ga ne smemo ignorirati pri načrtovanju njihove uporabe, saj lahko pomembno prispeva k metastaziranju obstoječega tumorja. Obenem pa ta njihova lastnost ponuja možnost, da bi jih lahko uporabili kot dostavni sistem/nosilec za protitumorske učinkovine (9,10). Ugotovili so tudi, da MMC predhodno stimulirane s tumorje nekrotizirajočim dejavnikom alfa (TNF- α), v tumorsko okolje privabljajo monocite/makrofage in tako še dodatno spodbujajo nastanek protivnetnega okolja ter rast tumorja (11).

Z gojenjem MMC v brezserumskem mediju sicer zmanjšamo njihov diferenciacijski potencial in telomerazno aktivnost, vendar pa zato celice ne podležejo malignim transformacijam in tudi po večjem številu pasaž ne kažejo kromosomskih sprememb (12).

1.2 Mehanizmi vplivov MMC na imunske odzive

MMC vplivajo tako na prirojeno kot na pridobljeno imunost, in sicer tako *in vitro* kot *in vivo*, pri čemer neodvisno od molekul MHC zavirajo proliferacijo in zorenje imunskih celic. Kot smo že omenili je najbolj izrazit njihov učinek na proliferacijo limfocitov T (2,8). Kljub nekaterim nasprotujočim si podatkom v literaturi, da MMC na imunske celice delujejo zgolj preko proizvodnje in izločanja topnih dejavnikov, pa so za njihovo optimalno imunosupresivno delovanje najverjetneje potrebni tudi medcelični stiki (13,14). MMC so zelo občutljive na spremembe v njihovem mikrookolju. Kadar so izpostavljene zadostnim količinam vnetnih citokinov in hipoksiji, se preobrazijo v t.i. imunosupresivni fenotip in izločajo številne topne dejavnike (15). Za aktivacijo njihovih imunosupresivnih sposobnosti je nujna prisotnost IFN- γ z ali brez ostalih vnetnih topnih dejavnikov, kot so TNF- α , IL-1 α , IL-1 β in IL-17. IFN- γ namreč v MMC spodbudi izločanje encima indolamin-2,3-dioksidaze (IDO), ki je eden ključnih zaviralcev proliferacije limfocitov T in naravnih celic ubijalk (NK) (14). Če vnetje ni prisotno

oz. kadar količine vnetnih citokinov v njihovem mikrookloju niso dovolj velike, MMC spodbujajo vnetje in izločajo kemokine, ki privabljajo limfocite. Poleg tega proizvajajo majhne količine topnih dejavnikov, odgovornih za njihovo imunosupresivno delovanje (IDO, PGE₂). MMC se preobrazijo v celični fenotip, ki spodbuja vnetje tudi takrat, ko se aktivirajo preko Toll-u podobnih receptorjev tipa 4 (TLR4), ki so izraženi na njihovih površinah, in sicer z lipopolisaharidi Gram negativnih bakterij. Nasprotno pa se po aktivaciji receptorjev TLR tipa 3 (TLR3), ki se nahajajo v endosomih, z dvojno verižno virusno RNA, MMC preobrazijo v protivnetni fenotip. Ravnovesje opisanih lastnosti MMC v različnih pogojih njihovega mikrookolja spodbuja obrambo organizma pred patogeni, obenem pa ustvarja kontrolno zanko, ki preprečuje preobsežno poškodbo tkiv in pripomore k njihovi regeneraciji (15). Poleg vnetnih citokinov, ki so ključni za razvoj imunosupresivnega učinka MMC, nanj vplivajo tudi razmerja med (količino) MMC in posameznimi vrstami imunskih celic ter njihov aktivacijski oz. efektorski status (16).

1.2.1 Vpliv MMC na limfocite T

Limfociti T igrajo ključno vlogo v pridobljeni imunosti, saj s klonsko porazdeljenimi T-celičnimi receptorji (TCR) prepoznavajo antigenske peptide, vezane na molekule poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti (MHC) (17). Za ustrezno aktivacijo limfocitov T je poleg antigensko specifičnega signala, ki nastane po interakciji med molekulami TCR in MHC z vezanimi peptidi, nujen tudi t.i. kostimulatorni signal. Ta se sproži po vezavi med molekulami CD28 na limfocitih T in CD80/CD86 (oz. B7-1/B7-2) na antigene predstavljajočih celicah (APC). V kolikor kostimulacije ni, nastopi anergija (18). Pretiran oz. neustrezen vnetni odziv limfocitov T lahko vodi v razvoj številnih avtoimunskih bolezni, alogensko povzročeni T-celični odzivi pa so glavni vzrok zapletov po presaditvah KMC (GvHD) in organov (zavračanje) (13). S številnimi študijami so pokazali, da MMC zavrejo aktivacijo efektorskih limfocitov T, kar pogosto spremlja tudi spodbujanje nastanka oz. delovanja regulatornih limfocitov T (Treg). Zaviranje aktivacije in proliferacije lahko poteka preko neposrednih in posrednih mehanizmov (MMC naj bi npr. tudi fizično ovirale celične stike med limfociti T in APC). MMC iz različnih tkiv zavrejo proliferacijo tako CD4⁺ celic T (Th) kot citotoksičnih CD8⁺ limfocitov T (CTL), ta mehanizem pa je odvisen od količine dodanih MMC in neodvisen od sprožilca proliferacije (2). Pri tem pa MMC ne zmorejo vedno zavreti izražanja zgodnjih označevalcev aktivacije limfocitov T (kot sta CD25 in CD69) (6).

Vpliv MMC na CD4⁺ celice T pomagalke (Th)

Celice T pomagalke (Th) ali CD4⁺ limfociti T prepoznavajo antigenske peptide predstavljene na molekulah MHC razreda II in se v odvisnosti od prisotnih citokinov v njihovem mikrookolju preobrazijo v enega od naslednjih podtipov: Th1, Th2, Th17 ali Treg. Ti T-celični podtipi se med seboj razlikujejo po efektorskih funkcijah in vrsti citokinov, ki jih proizvajajo (6,13).

Celice Th1

Celice Th1 ali celice T pomagalke tipa 1 nastanejo, kadar so naivni CD4⁺ limfociti T med njihovo aktivacijo z APC izpostavljeni delovanju vnetnih citokinov IL-12, IL-27 in IFN- γ . Celice Th1 na mesto vnetja privabljajo makrofage z izločanjem IFN- γ in TNF ter spodbujajo nastajanje protiteles v aktiviranih limfocitih B oz. plazmatkah, poleg tega pa so udeležene tudi pri odstranjevanju znotrajceličnih patogenov in nastanku zapoznele preobčutljivosti (ang. delayed-type hypersensitivity – DTH). V kulturah pomešanih alogenskih limfocitov oz. mononuklearnih celic (MLC) *in vitro* se v prisotnosti MMC zmanjša obseg nastajanja celic Th1, najverjetneje preko posrednih mehanizmov, in sicer z vplivanjem na dendritične celice (DC), ki so profesionalne APC (13). V pogojih *in vivo* so MMC, potem, ko so jih intravensko aplicirali v miši (model zapoznele preobčutljivosti – DTH), odkrili v bližini germinalnih centrov v bezgavkah, kjer DC običajno aktivirajo limfocite T (19). Neprimeren celični odziv vrste Th1 je značilen za Crohnovo in sladkorno bolezen tipa 1, sistemski lupus eritematozus (SLE) ter kronične vnetne črevesne bolezni, ter predstavlja primerno tarčo za klinično uporabo MMC (13,20).

Celice Th2

V prisotnosti IL-4 iz CD4⁺ limfocitov T nastanejo celice Th2, ki imajo pomembno vlogo pri obrambi pred zunajceličnimi paraziti, rekrutiranju eozinofilcev, vzpodbujanju tvorbe protiteles in preklapljanju njihovih razredov (20). Celice Th2 so vpletene tudi v mehanizme alergijskih obolenj (npr. astme) ter nastanek in potek kronične GvHD (cGvHD). Pri slednji, MMC izboljšajo stanje, in sicer z zaviranjem izločanja IL-4 in IL-10, kar kaže na to, da delujejo imunosupresivno na celice Th2 tudi v prevladujočem Th2 mikrookolju. Zavedati pa se moramo, da ima imunosupresija provnetnih celic Th1 in Th17 za posledico premik ravnotežja v korist imunskih odzivov tipa Th2 (13).

Celice Th17

Celice Th17 delujejo provnetno in proizvajajo IL-17. Njihova osnovna naloga je, da ščitijo organizem pred zunajceličnimi patogeni (glivami, mikobakterijami in G⁻ bakterijami). S tem

namenom privabljajo nevtrofilce in spodbujajo njihovo delovanje. Th17 celice nastanejo iz naivnih CD4⁺ limfocitov T le v prisotnosti transformirajočega rastnega dejavnika beta (TGF-β) in IL-6. V vnetnem mikrookolju MMC spodbujajo regulatorne učinke teh celic tako, da v njih zmanjšajo izražanje transkripcijskega dejavnika RORγt, povečajo ekspresijo transkripcijskega dejavnika FOXP3 ter proizvodnjo IL-10 (13). Neustrezen celični odziv tipa Th17 je značilen za revmatoidni artritis, multiplo sklerozo in Crohnovo bolezen (20).

Naravni regulatorni limfociti T (Treg)

Ločimo naravno prisotne CD4⁺ regulatorne limfocite T ali Treg, ki nastanejo v timusu ter inducirane regulatorne limfocite T (Tr), ki nastanejo periferno, v prisotnosti TGF-β ali IL-10. Naravne Treg opredelimo s pretočno citometrijo kot celice, ki na svojih površinah izražajo molekule CD25 (receptor za IL-2), znotrajcelično pa transkripcijski dejavnik FOXP3. Omenili smo že, da MMC povečajo število Treg in spodbujajo njihovo aktivacijo (13). Zanimivo je, da Treg ohranijo imunosupresivne učinke tudi potem, ko jih iz MLC, v kateri so v prisotnosti MMC postali efektorske celice v pogojih *in vitro*, dodamo v novo MLC (21). Treg se lahko v vnetnem mikrookolju preobrazijo v celice s fenotipom Th17, zato je možno, da prisotnost MMC in njihovo spodbujanje nastanka Treg, poslabša potek avtoimunskih obolenj, kljub temu da MMC zmanjšajo proizvodnjo in izločanje vnetnih citokinov IL-17, TNF in IFN-γ (13,22).

Citotoksični limfociti T (CTL)

Citotoksični limfociti T (CTL) so CD8⁺ in s svojimi TCR prepoznajo antigenske peptide predstavljene na molekulah MHC I. Specifično uničujejo tumorske in virusno okužene celice, pri čemer tarčne celice ubijejo bodisi preko aktivacije njihovih receptorjev celične smrti Fas (ang. first apoptosis signal receptor), z vezavo liganda FasL (na CTL) ali pa s sproščanjem citotoksičnih granul, ki vsebujejo perforin (ta tvori ireverzibilne pore v membrani tarčne celice), grancime (serinske proteaze, ki aktivirajo kaspaze in s tem izzovejo apoptozo) in granulizin (deluje protimikrobno in proapoptotično). Aktivirani oz. efektorski CTL so ključni dejavniki nastanka in poteka aGvHD po presaditvi alogenskih KMC (13). MMC lahko dokazano zavrejo oz. omilijo aGvHD bodisi neposredno, s tem ko zavirajo citolizo ali pa posredno, preko mehanizmov, ki so potrebni za popolno aktivacijo CTL (vpliv na celice T pomagalke) ter tudi s spodbujanjem nastajanja regulatornih oz. supresorskih CD8⁺ limfocitov T (Ts) (13, 23). MMC zavrejo nastanek CTL v MLC *in vitro*, kadar jih dodamo na začetku testa, ne morejo pa zavreti delovanja že aktiviranih oz. efektorskih CTL (24).

1.2.2 Vpliv MMC na dendritične celice (DC)

DC so profesionalne in zato najpomembnejše APC, ki učinkovito privzemajo in procesirajo antigene in jih, v obliki peptidov, vezanih na molekule MHC, predstavljajo naivnim ali spominskim limfocitom T, kot tudi limfocitom B in naravnim celicam ubijalkam (NK). Med aktivacijo oz. zorenjem DC povečajo izražanje molekul MHC razredov I in II ter kostimulatornih molekul (CD80 in CD86), izrazijo kemokinske receptorje CCR7 in posledično migrirajo v limfoidna tkiva ter izločajo citokine, v prvem okolju predvsem IL-2. Nezrele DC pa sprožijo toleranco limfocitov T, saj jih zaradi pomanjkanja kostimulatornih molekul ne morejo aktivirati (20). DC vplivajo tudi na ravnotežje med celicami T pomagalkami in Treg ter tako pomagajo vzpostavljati in vzdrževati toleranco na lastne antigene (2). MMC zavrejo diferenciacijo monocitov v DC, in sicer tako, da zmanjšajo izražanje molekul MHC razreda II, CD80, CD86, CD1a, CD83 in CD40 na njihovih površinah. Ta proces je povraten, če MMC odstranimo. V pogojih *in vitro*, DC v kokulturi z MMC izkazujejo manjši obseg izražanja prej omenjenih molekul, kar nakazuje, da MMC DC vzdržujejo v nezrelem stanju (20). MMC okvarijo tudi predstavljanje antigenov, saj zavrejo aktivacijo MAPK in znižajo izražanje kemokinskih receptorjev CCR7 ter adhezijskih molekul CD49d (VLA-4), nujno potrebnih za migracijo DC v limfoidna tkiva (2).

1.2.3 Vpliv MMC na makrofage

Pod vplivom IL-6, IDO in PGE₂, ki jih izločajo MMC, se monociti diferencirajo v makrofage M2 s protivnetnim fenotipom. Ta sposobnost MMC je tesno povezana z njihovim spodbujanjem nastajanja efektorskih celic Treg, v katerega je posredno vpleteno tudi izločanje CCL-18 iz makrofagov tipa M2. V odsotnosti IL-6 pa MMC spodbujajo preobrazbo monocitov v vnetni tip makrofagov tipa M1, ki izločajo IFN- γ in TNF- α ter izražajo kostimulatorne molekule, kar omogoča, da aktivirajo limfocite T. Velike količine vnetnih citokinov, ki pri tem nastanejo, pa lahko zopet spodbudijo t.i. protivnetno pot, ki smo jo opisali na začetku tega poglavja (15).

1.2.4 Vpliv MMC na naravne celice ubijalke (celice NK)

Celice NK prepoznajo nepravilnosti v izražanju molekul MHC razreda I na površinah celic, ki so posledica virusnih okužb in rakavih transformacij. Tako spremenjene celice uničujejo bodisi neposredno, s citotoksičnimi efektorskimi mehanizmi (opisani v poglavju o delovanju CTL), ki se sprožijo po aktivaciji specifičnih receptorjev, ali pa posredno, potem ko z ustreznimi receptorji Fc prepoznajo konstantne predele protiteles, vezanih na tarčne celice (od vezave protiteles odvisna citotoksičnost ali ADCC – ang. antibody-dependent cell cytotoxicity) (20). MMC zavrejo proliferacijo in citotoksično delovanje celic NK ter njihovo proizvodnjo

citokinov (2). Zanimivo je, da je za zmanjšanje izločanja IFN- γ , nujen neposredni stik med MMC in celicami NK (6).

1.2.5 Vpliv MMC na limfocite B

Preko B-celičnih receptorjev (BCR) antigensko aktivirani limfociti B proizvajajo protitelesa in predstavljajo enega ključnih dejavnikov pridobljene imunosti. MMC zavirajo proliferacijo limfocitov B, pri čemer jih zadržijo v fazi G0/G1 celičnega cikla, okrnijo njihove kemotaktične sposobnosti (inhibicija izražanja kemokinskih receptorjev CXCR4, CXCR5, CCR7) ter zmanjšajo nastajanje protiteles (20). Za vse te učinke pa so ključni neposredni celični stiki med MMC in limfociti T, saj so ugotovili, da MMC, ki jih dodajo v kulturo prečiščene populacije limfocitov B, ne zavrejo njihove proliferacije (14,20). MMC torej inhibirajo aktivacijo, proliferacijo in funkcijo limfocitov B posredno, preko preprečevanja aktivacije celic T, zmanjšanja njihove proizvodnje citokinov ter inhibitornim vplivanjem na zorenje DC (16).

1.2.6 Topni dejavniki MMC, vpleteni v imunsko regulacijo

MMC v različnih mikrookoljih izkazujejo različne imunomodulatorne lastnosti, kar je posledica proizvodnje številnih topnih dejavnikov, ki so odgovorni zanje (13).

TGF β 1 in HGF: Oba citokina, ki imata pomembno vlogo pri zaviranju alogensko aktiviranih limfocitov T, MMC izločajo konstitutivno in sinergistično (20). Prisotnost nevtralizirajočih protiteles za ta dejavnika pa ponovno omogoči njihovo proliferacijo (25). TGF β 1 je vpleten tudi v nastajanje efektorskih CD4⁺CD25⁺ Treg in zaviranje proliferacije celic NK, HGF pa zavira nastajanje IFN- γ , TNF- α in IL-2 (20).

Indolamin-2,3-dioksigenaza (IDO): IDO katalizira pretvorbo L-triptofana v kinurenin. Tako pomanjkanje triptofana, ki je ključen za ustrezno delovanje limfocitov T, kot kopičenje metabolitov kinurenina, zavirata alogensko spodbujene T-celične odzive, zorenje DC, funkcijo celic NK, diferenciacijo CD4⁺ limfocitov T v celice Th17, ter spodbujata nastajanje efektorskih celic Treg. MMC izločajo IDO pod vplivom IFN- γ (20). Da pa so v zaviranju alogenskih CD4⁺ limfocitov T vpleteni tudi drugi, kompleksnejši mehanizmi, nakazuje dejstvo, da v MLC, kjer so uporabili inhibitorje za IDO, limfociti T niso proliferirali do takšne stopnje, kot tisti v kulturi brez MMC (6).

Prostaglandin E₂ (PGE₂): Pod vplivom ciklookigenaz in prostaglandin sintetaze iz arahidonske kisline nastaja PGE₂, ki je eden ključnih dejavnikov hemostaze. Znano je, da IL-6 spodbuja delovanje ciklooksigenaze COX2. PGE₂ spodbuja izločanje imunosupresivnih citokinov: IL-10, IL-6, IL-4, s čimer neposredno zavira diferenciacijo monocitov v DC,

spodbuja diferenciacijo Treg, obenem pa zavira diferenciacijo naivnih limfocitov T v provnetne celice Th17 (20). MMC v vnetnem okolju izražajo PGE₂ v povečanem obsegu (6).

IL-10: IL-10 v ravnovesju Th1/Th2 spodbuja premik v korist fenotipa Th2, prispeva k proliferaciji celic Treg, spodbuja izločanje topnih molekul HLA-G5 (HLA – ang. human leukocyte antigen), ki sodijo med neklasične molekule MHC razreda I ter zavira dozorevanje DC in njihovo izločanje IL-12 (20). Nekateri avtorji navajajo, da MMC same ne tvorijo IL-10 (26). Po drugi strani pa so v raziskavah pokazali, da količina IL-10 v supernatantih kokultur MMC in imunskih celic naraste, z uporabo protiteles proti IL-10 pa so potrdili, da je ta citokin, vpleten v mehanizme imunske regulacije, pri čemer so za njegovo nastajanje in izločanje nujni medcelični stiki med MMC in limfociti T (6,23).

HLA-G5: Kot smo že omenili, so molekule HLA-G5 topna oblika neklasičnih molekul MHC razreda I. MMC jih izločajo pod vplivom IL-10, pri čemer molekule HLA-G5 spodbujajo izločanje tega citokina v okviru pozitivne povratne zanke, za katero so nujni medsebojni stiki med MMC in limfociti T (20). Tako molekule HLA-G5 kot IL-10 sodelujejo pri spodbujanju proliferacije celic Treg, specifična protitelesa proti HLA-G5 in IL-10 pa znova omogočijo skoraj neokrnjeno proliferacijo alogensko stimuliranih limfocitov T v mešani kulturi z MMC *in vitro* (6).

Levkemični inhibitorni dejavnik (LIF): LIF je citokin, podoben IL-6. Vpleten je v razvoj tolerance na plod in alogenske presadke. LIF, ki ga izločajo MMC pa je pomemben za nastajanje efektorskih celic Treg (20).

Galektini: Galektini so skupina topnih lektinov, ki se z visoko afiniteto specifično vežejo na β-galaktozidne sladkorne molekule (Galβ1-3GlcNAc ali Galβ1-4GlcNAc) glikoproteinov (6). Galektin 1 zavira proliferacijo aktiviranih limfocitov T in izločanje provnetnih citokinov, značilnih za celična fenotipa Th1 in Th17, poleg tega pa naj bi vplival tudi na proizvodnjo TNF-α, IFN-γ, IL-2 in IL-10 med GvHD. Galektin 3 močno okrne funkcijo DC in lahko sproži apoptozo aktiviranih efektorskih limfocitov T, galektin 9 pa zavira proliferacijo limfocitov T in B ter proizvodnjo protiteles (20).

1.2.7 Imunoregulatorne vloge površinsko izraženih molekul na MMC

Molekuli HLA-G1 in Jagged-1, adhezijski molekuli ICAM-1 (ang. intercellular adhesion molecule 1) in VCAM-1 (ang. vascular cell adhesion molecule 1) ter ligand PD-L1 (ang. programmed cell death protein 1 ligand) in njegov receptor PD-1 (ang. programmed cell death protein 1), sodelujejo pri uravnavanju kostimulacijskih signalov med antigensko

specifično aktivacijo limfocitov T (6). Danes vemo, da so odgovorne tudi za imunoregulacijske mehanizme MMC (6,27). Inhibitorna signalna pot PDL-1/PD-1 se aktivira med vztrajajočim predstavljanjem antigenov (npr. lastni antigeni, kronične virusne okužbe, tumorji) in ima pomembno vlogo pri preprečevanju avtoimunosti (6). Celice Treg v kulturi z MMC iz KM obilno izražajo receptorje PD-1, kar je povezano z njihovo večjo imunosupresivno sposobnostjo (28). MMC, ki se nahajajo v kulturi skupaj z aktiviranimi limfociti, pa v povečanem obsegu izražajo molekule HLA-G1, za kar so nujni neposredni stiki med obema vrstama celic, posledično pa nastajajo številnejše celice T pomagalkе, ki proizvajajo močan protivnetni citokin IL-10 (26, 29). Adhezijske molekule (ICAM-1, VCAM-1) se na MMC izražajo v večji meri takrat, ko so izpostavljene delovanju IFN- γ (30). MMC s tem povečajo svojo sposobnost, da vnetne limfocite T preobrazijo v regulatorni celični fenotip. Prav tako naj bi omenjene adhezijske molekule povečale tudi izražanje inhibitornih transmembranskih receptorjev CTLA-4 (ang. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) na limfocitih T, ki so znani tudi kot imunska zavorna stikala, saj zavirajo proliferacijo aktiviranih celic T (6).

1.3 Klinična uporabnost MMC

MMC imajo veliko plastičnost oz. diferenciacijski potencial, poleg tega pa izkazujejo imunomodulatorne lastnosti in proizvajajo številne rastne dejavnike, zaradi česar so zelo primerne za celično terapijo (6,7).

Dokazali so, da MMC v poškodovanem tkivu, pod vplivom citokinov, toksinov in hipoksije izločajo številne rastne dejavnike, npr. epidermalni rastni dejavnik (EGF; ang. epidermal growth factor), fibroblastni rastni dejavnik (FGF; ang. fibroblast growth factor), trombocitni rastni dejavnik (PDGF; ang. platelet-derived growth factor), TGF- β , žilni endoteljski rastni dejavnik (VEGF; ang. vascular endothelial growth factor), hepatocitni rastni dejavnik (HGF; ang. hepatocyte growth factor), inzulinu podoben rastni dejavnik 1 (IGF-1; ang. insulin-like growth factor 1), angiopoetin (Ang-1), keratinocitni rastni dejavnik (KGF; ang. keratinocyte growth factor) in rastni dejavnik stromalnih celic 1 (SDF-1; ang. stromal cell-derived factor). Omenjeni topni dejavniki spodbujajo razvoj fibroblastov, endotelnih celic in tkivno specifičnih celic prednic, ki lahko tvorijo novo tkivo ter pospešujejo angiogenezo (11). Poleg tega MMC z izločanjem citokinov in kemokinov zavirajo vnetje in apoptozo, s čimer še dodatno pripomorejo k regeneraciji poškodovanega tkiva (9,17). Po poškodbi tkiva se nemudoma aktivirajo različne imunske celice, pri čemer se fagociti na sproščene celične komponente, ki predstavljajo signal za nevarnost, odzovejo s proizvajanjem in izločanjem vnetnih mediatorjev, reaktivnih kisikovih zvrsti (prostih radikalov), kemokinov in levkotrienov. Takšne spremembe v mikrookolju

privabljuje MMC in spodbujajo njihovo diferenciacijo v stromalne celice ali tkivno specifične celice, ki lahko nadomestijo poškodovane (11). Ugotovili so, da se iz poškodovanega tkiva v kri izloča nevrokinin P (substancia P), ki učinkovito mobilizira MMC iz kostnega mozga v periferni krvni obtok, od koder lahko nato migrirajo na mesto poškodbe. To pomeni, da MMC glede na količino substance P v krvi zaznavajo poškodbo tkiva in se odzovejo nanjo (9). MMC so v smislu regenerativne medicine uporabne predvsem za regeneracijo tistih tkiv, ki se težje ali pa sploh ne obnavljajo, npr. sklepni hrustanec in srčne mišice (9,17). Poleg tega so dokazali ugodne učinke MMC tudi pri zdravljenju poškodb in degenerativnih bolezni živčevja, saj so MMC iz kostnega mozga in maščobnega tkiva uspešno diferencirale v Schwanove celice, obenem pa prispevale k učinkovitejši migraciji živčnih matičnih celic na mesto poškodbe (9). Zaradi svojih imunomodulatornih sposobnosti so MMC uporabne tudi pri zdravljenju imunsko posredovanih obolenj. Tako so z njihovo uporabo dosegli izboljšanje pri Crohnovi bolezni, multipli sklerozi, sistemskemu lupusu, revmatoidnem artritisu, akutnem pankreatitisu, sladkorni bolezni tipa 1, pridobljeni aplastični anemiji ter akutni bolezni presadka zoper gostitelja (2,5,6). Do danes je registriranih kar 877 kliničnih študij z MMC (31).

1.3.1 MMC in akutna bolezen presadka zoper gostitelja (aGvHD)

Alogenska presaditev KMC je trenutno edino možno zdravljenje nekaterih krvnih rakavih bolezni in hudih prirojnih imunskih pomanjkljivosti. Pri iskanju primerne nesorodnega darovalca KMC je zahtevano ujemanje v vsaj desetih alelskih različicah molekul HLA razredov I in II med darovalcem in prejemnikom presadka (32). Akutna bolezen presadka zoper gostitelja (aGvHD) je glaven, resen in potencialno smrten zaplet, ki se lahko pojavi v 100 dneh po presaditvi. Bolezen lahko poteka v blažji stopnji (stopnji I in II), kjer sta prizadeti predvsem koža in ustna sluznica, ali hujši obliki (stopnji III in IV), pri kateri pa so napadene tudi črevesna sluznica in nekateri notranji organi (jetra). Priprava bolnika na poseg vključuje mieloblativno kondicioniranje, kar pomeni uničenje njegovega kostnega mozga z obsevanjem celotnega telesa in kemoterapijo, kar seveda poškoduje tudi druga tkiva. Posledično pride do aktivacije monocitov in makrofagov v prejemnikovih tkivih, ki proizvajajo vnetne citokine (npr. IL-1 β in IL-6), in tako spodbujajo aktivacijo limfocitov T darovalca. V primeru tkivne neskladnosti med darovalcem in prejemnikom KMC nastanejo alogensko aktivirani efektorski CD4⁺ limfociti T darovalca potem, ko prepoznajo neskladnosti v molekulah HLA razreda II na APC prejemnika, posledično proizvajajo in izločajo IL-2 ter IFN- γ , ki še dodatno spodbudita izražanje adhezijskih molekul in molekul HLA razreda II na prejemnikovih celicah (33). V tej t.i. efektorski fazi, aktivirane celice Th1 pospešujejo nastanek efektorskih CD8⁺ CTL, spodbujajo citotoksično delovanje celic NK in izločanje vnetnih citokinov (IFN- γ , TNF- α , IL-1, ...), s tem

pa povečujejo obseg vnetnih procesov in tkivnih poškodb (6). Patologija aGvHD se pojavi v približno 70% po presaditvi alogenskih KMC, prva izbira za zdravljenje pa so kortikosteroidi, na katere pa se običajno žal ne odzove več kot polovica bolnikov (34). Ko so Le Blanc in sod. leta 2004 objavili študijo primera, kjer so pri pediatričnem bolniku z aGvHD po alogenski presaditvi KMC z haploidničnimi MMC uspeli občutno izboljšati stanje, je uporaba teh celic postala alternativna možnost za zdravljenje kortikosteroidne odporne aGvHD, poleg tega pa tudi tarča raziskav številnih raziskovalnih skupin (35). Tudi skupina na Pediatrični kliniki v UKC Ljubljana je v raziskavi, v katero so bili vključeni trije pediatrični pacienti z na steroide odporno aGvHD, pokazala uspešnost aplikacije MMC, saj so pri dveh bolnikih dosegli popolni pri enem pa delni odziv na terapijo (36). Raznolikost poročil o uspešnosti oz. neuspešnosti zdravljenja aGvHD z MMC, ki so navedena v literaturi, je posledica številnih dejavnikov, ki lahko vplivajo na učinkovitost tovrstne celične terapije. Eden izmed njih je npr. čas aplikacije MMC, saj so dokazali, da se bolniki z blažjo obliko aGvHD (stopnja II) v večji meri odzovejo na terapijo kot tisti s hudo obliko bolezni (II-IV). Prav tako se na tovrstno zdravljenje bolje odzivajo mlajši bolniki oz. otroci in tisti, pri katerih sta prizadeta črevesna sluznica in koža (34). Še posebej zanimivo je, da je bila v študiji, v kateri so za zdravljenje aGvHD več pacientov uporabili MMC istega darovalca, uspešnost terapije različna (37). Očitno so torej predvsem lastnosti prejemnika tiste, ki vplivajo na učinkovitost tovrstnega zdravljenja. Ugotovili so tudi, da MMC zelo učinkovito zavrejo proliferacijo z mitogeni poliklonsko aktiviranih limfocitov T *in vitro*, medtem ko je v testu MLC, kjer je alogenska aktivacija limfocitov T oligoklonska (1-10%), njihov učinek različen, kar je odvisno od kombinacije uporabljenih celic (38). Seveda pa na uspešnost vplivajo tudi pogoji predhodnega gojenja MMC, saj jih je potrebno najprej namnožiti *in vitro* do ustrezne količine. Celice nato lahko uporabijo takoj ali pa jih zamrznejo in nato odmrznejo tik pred aplikacijo. Nekaj avtorjev navaja, da imajo odmrznjene MMC okrnjene imunomodulatorne lastnosti. Na učinkovitost MMC pa vpliva tudi njihov izvor. V okviru kar nekaj raziskav so ugotovili, da delujejo MMC iz maščobnega tkiva (MT) najbolj imunosupresivno (34). Kot smo že omenili, so za optimalno imunosupresivno delovanje MMC potrebne zadostne količine vnetnih citokinov v njihovem mikrookolju, pri čemer je še posebej pomemben IFN- γ . MMC, ki so jih predhodno izpostavili visokim količinam IFN- γ , so bile namreč izjemno učinkovite pri preprečevanju aGvHD, saj so z njimi dosegli 100% preživetje bolnikov (38). Ker so MMC sposobne migrirati v prizadeto tkivo, bi morda lahko z določanjem lokalne prisotnosti IFN- γ , napovedali učinkovitost zdravljenja z njimi. Kljub temu da številne raziskave dokazujejo uspešnost zdravljenja aGvHD z MMC, pa se njihovi izsledki precej

razlikujejo, zato bi se bilo v prihodnosti potrebno osredotočiti predvsem na identifikacijo tistih skupin bolnikov, za katere bi bila taka terapija ustrezna in dejansko učinkovita (34).

1.4 Primerjava imunosupresivne učinkovitosti človeških MMC iz različnih tkiv

V okviru magistrske naloge se nameravamo osredotočiti na MMC, pridobljene iz kostnega mozga (KM), popkovničnega (PT) in maščobnega tkiva (MT). V literaturi namreč ni objavljenih veliko raziskav, ki bi te tri populacije MMC neposredno primerjale med seboj. Obenem pa je zaradi raznolikosti v uporabljenih metodah izolacije in gojenja ter načinom stimulacije limfocitov T v testih *in vitro*, s katerimi preverjamo in primerjamo imunosupresivno delovanje MMC, njihove izsledke pogosto težko primerjati.

Ker so najprej preučevali in uporabljali MMC izolirane iz KM, veliko raziskav pa jih obravnava tudi sedaj, se večina podatkov v literaturi nanaša prav na to vrsto celic. Ker pa je njihovo pridobivanje invazivno in ga spremlja tudi možnost okužbe, se je v zadnjih letih povečalo zanimanje za MMC iz alternativnih tkivnih virov, s tem pa tudi število raziskav namenjenih primerjavam njihovih diferenciacijskih in imunomodulatornih lastnosti s tistimi, ki jih imajo MMC iz KM. Poleg tega je količina MMC, ki jo pridobimo iz enega grama KM kar 500-krat manjša od tiste, ki jo izoliramo iz enake količine MT (39). Manjše razlike med MMC pridobljenih iz različnih tkiv, pa so najverjetneje posledica mikrookolja oz. niš, iz katerih izvirajo, ter njihovih lokalnih funkcij (40). *In vivo* se MMC nahajajo v hiposkičnih pogojih, zato lahko standardni pogoji gojenja *in vitro* zanje predstavljajo oksidativni stres, zaradi katerega prezgodaj dosežejo senescenco. MMC iz PT in MT izkazujejo boljši proliferacijski potencial kot tiste iz KM. Znano je, da se MMC iz PT skoraj dvakrat hitreje delijo kot MMC iz KM, prav tako nanje ne vpliva kontaktna inhibicija (39). Riberio in sod. so pokazali, da MMC izolirane iz različnih virov, različno vplivajo na limfocite T in B ter na celice NK, po stimulaciji mononuklearnih celic (MNC) iz periferne krvi z rastlinskim lektinom fitohemaglutininom (PHA; ang. phytohemagglutinin). MMC iz MT so imele na aktivacijo limfocitov B najmočnejši učinek, medtem ko MMC iz PT nanje sploh niso vplivale. Vse preskušane vrste MMC pa so izkazale podobne zaviralne učinke na aktivacijo CD4⁺ in CD8⁺ limfocitov T. Pri tem so MMC iz KM in PT zavrle aktivacijo tudi tistih limfocitov T, ki so izražali večje število molekul CD69 (zgodnji označevalec celične aktivacije), medtem ko so MMC iz MT preprečile aktivacijo naivnih limfocitov T in tako zadržale večji delež celic T v neaktiviranem stanju. Glede na to, da MMC vplivajo na limfocite T tudi posredno, preko zaviranja zorenja DC, je možno, da so nekatere ugotovljene razlike v imunosupresivnem delovanju preučevanih MMC, posledica prav tega mehanizma (16). Najar in sod. pa so ugotovili, da imajo MMC iz MT najmočnejši zaviralni

učinek na aloantigeno spodbujeno proliferacijo limfocitov T. Te celice namreč izražajo zelo visoke količine encima ciklooksigenaze 1, ki je ključen pri nastajanju PGE₂, ta pa je pomembno vpleten v imunomodulatorne mehanizme (40,41). Po drugi strani so Li in sod. ugotovili, da med MMC iz različnih tkiv ni razlik v obsegu proizvodnje in izločanja PGE₂, zato pa so zaznali večjo aktivnostIDO pri MMC iz MT (42). Rezultati več raziskav torej kažejo, da imajo MMC pridobljene iz drugih tkiv primerljive imunosupresivne učinke, tiste iz MT pa pogosto celo izrazitejše kot MMC iz KM (16,40-43).

V prihodnje bi bilo potrebno ugotoviti, ali imunosupresivne lastnosti MMC, določene *in vitro*, korelirajo s tistimi *in vivo* ali pa so morda posledica vplivov, ki so jim te celice izpostavljene med predhodno namnožitvijo v kulturi (40).

1.5 Testi za vrednotenje proliferacije limfocitov T *in vitro*

V pogojih *in vitro* lahko oligoklonsko proliferacijo limfocitov T izzovemo z aloantigeni (molekule MHC) v enosmernih ali dvosmernih kulturah pomešanih MNC, poliklonsko pa z mitogeni, kot je npr. fitohemaglutinin (PHA), ali s protitelesi (anti-CD3 in anti-CD28) (2). PHA je lektin, ki se veže na različne glikoproteine v celični membrani limfocitov T in jih premreži, kar povzroči njihovo poliklonsko aktivacijo (16). Test MLC izvedemo tako, da v vdolbinicah mikrotitrskih plošč pomešamo MNC dveh nesorodnih oseb. Kadar izberemo enosmerno reakcijo, celice ene od oseb obdelamo z obsevanjem z žarki gama ali z dodatkom mitomicina C, tako da se ne morejo več deliti, kljub temu pa so v kulturi še nekaj časa metabolno aktivne in lahko alogensko stimulirajo neobdelane odzivne celice druge osebe. V dvosmerni MLC pa celice obeh oseb neobdelane, se medsebojno alogensko stimulirajo in proliferirajo. Po 6 do 7 dneh inkubacije, ko je obseg celične proliferacije v MLC največji, jo ovrednotimo z izbrano metodo (44). Enako storimo tudi v primeru mitogenske stimulacije posameznih MNC, pri čemer obseg proliferacije merimo že po 3 ali 4 dnevih po dodatku mitogena (45).

1.5.1 Radioaktivna metoda za vrednotenje celične proliferacije *in vitro*

Radioaktivni test s ³H-timidinom velja za zlati standard vrednotenja obsega T-celične proliferacije *in vitro*. ³H-timidin se namreč med mitotično delitvijo celic vgrajuje v novonastalo DNA. Vgrajeni tricij pa oddaja delce β⁻, ki zaradi majhne količine ³H-timidina in šibke energije sevanja niso nevarni. Količino sevanja, ki je proporcionalna količini ³H-timidina vgrajenega v DNA, izmerimo z β-scintilacijskim števcem. To poteka tako, da z vakumsko črpalko s pomočjo vode prenesemo celično kulturo na filtrski papir, izdelan iz steklenih in celuloznih vlaken, ga osušimo in damo v plastično vrečko, v katero natočimo scintilacijsko raztopino. Ta vsebuje dve fluorescentni (običajno fenilksazolni) spojini, raztopljeni v organskem topilu. Vrečko nato

neprodušno zapremo in jo v posebni kaseti namestimo v števec. Emitirani β -delci najprej vzbudijo prvo spojino, ko nato ta odda energijo pa vzburi drugo, ki oddaja fotone (450nm). Ko ti zadenejo fotokatodo, se to prevede v električni tok, ki ga dodatno ojača fotopomnoževalna cev. Števec nato poda meritve v obliki zadetkov na minuto ali CPM (ang. counts per minute), kar je sorazmerno z obsegom celične proliferacije. Rezultate izrazimo kot relativne odzive ali stimulacijske indekse, pri čemer upoštevamo negativne in pozitivne kontrole (44,46).

1.5.2 Neradioaktivne metode za vrednotenje celične proliferacije *in vitro*

Da bi se izognili uporabi radioaktivnih snovi so razvili timidinski analog etinil deoksi uridin (ali EdU), ki ima na mestu 5 namesto metilne vezano alkilno skupino. EdU se tako kot ^3H -timidin zlahka vključuje v deleče se celice. Alkilna skupina nato reagira s fluorescentnimi azidi, v s Cu^+ ioni katalizirani cikloadiciji (t.i. reakcija Click), kar omogoča fluorescenčno zaznavanje količine vgrajenega EdU v novo nastalo DNA. Čeprav metoda izkazuje visoko ujemanje v rezultatih z radioaktivno metodo z uporabo ^3H -timidina in je dovolj robustna, pa za njeno izvedbo potrebujemo večje število celic ter daljši čas, namenjen pripravi vzorcev za meritve, kar seveda poveča stroške (45).

Za vrednotenje celične proliferacije lahko uporabljamo tudi kolorimetrične teste z različnimi tetrazolijevimi spojinami, ki se v živih oz. presnovno aktivnih celicah reducirajo z NADH ali NADPH, zato lahko na ta način ocenimo njihovo število. Test MTS temelji na uporabi vodne raztopine MTS oz. [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3-(3-kraboskimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolijeve notranje soli in fenazin etosulfata (PES), ki veže ter posreduje elektrone. V živih celicah se MTS reducira v vijoličasti formazan, njegovo količino pa nato izmerimo spektrofotometrično pri 490 nm. Test MTS je primeren za avtomatizacijo, v rutini ga najpogosteje uporabljajo za ugotavljanje občutljivosti tumorskih celičnih linij na zdravila (47,48). Alternativni test WST-8 prav tako temelji na uporabi vodotopne tetrazolijeve spojine, in sicer [2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolijeve mononatrijeve soli. V živih celicah se reducira v oranžni formazan, katerega količino izmerimo spektrofotometrično pri 450nm. Ta test je občutljivejši od testa MTS (49).

2 NAMEN DELA

Mezenhimske matične celice (MMC) imajo izrazite imunomodulatorne lastnosti, zato lahko ugodno vplivajo na potek vnetnih, imunsko posredovanih bolezni. Dosedanje izkušnje s klinično uporabo MMC za blaženje poteka bolezni presadka zoper gostitelja, po presaditvi krvotvornih matičnih celic, so vezane predvsem na tiste iz kostnega mozga, pri čemer je njihovo pridobivanje invazivno, izplen pa razmeroma majhen. Zato bi bilo smiselno ovrednotiti, ali imajo MMC iz drugih tkiv, iz katerih jih lahko izoliramo lažje in v večjem številu, primerljive imunosupresivne lastnosti kot tiste iz KM.

V okviru magistrske naloge nameravamo primerjalno ovrednotiti imunosupresivne učinke človeških MMC, pridobljenih iz kostnega mozga (KM), popkovnice (P) in maščobnega tkiva (MT), in sicer z neradioaktivnim proliferacijskim testom *in vitro*. V ta namen bomo uporabili z mitogenim lektinom fitohemaglutininom (PHA) vzpodbujene in v dvosmernih pomešanih alogenskih kulturah stimulirane mononuklearne celice (MNC) dveh nesorodnih oseb (krvodajalcev), izolirane iz levkocitnih koncentratov (ang. buffy-coat). Vplive vseh treh različnih populacij MMC na proliferacijo MNC bomo ugotavljali tako, da jih bomo v različnih količinah dodajali v posamezne kulture aktiviranih MNC. Pri tem bomo za testiranje vsake od treh populacij MMC uporabili celice po dveh različnih darovalcev.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali in laboratorijska oprema

Vse postopke smo izvajali v skladu s predpisi varnega dela v laboratoriju, in sicer večinoma pa v aseptičnih pogojih, v komori z laminarnim pretokom zraka. Uporabljeni reagenti in laboratorijski materiali so bili sterilni. Levkocitne koncentrate so nam, skladno s standardnim postopkom pripravili na Zavodu Republike Slovenije za transfuzijsko medicino v Ljubljani (ZTM).

3.1.1 Reagenti

Preglednica 1: Uporabljeni reagenti

Brezserumski medij BioTarget™-1	Biological Industries, Izrael
DMSO	Sigma Aldrich, ZDA
DMEM/F12	Gibco Life Technologies, ZDA
Medij RPMI 1640	Sigma Aldrich, ZDA
Mitomicin C	Sigma Aldrich, ZDA
Pufer DPBS	Gibco Life Technologies, ZDA
Raztopina metilenskega modrila – Trypan blue Solution (0,4%)	Sigma Aldrich, ZDA
Raztopina Trypsin-EDTA (0,05%)	PAA, Avstrija
Reagent MTS, CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega, ZDA
Serum FBS	Gibco Life Technologies, ZDA

3.1.2 Aparati in laboratorijska oprema

Preglednica 2: Uporabljeni aparati in laboratorijski material

Celični inkubator Cytoperm 2	Heraeus, Nemčija
Centrifuga	Centric 322 PLC, Tehnica, Slovenija
Centrifugirke, 50 mL	Sarstedt, Nemčija
Čitalec mikrotitrskih ploščic UV-VIS Synergy H4 Hybrid	BioTek, ZDA
Invertni mikroskop Nikon Eclipse TE 300	Nikon, Japonska
Kamera Nikon Digital Sight DS-FM	Nikon, Japonska

Komora z laminarnim pretokom zraka MC 15-2	Iskra PIO, Slovenija
Krioviale, 1 mL in 2 mL	Sarstedt, Nemčija
Mikrotitrne plošče Nunclon 96 z vdolbinicami s polkrožnim dnom (96U)	Nunc Inter Med, Danska
Multikanalni pipetorji z 8 in 12 nastavki	Costar, ZDA
Pipetor Pipettboy	Integra, Švica
Pipetorji Eppendorf	Eppendorf, Nemčija
Sterilne Pasteurjeve pipete	Sarstedt, Nemčija
Sterilne pipete, 10 mL, 5 mL, 2 mL, 1 mL	Sarstedt, Nemčija
Sterilni nastavki za pipetiranje	Sarstedt, Nemčija
Stresalnik vorteks	Lab dancer, IKA®, Nemčija
Svetlobni mikroskop Olympus CX21FS1	Olympus, Japonska
Vodna kopel	Memmert, Nemčija
Vsebniki s tekočim N ₂ Locator JR Plus	Thermo Scientific, ZDA

3.2 Priprava delovnih suspenzij monuklearnih celic (MNC)

MNC krvodajalcev smo predhodno izolirali po klasičnem postopku flotacije, z uporabo raztopine Lympholyte-H (Cedarlane, Kanada) in jih po spiranju zamrznili (medij: RPMI 1640 z 10% FBS in 10% DMSO) v 2 mL kriovialah na -80 °C, nato pa jih najkasneje po 3 tednih prenesli v tekoči N₂. Za vsak poskus smo iz kontejnerja s tekočim N₂ vzeli po dve krioampuli MNC obeh nesorodnih oseb in jih med stresanjem na vodni kopeli (37 °C) skoraj popolnoma odtalili. Nato smo v krioampule s sterilno Pasteurjevo pipeto najprej dodali nekaj na 37°C ogretega odmrzovalnega medija (RPMI 1640 + 30% FBS; dvakratni volumen glede na količino odmrznjenih celic), in nato odmrznjeni celični suspenziji prenesli v 50 mL plastični centrifugirki. Ti smo nato najprej dopolnili z RPMI 1640 do 35 mL, nato pa dodali še Dulbeccov fosfatni pufer DPBS do oznake 45 ml, ju zaprli z navojnimi pokrovi in centrifugirali 10 min na 1.7000 obratov/minuto, brez zavore. Supernatanta smo odlili, celični usedlini pa resuspendirali na vorteksnem stresalniku, v vsako centrifugirko dodali DPBS do 40 ml in ponovili postopek spiranja. Po centrifugiranju smo supernatanta odlili, celični suspenziji pa resuspendirali v po 2 mL brezserumsega medija Biotarget™-1 in ju dobro pretresli. Iz vsake centrifugirke smo odvzeli po 20 µL celične suspenzije in ju v ločenih vdolbinicah mikrotitrne plošče, pomešali s po 80 µL 0,4% raztopine tripanskega modrila. Za določitev števila živih celic v vsaki od

suspenzij smo dela obarvanih suspenzij z mikropipeto prenesli na Neubauerjevo števno komoro in prešteli celice v po petih kvadratih, pri čemer smo upoštevali žive, torej ne obarvane celice, znotraj ter na zgornjem in levem robu vsakega kvadratka. Število celic na mL celične suspenzije smo izračunali z naslednjo enačbo (Enačba 1):

Enačba 1: Izračun števila celic po štetju v Neubauerjevi komori

$$N = n \times f \times R_x \times F_v = n \times 25 \times 10^4$$

N = število celic v 1 mL celične suspenzije

n = število celic v 5 kvadratih števne komore

f = 5 (faktor za volumen 0.1 μ L)

R = 5 (faktor redčenja 20/100)

Fv = 10^4 (volumski faktor za 1 mL)

Po štetju smo z ustreznim redčenjem pripravili delovno suspenzijo s celično koncentracijo 2×10^6 /mL, v mediju BioTarget™-1.

3.3 Gojenje in tripsinizacija MMC ter priprava celičnih suspenzij MMC, obdelanih z mitomicinom C

Mezenhimske matične celice, izolirane iz kostnega mozga (KM), popkovničnega (PT) in maščobnega tkiva (MT), so v podjetju Educell d.o.o. po odmrzovanju namnožili v mediju DMEM F-12 do 3. - 6.pasaže in jih nato tripsinizirali. Iz gojitvenih posod z MMC so odpipetirali izrabljena gojišča v ločene 50 mL centrifugirke. Da so odstranili ostanke seruma, so adherirane MMC dvakrat sprali s po približno 20 ml DPBS, nato pa jim dodali 10 mL raztopine tripsin-EDTA (0,05%), tako da so prekrili celotne rastne površine gojitvenih posod. Te so nato prenesli v inkubator za 2-4 minute in na približno 2 minuti opazovali postopek odlepljanja celic pod invertnim svetlobnim mikroskopom. Ko so dobili homogene celične suspenzije, so hitro nevtralizirali tripsin, in sicer tako da so najprej gojitveno posodo dobro pretresli na vorteksnem mešalniku in vanje dodali pripadajoča izrabljena gojišča ter vsebine narahlo pretresli. Vsako celično suspenzijo so prenesli v 50 mL centrifugirko ter gojitvene posode sprali s po nekaj mL DMEM in jih nato prenesli v ustrezne centrifugirke k suspenzijam MMC. Celične suspenzije so centrifugirali 5 minut pri 1500 obratih/min, brez zavore, odlili supernatante in jih še enkrat sprali z DPBS, nato pa celice resuspendirali v po 2-5 mL DMEM F-12 brez dodatka fetalnega govejega seruma (FBS) in določili število celic s štetjem v Neubarjevi števni komori. Tako pripravljene suspenzije MMC so dostavili v celični laboratorij

Katedre za klinično biokemijo FFA, na lokaciji Ilirija, kjer smo jih z medijem RPMI 1640 dopolnili do 45 mL in centrifugirali 5 minut pri 1.500 obratih/min, brez zavore. Potem smo odlili supernatante, celične usedline dodobra pretresli na vorteksnem mešalniku in jim dodali po 1 mL RPMI 1640. Vse centrifugirke z MMC smo ovili z aluminijasto folijo, da smo jih zaščitili pred svetlobo, in v vsako suspenzijo, glede na število celic dodali po 100 ali 150 μ L raztopine mitomicina C s koncentracijo 0,5 mg/mL DPBS. Nato smo centrifugirke inkubirali 30 min na vodni kopeli pri 37°C ter jih, zaščitene pred svetlobo, občasno pretresli. Po inkubaciji smo celičnim suspenzijam dodali po RPMI 1640 do oznake 45 mL in jih centrifugirali 5 min pri 1.500 obratih/min, brez zavore. Postopek spiranja smo ponovili še enkrat, pri čemer smo za spiranje uporabili mešanico medija RPMI 1640 in pufru DPBS. Nato smo odlili supernatante, celične usedline dobro pretresli na vorteksu in jim dodali ustrezne količine brezserumskega medija BioTargetTM-1, tako smo dobili suspenzije s koncentracijo 5×10^5 MMC/mL. Iz teh osnovnih suspenzij pa smo kasneje z dvakratnimi rečitvami z medijem BioTargetTM-1, pripravili suspenzije z naslednjimi koncentracijami MMC: 25×10 , $12,5 \times 10$ in $6,25 \times 10$ celic/mL.

3.4.1 Ugotavljanje obsega celične proliferacije, izzvane z mitogenim lektinom PHA, v prisotnosti različnega števila MMC iz različnih tkiv

Načrti mikrotitrskih plošč za ugotavljanje obsega zaviranja celične proliferacije MNC oseb A in B, izzvane s PHA, z različnimi količinami MMC, izoliranih iz KM, PT in MT, po dveh darovalcev so prikazani na Slikah 1 do 6.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											
B	A	A	A	B	B	B	A+PHA	A+PHA	A+PHA	B+PHA	
C	B+PHA	B+PHA	A+PHA/KMi50	A+PHA/KMi50	A+PHA/KMi50	A+PHA/KMi25	A+PHA/KMi25	A+PHA/KMi25	A+PHA/KMi12,5	A+PHA/KMi12,5	
D	A+PHA/KMi12,5	A+PHA/KMi6,25	A+PHA/KMi6,25	A+PHA/KMi6,25	B+PHA/KMi50	B+PHA/KMi50	B+PHA/KMi50	B+PHA/KMi25	B+PHA/KMi25	B+PHA/KMi25	
E	B+PHA/KMi12,5	B+PHA/KMi12,5	B+PHA/KMi12,5	B+PHA/KMi6,25	B+PHA/KMi6,25	B+PHA/KMi6,25	KMi50+PHA	KMi50+PHA	KMi50+PHA	KMi25+PHA	
F	KMi25+PHA	KMi25+PHA	KMi12,5+PHA	KMi12,5+PHA	KMi12,5+PHA	KMi6,25+PHA	KMi6,25+PHA	KMi6,25+PHA	BT + 10 μ L DPBS	BT + 10 μ L DPBS	
G	BT + 10 μ L DPBS	BT	BT	BT							
H											

Slika 1: Načrt plošč za ugotavljanje celične proliferacije MNC oseb A in B, izzvane z mitogenim lektinom PHA, v odsotnosti in prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz kostnega mozga prvega darovalca (KMi).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											
B	A	A	A	B	B	B	A+PHA	A+PHA	A+PHA	B+PHA	
C	B+PHA	B+PHA	A+PHA/KMi50	A+PHA/KMi50	A+PHA/KMi50	A+PHA/KMi25	A+PHA/KMi25	A+PHA/KMi25	A+PHA/KMi12,5	A+PHA/KMi12,5	
D	A+PHA/KMi12,5	A+PHA/KMi6,25	A+PHA/KMi6,25	A+PHA/KMi6,25	B+PHA/KMi50	B+PHA/KMi50	B+PHA/KMi50	B+PHA/KMi25	B+PHA/KMi25	B+PHA/KMi25	
E	B+PHA/KMi12,5	B+PHA/KMi12,5	B+PHA/KMi12,5	B+PHA/KMi6,25	B+PHA/KMi6,25	B+PHA/KMi6,25	KMi50+PHA	KMi50+PHA	KMi50+PHA	KMi25+PHA	
F	KMi25+PHA	KMi25+PHA	KMi12,5+PHA	KMi12,5+PHA	KMi12,5+PHA	KMi6,25+PHA	KMi6,25+PHA	KMi6,25+PHA	BT + 10 μ L DPBS	BT + 10 μ L DPBS	
G	BT + 10 μ L DPBS	BT	BT	BT							
H											

Slika 2: Načrt plošč za ugotavljanje celične proliferacije MNC oseb A in B, izzvane z mitogenim lektinom PHA, v odsotnosti in prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz kostnega mozga drugega darovalca (KMi).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											
B	A	A	A	B	B	B	A+PHA	A+PHA	A+PHA	B+PHA	
C	B+PHA	B+PHA	A+PHA/ADi50	A+PHA/ADi50	A+PHA/ADi50	A+PHA/ADi25	A+PHA/ADi25	A+PHA/ADi25	A+PHA/ADi12,5	A+PHA/ADi12,5	
D	A+PHA/ADi12,5	A+PHA/ADi6,25	A+PHA/ADi6,25	A+PHA/ADi6,25	B+PHA/ADi50	B+PHA/ADi50	B+PHA/ADi50	B+PHA/ADi25	B+PHA/ADi25	B+PHA/ADi25	
E	B+PHA/ADi12,5	B+PHA/ADi12,5	B+PHA/ADi12,5	B+PHA/ADi6,25	B+PHA/ADi6,25	B+PHA/ADi6,25	ADi50+PHA	ADi50+PHA	ADi50+PHA	ADi25+PHA	
F	ADi25+PHA	ADi25+PHA	ADi12,5+PHA	ADi12,5+PHA	ADi12,5+PHA	ADi6,25+PHA	ADi6,25+PHA	ADi6,25+PHA	BT + 10 μ L DPBS	BT + 10 μ L DPBS	
G	BT + 10 μ L DPBS	BT	BT	BT							
H											

Slika 3: Načrt plošč za ugotavljanje celične proliferacije MNC oseb A in B, izzvane z mitogenim lektinom PHA, v odsotnosti in prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz maščobnega tkiva prvega darovalca (ADi).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											
B	A	A	A	B	B	B	A+PHA	A+PHA	A+PHA	B+PHA	
C	B+PHA	B+PHA	A+PHA/ADii50	A+PHA/ADii50	A+PHA/ADii50	A+PHA/ADii25	A+PHA/ADii25	A+PHA/ADii25	A+PHA/ADii12,5	A+PHA/ADii12,5	
D	A+PHA/ADii12,5	A+PHA/ADii6,25	A+PHA/ADii6,25	A+PHA/ADii6,25	B+PHA/ADii50	B+PHA/ADii50	B+PHA/ADii50	B+PHA/ADii25	B+PHA/ADii25	B+PHA/ADii25	
E	B+PHA/ADii12,5	B+PHA/ADii12,5	B+PHA/ADii12,5	B+PHA/ADii6,25	B+PHA/ADii6,25	B+PHA/ADii6,25	ADii50+PHA	ADii50+PHA	ADii50+PHA	ADii25+PHA	
F	ADii25+PHA	ADii25+PHA	ADii12,5+PHA	ADii12,5+PHA	ADii12,5+PHA	ADii6,25+PHA	ADii6,25+PHA	ADii6,25+PHA	BT + 10 μ L DPBS	BT + 10 μ L DPBS	
G	BT + 10 μ L DPBS	BT	BT	BT							
H											

Slika 4: Načrt plošč za ugotavljanje celične proliferacije MNC, oseb A in B, izzvane z mitogenim lektinom PHA, v odsotnosti in prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz maščobnega tkiva drugega darovalca (ADii).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											
B	A	A	A	B	B	B	A+PHA	A+PHA	A+PHA	B+PHA	
C	B+PHA	B+PHA	A+PHA/PKi50	A+PHA/PKi50	A+PHA/PKi50	A+PHA/PKi25	A+PHA/PKi25	A+PHA/PKi25	A+PHA/PKi12,5	A+PHA/PKi12,5	
D	A+PHA/PKi12,5	A+PHA/PKi6,25	A+PHA/PKi6,25	A+PHA/PKi6,25	B+PHA/PKi50	B+PHA/PKi50	B+PHA/PKi50	B+PHA/PKi25	B+PHA/PKi25	B+PHA/PKi25	
E	B+PHA/PKi12,5	B+PHA/PKi12,5	B+PHA/PKi12,5	B+PHA/PKi6,25	B+PHA/PKi6,25	B+PHA/PKi6,25	PKi50+PHA	PKi50+PHA	PKi50+PHA	PKi25+PHA	
F	PKi25+PHA	PKi25+PHA	PKi12,5+PHA	PKi12,5+PHA	PKi12,5+PHA	PKi6,25+PHA	PKi6,25+PHA	PKi6,25+PHA	BT + 10 μ L DPBS	BT + 10 μ L DPBS	
G	BT + 10 μ L DPBS	BT	BT	BT							
H											

Slika 5: Načrt plošč za ugotavljanje celične proliferacije, oseb A in B, izzvane z mitogenim lektinom PHA, v odsotnosti in prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz popkovničnega tkiva prvega darovalca (PKi).

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A											
B	A	A	A	B	B	B	A+PHA	A+PHA	A+PHA	B+PHA	
C	B+PHA	B+PHA	A+PHA/PKii50	A+PHA/PKii50	A+PHA/PKii50	A+PHA/PKii25	A+PHA/PKii25	A+PHA/PKii25	A+PHA/PKii12,5	A+PHA/PKii12,5	
D	A+PHA/PKii12,5	A+PHA/PKii6,25	A+PHA/PKii6,25	A+PHA/PKii6,25	B+PHA/PKii50	B+PHA/PKii50	B+PHA/PKii50	B+PHA/PKii25	B+PHA/PKii25	B+PHA/PKii25	
E	B+PHA/PKii12,5	B+PHA/PKii12,5	B+PHA/PKii12,5	B+PHA/PKii6,25	B+PHA/PKii6,25	B+PHA/PKii6,25	PKii50+PHA	PKii50+PHA	PKii50+PHA	PKii25+PHA	
F	PKii25+PHA	PKii25+PHA	PKii12,5+PHA	PKii12,5+PHA	PKii12,5+PHA	PKii6,25+PHA	PKii6,25+PHA	PKii6,25+PHA	BT + 10 μ L DPBS	BT + 10 μ L DPBS	
G	BT + 10 μ L DPBS	BT	BT	BT							
H											

Slika 6: Načrt plošč za ugotavljanje celične proliferacije, oseb A in B, izzvane z mitogenim lektinom PHA, v odsotnosti in prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz popkovničnega tkiva drugega darovalca (PKii).

Legenda: A, B - MNC osebe A in B, po 10^5 celic v 50 μ L; PHA – raztopina mitogenskega lektina fitohemaglutinina, s konc. 2,5 μ g v dodanih 10 μ L/ vdolbini mikrotitrne plošče; KMi – MMC, izolirane iz kostnega mozga prvega darovalca, obdelane z mitomicinom C; KMii – MMC, izolirane iz kostnega mozga drugega darovalca, obdelane z mitomicinom C; ADi – MMC, izolirane iz maščobnega tkiva prvega darovalca, obdelane z mitomicinom C; ADii – MMC, izolirane iz maščobnega tkiva drugega darovalca, obdelane z mitomicinom C; PKi – MMC, izolirane iz popkovničnega tkiva prvega darovalca, obdelane z mitomicinom C; PKii – MMC, izolirane iz popkovničnega tkiva drugega darovalca, obdelane z mitomicinom C; 50 – 50×10^3 MMC v doanih 50 μ L; 25 – 25×10^3 MMC v dodanih 50 μ L; 12,5 – $12,5 \times 10^3$ v dodanih 50 μ L; 6,25 – $6,25 \times 10^3$ v dodanih 50 μ L; BT – brezserumski medij BioTarget™-1 (slepa kontrola); DPBS – Dulbeccov fofatni pufer fiziološke raztopine.

Za MNC vsakega od darovalcev (A in B) smo torej izvedli po dva poskusa inhibicije njihove, s PHA vzpodbujene proliferacije, z dvema vzorcema MMC, izoliranimi iz različnih virov dveh

različnih darovalcev. Osnovni suspenziji MNC nesorodnih oseb A in B smo po opisanem postopku pripravili tako, da sta vsebovali po 2×10^6 celic/mL in jih nato v trojnikih po 50 μ L raztočili v ustrezne vdolbinice mikrotitrne plošče (Slike 1 do 6). Nadaljnje koncentracije MMC smo pripravili z dvakratnim redčenjem vsake predhodne suspenzije in jih prav tako v trojnikih, po 50 μ L (25×10^3 , $12,5 \times 10^3$ in $6,25 \times 10^3/50$ μ L), prenesli v vnaprej določene vdolbinice mikrotitrne plošče. Nato smo, skladno z načrtom v ustrezne vdolbinice dodali po 10 μ L osnovne raztopine PHA, s koncentracijo 250 μ g/mL. V vdolbinice, kjer je bilo to potrebno, smo nato odpipetirali še ustrezno količino medija BioTargetTM-1, da je bil končni volumen v vsaki od njih 200 μ L. Po 72 urah inkubacije pri standardnih pogojih (37°C, 5% CO₂ v zraku in 95% vlažnosti), smo v vdolbinice s celicami in slepimi kontrolami dodali po 10 μ L raztopine MTS in izvedli meritve absorbanc pri 490 nm po 7-8 urah. Ugotovili smo, da so bili rezultati zaradi zaostajanja barvila v celičnih skupkih MNC, ki jih je povzročil dodatek PHA, neuporabni, in to kljub stresanju in centrifugiranju (1 min pri 2.000 obr./min.) mikrotitrskih plošč. Zato smo meritve ponovili po dodatni inkubaciji preko noči, ko se je vse barvilo (tetrazolijeva sol) popolnoma raztopilo v mediju.

3.4.2 Ugotavljanje obsega celične proliferacije v dvosmerni MLC, v prisotnosti različnega števila MMC iz različnih tkiv

Načrti mikrotitrskih plošč za ugotavljanje obsega zaviranja alogensko izzvane celične proliferacije MNC oseb A in B v pomešanih kulturah (MLC), z različnimi količinami MMC, izoliranih iz KM, PT in MT, po dveh darovalcev, so prikazani na Slikah 7 do 12.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		A	A	A	B	B	B	AB	AB	AB	AB/KMi50	
C		AB/KMi50	AB/KMi50	AB/KMi25	AB/KMi25	AB/KMi25	AB/KMi12,5	AB/KMi12,5	AB/KMi12,5	AB/KMi6,25	AB/KMi6,25	
D		AB/KMi6,25	KMi50	KMi50	KMi50	KMi25	KMi25	KMi25	KMi12,5	KMi12,5	KMi12,5	
E		KMi6,25	KMi6,25	KMi6,25	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	
F												
G												
H												

Slika 7: Ugotavljanje obsega celične proliferacije v dvosmernih MLC, v prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz kostnega mozga prvega darovalca (KMi).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		A	A	A	B	B	B	AB	AB	AB	AB/KMii50	
C		AB/KMii50	AB/KMii50	AB/KMii25	AB/KMii25	AB/KMii25	AB/KMii12,5	AB/KMii12,5	AB/KMii12,5	AB/KMii6,25	AB/KMii6,25	
D		AB/KMii6,25	KMii50	KMii50	KMii50	KMii25	KMii25	KMii25	KMii12,5	KMii12,5	KMii12,5	
E		KMii6,25	KMii6,25	KMii6,25	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	
F												
G												
H												

Slika 8: Ugotavljanje obsega celične proliferacije v dvosmernih MLC, v prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz kostnega mozga drugega darovalca (KMii).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		A	A	A	B	B	B	AB	AB	AB	AB/ADi50	
C		AB/ADi50	AB/ADi50	AB/ADi25	AB/ADi25	AB/ADi25	AB/ADi12,5	AB/ADi12,5	AB/ADi12,5	AB/ADi6,25	AB/ADi6,25	
D		AB/ADi6,25	ADi50	ADi50	ADi50	ADi25	ADi25	ADi25	ADi12,5	ADi12,5	ADi12,5	
E		ADi6,25	ADi6,25	ADi6,25	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	
F												
G												
H												

Slika 9: Ugotavljanje obsega celične proliferacije v dvosmernih MLC, v prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz maščobnega tkiva prvega darovalca (ADi).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		A	A	A	B	B	B	AB	AB	AB	AB/ADii50	
C		AB/ADii50	AB/ADii50	AB/ADii25	AB/ADii25	AB/ADii25	AB/ADii12,5	AB/ADii12,5	AB/ADii12,5	AB/ADii6,25	AB/ADii6,25	
D		AB/ADii6,25	ADii50	ADii50	ADii50	ADii25	ADii25	ADii25	ADii12,5	ADii12,5	ADii12,5	
E		ADii6,25	ADii6,25	ADii6,25	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	
F												
G												
H												

Slika 10: Ugotavljanje obsega celične proliferacije v dvosmernih MLC, v prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz maščobnega tkiva drugega darovalca (ADii).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		A	A	A	B	B	B	AB	AB	AB	AB/PKi50	
C		AB/PKi50	AB/PKi50	AB/PKi25	AB/PKi25	AB/PKi25	AB/PKi12,5	AB/PKi12,5	AB/PKi12,5	AB/PKi6,25	AB/PKi6,25	
D		AB/PKi6,25	PKi50	PKi50	PKi50	PKi25	PKi25	PKi25	PKi12,5	PKi12,5	PKi12,5	
E		PKi6,25	PKi6,25	PKi6,25	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	
F												
G												
H												

Slika 11: Ugotavljanje obsega celične proliferacije v dvosmernih MLC, v prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz popkovničnega tkiva prvega darovalca (PKi).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		A	A	A	B	B	B	AB	AB	AB	AB/PKii50	
C		AB/PKii50	AB/PKii50	AB/PKii25	AB/PKii25	AB/PKii25	AB/PKii12,5	AB/PKii12,5	AB/PKii12,5	AB/PKii6,25	AB/PKii6,25	
D		AB/PKii6,25	PKii50	PKii50	PKii50	PKii25	PKii25	PKii25	PKii12,5	PKii12,5	PKii12,5	
E		PKii6,25	PKii6,25	PKii6,25	BT	BT	BT	BT	BT	BT	BT	
F												
G												
H												

Slika 12: Ugotavljanje obsega celične proliferacije v dvosmernih MLC, v prisotnosti različnih količin MMC, izoliranih iz popkovničnega tkiva drugega darovalca (PKii).

Legenda: A, B - MNC osebe A in B, po 10^5 celic v 50 μ L; KM_i – MMC, izolirane iz kostnega mozga prvega darovalca, obdelane z mitomicinom C; KM_{ii} – MMC, izolirane iz kostnega mozga drugega darovalca, obdelane z mitomicinom C; AD_i – MMC, izolirane iz maščobnega tkiva prvega darovalca, obdelane z mitomicinom C; AD_{ii} – MMC, izolirane iz maščobnega tkiva drugega darovalca, obdelane z mitomicinom C; PK_i – MMC, izolirane iz popkovničnega tkiva prvega darovalca, obdelane z mitomicinom C; PK_{ii} – MMC, izolirane iz popkovničnega tkiva drugega darovalca, obdelane z mitomicinom C; 50 – 50×10^3 MMC, v dodanih 50 μ L; 25 – 25×10^3 MMC, v dodanih 50 μ L; 12,5 – $12,5 \times 10^3$ MMC, v dodanih 50 μ L; 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC, v dodanih 50 μ L; BT – brezserumski medij BioTarget™-1 (slepa kontrola).

Celične suspenzije smo raztočili v vdolbinice mikrotitrne plošče v kombinacijah, ki so prikazane na načrtu plošč (Slike 7 do 12). Po 6 dneh inkubacije smo v vdolbinice s celičnimi suspenzijami in slepimi kontrolami dodali po 10 μ L raztopine MTS ter po 7-8 urni inkubaciji spektrofotometrično (aparatus UV-VIS Synergy H4) izmerili absorbance pri 490 nm. Tokrat zaradi manjšega obsega celične proliferacije po alogenski stimulaciji, v primerjavi s stimulacijo MNC s PHA, nismo imeli težav pri raztapljanju nastale vijolične soli formazana.

3.5 Zbiranje, izračunavanje in statistična analiza rezultatov

Vrednosti meritev absorbanc, ki smo jih opravili s čitalcem mikrotitrskih plošč UV-VIS Synergy H4, smo vsakič neposredno shranili v obliki podatkovnih preglednic formata Excel (Microsoft Excel 2010, ZDA). Končne vrednosti absorbanc v vdolbinicah mikrotitrskih plošč, v katere smo k stimuliranim MNC dodali različne količine ustreznih MMC, smo izračunali tako, da smo izmerjenim absorbancam odšteli povprečne vrednosti meritev pripadajočih kontrol (mikrokulture določenega števila ustreznih MMC).

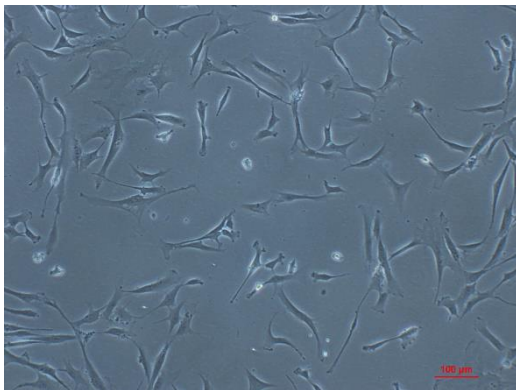
Rezultate smo statistično analizirali v programu GraphPad Prism[®] v. 6.07 (GraphPad Software, ZDA), ter jih predstavili tudi grafično. Za določanje povprečnih vrednosti posameznih meritev, standardnih odklonov (SD; ang. Standard Deviation) in standardnih napak (SEM; ang. Standard Error Mean) smo uporabili deskriptivno statistiko. Za statistično primerjavo podatkov med posameznimi celičnimi kombinacijami smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA), za analizo post hoc pa Tukeyev multiparametrični test. Kot statistično značilne smo upoštevali tiste razlike, pri katerih je bila izračunana vrednost $p \leq 0,05$.

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

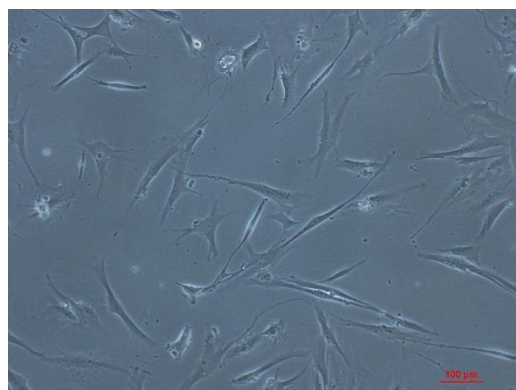
Kot dokaz uspešne oz. učinkovite inhibicije proliferacije MNC, izzvane z mitogenim rastlinskim lektinom PHA ali z aloantigeni (molekule MHC razreda II) v dvosmernih mešanih kulturah mononuklearnih celic (MLC), v prisotnosti MMC, pridobljenih iz različnih virov in od različnih darovalcev, smo upoštevali tiste rezultate, ki so bili statistično značilno različni od obsega celičnih proliferacij v mikrokulturah brez dodanih MMC (pozitivne kontrole). Za vse grafične predstavitve rezultatov velja; * - $p \leq 0,05$; ** - $p \leq 0,01$; *** - $p \leq 0,001$; **** - $p \leq 0,0001$.

4.1 Morfologije gojenih MMC, izoliranih iz različnih tkivnih virov različnih darovalcev

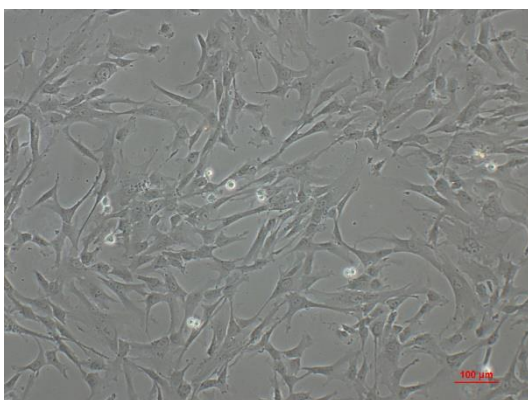
Mikrofotografije, ki prikazujejo morfologijo MMC med gojenjem v adherentnih celičnih kulturah, so v biotehnoškem podjetju Educell d.o.o., kjer so pripravili ustrezne količine MMC za naše poskuse, posneli s pomočjo invertnega svetlobnega mikroskopa. Prikazane so na Slikah 13 do 18.



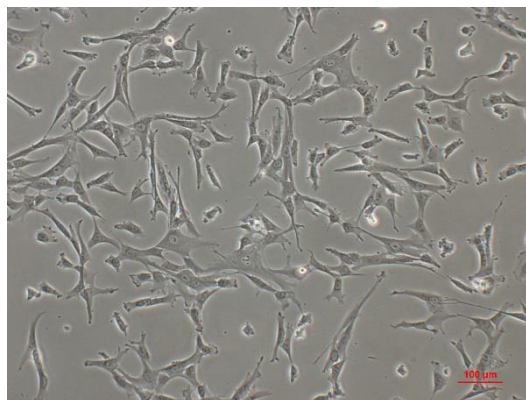
Slika 13 MMC iz kostnega mozga prvega darovalca (KM1), 100-kratna povečava



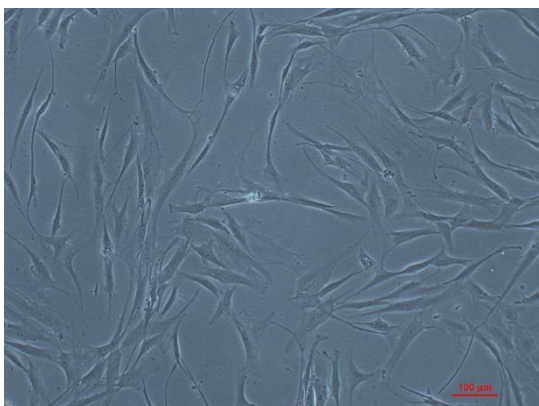
Slika 14 MMC iz kostnega mozga drugega darovalca (KM2), 100-kratna povečava



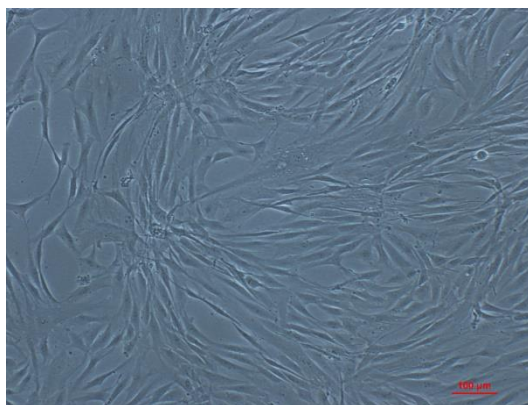
Slika 15 MMC iz popkovničnega tkiva prvega darovalca (PK1), 100-kratna povečava



Slika 16 MMC iz popkovničnega tkiva drugega darovalca, 100-kratna povečava



Slika 17 MMC iz maščobnega tkiva prvega darovalca (AD1), 100-kratna povečava

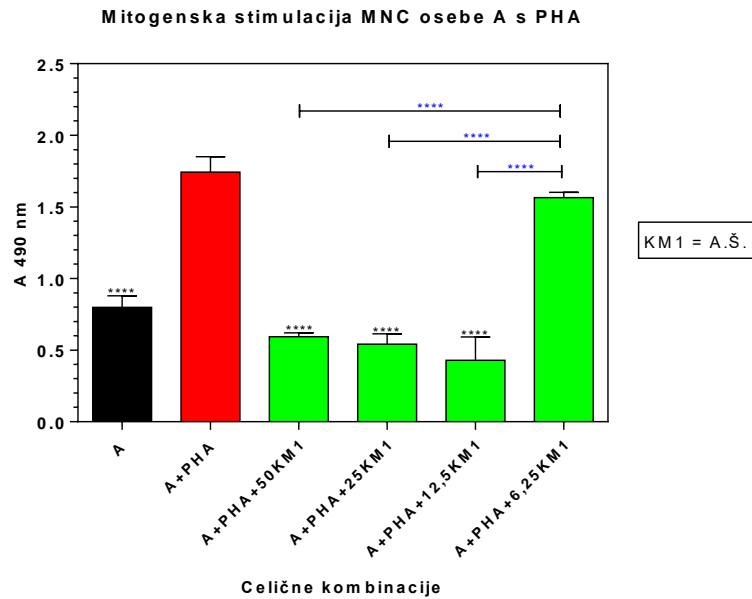


Slika 18 MMC iz maščobnega tkiva drugega darovalca (AD2), 100-kratna povečava

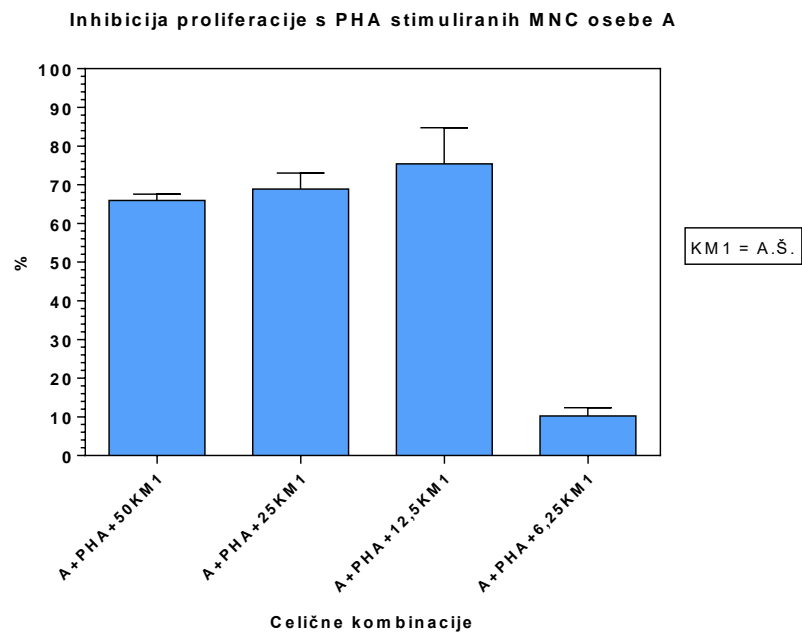
4.2 Modulacija proliferacije MNC, izzvane z mitogenim lektinom PHA

4.2.1 Določanje obsegov proliferacije MNC osebe A in B, izzvane s PHA, v prisotnosti MMC, izoliranih iz kostnega mozga dveh darovalcev (KM1 in KM2)

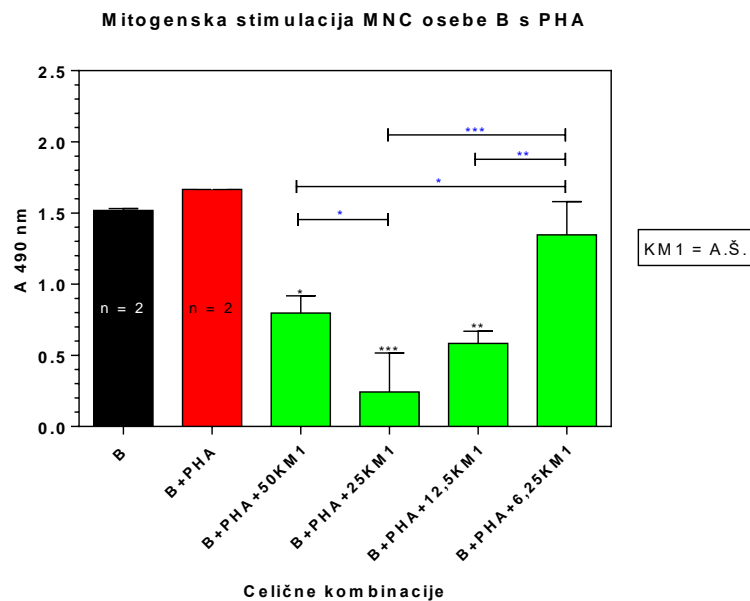
Rezultati so prikazani grafično, v obliki absorbanc, izmerjenih pri 490 nm, ob upoštevanju ustreznih kontrol (MMC s PHA) ter odstotkov inhibicije proliferacije, glede na proliferacijo pozitivnih kontrol (samo MNC, stimulirane s PHA). Omeniti moramo tehnične težave, ki smo jih imeli po dodatku reagenta MTS, zaradi zadrževanja vijolično obarvanega formazana v celičnih skupkih proliferajočih MNC po 7-8 urah, ko smo želeli izvesti meritve absorbance pri 490 nm. Zato smo morali pred končnimi določitvami absorbanc inkubacijo mikrokultur podaljšati preko noči, da se je barvilo povsem raztopilo v mediju. Zavedati se moramo namreč, da je reagenčni sestav CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, optimiziran za adherentne celice. Posledično so se pojavile določene tehnične težave, ki so se kazale v nekaterih nenormalno izstopajočih izmerjenih vrednostih absorbanc (v nekaterih primerih, ki so označeni, smo upoštevali le meritvi 2 in ne vseh treh paralelnih vzorcev) kot tudi nenormalno visokih vrednostih meritev nestimuliranih celičnih kultur MNC osebe B.



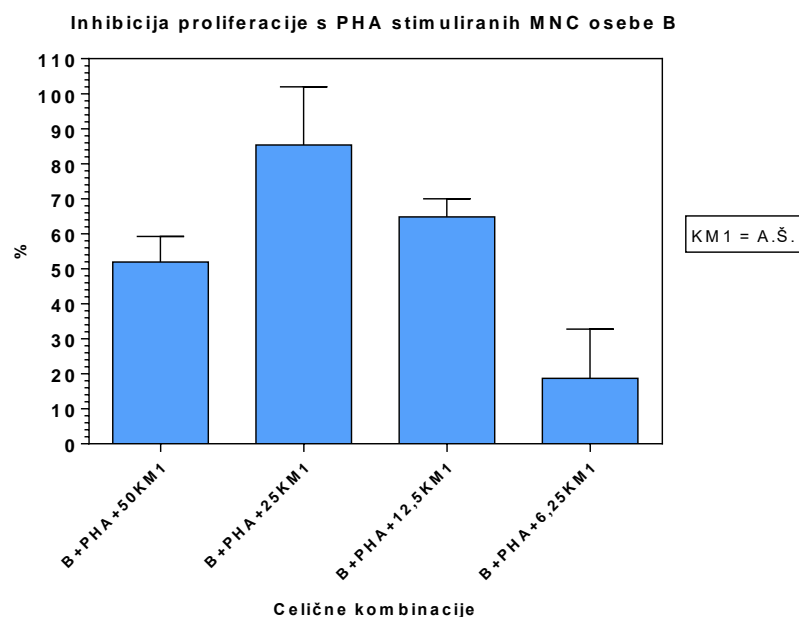
Graf 1: Prikaz obsegov proliferacije MNC osebe A, izzavane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC iz kostnega mozga prvega darovalca (KM1). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno konrolo (A+PHA), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 2×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC KM1.



Graf 2: Odstotki inhibicije proliferacije MNC osebe A, izzavane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC KM1.



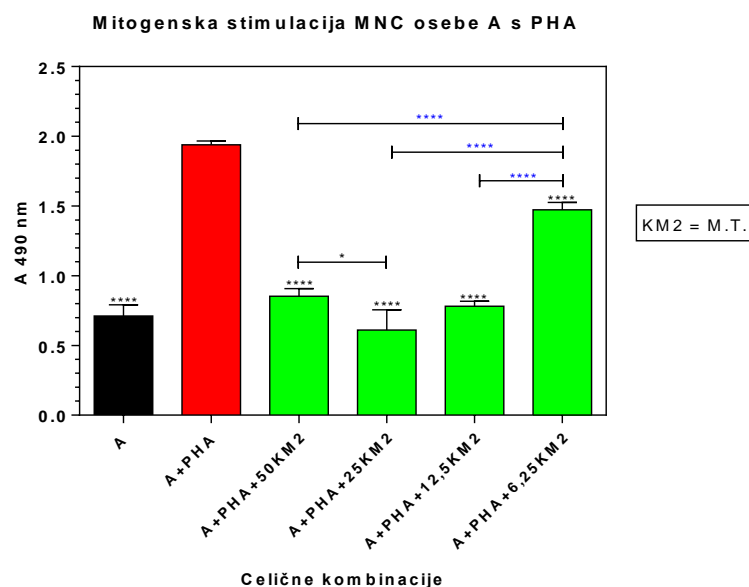
Graf 3: Prikaz obsegov proliferacije MNC osebe B, izzvane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC iz kostnega mozga prvega darovalca (KM1). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno konrolo (B+PHA), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 2×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC KM1.



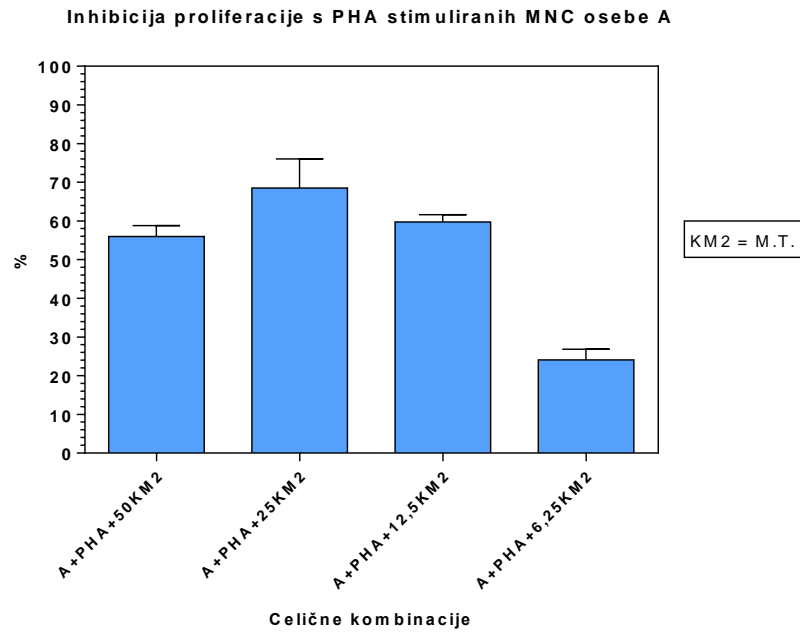
Graf 4: Odstotki inhibicije proliferacije MNC osebe B, izzvane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC KM1.

Ugotovili smo, da so MMC iz kostnega mozga prvega darovalca (KM1) učinkovito zavrlje proliferacijo MNC oseb A in B, izzvane s PHA, in sicer v koncentracijskem razponu od 50×10^3

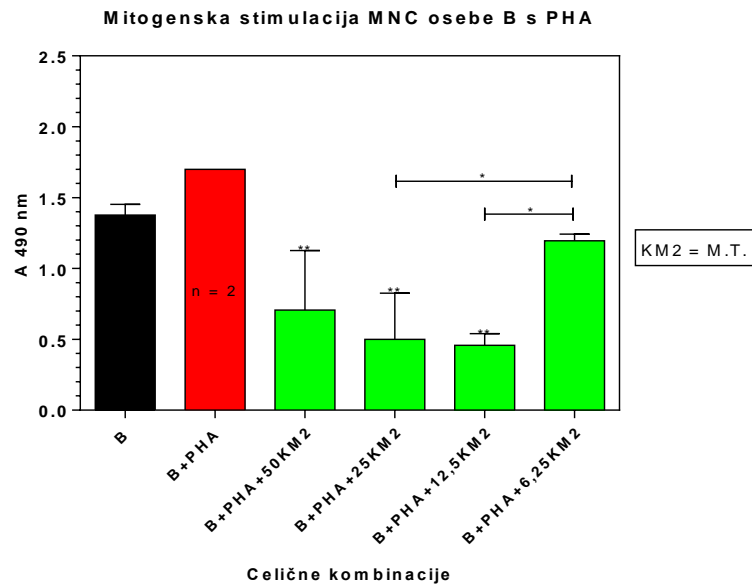
do $12,5 \times 10^3$, ne pa tudi v primeru dodatka $6,25 \times 10^3$ celic. Pri tem smo opazili nekaj manjših razlik v obsegih proliferacije MNC oseb A in B, kar je pričakovano, saj je mitogenska odzivnost MNC različnih oseb zelo pogosto različna. Medtem, ko so MMC KM1 v dodanih količinah 50×10^3 , 25×10^3 in $12,5 \times 10^3$ s statistično primerljivo učinkovitostjo zavrle mitogensko izzvano proliferacijo MNC osebe A (Grafa 1 in 2), pa so največje, statistično primerljivo zaviralno delovanje na proliferacijo osebe B, izkazale v koncentracijah 25×10^3 in $12,5 \times 10^3$ (Grafa 3 in 4). Največji izračunani povprečni obseg inhibicije proliferacije MNC osebe A z MMC KM1 je bil 75,4% ($12,5 \times 10^3$), v primeru MNC osebe B pa 85,4% (25×10^3).



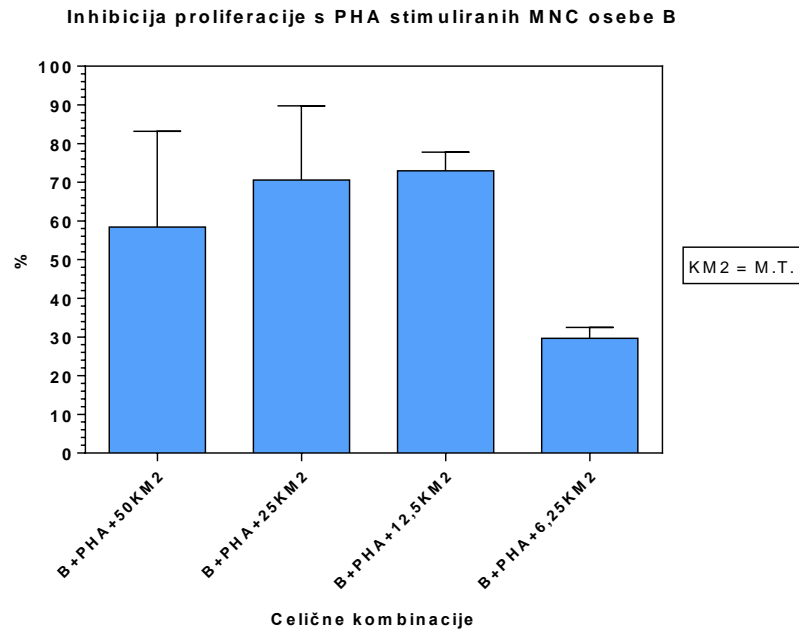
Graf 5: Prikaz obsegov proliferacije MNC osebe A, izzvane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC iz kostnega mozga drugega darovalca (KM2). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno konrolo (A+PHA), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 2×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC KM2.



Graf 6: Odstotki inhibicije proliferacije MNC osebe A, izzvale s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC KM2.



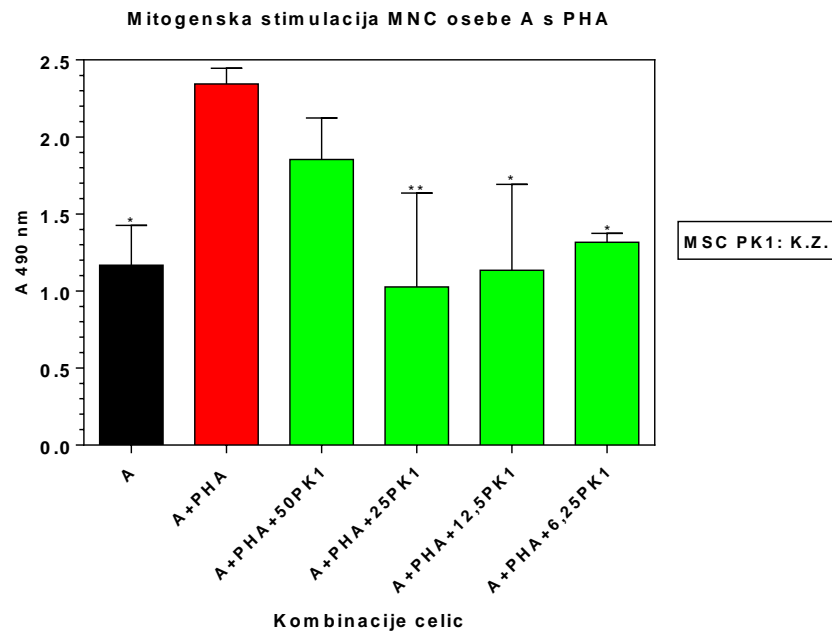
Graf 7: Prikaz obsegov proliferacije MNC osebe B, izzvale s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC iz kostnega mozga drugega darovalca (KM2). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno kontrolo (B+PHA), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 2×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC KM2.



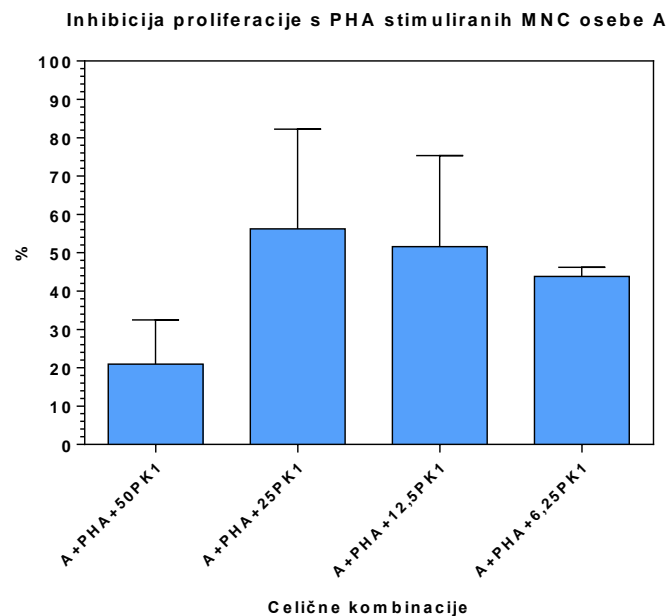
Graf 8: Odstotki inhibicije proliferacije MNC osebe B, izzvane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC KM2.

MMC iz kostnega mozga drugega darovalca (KM2) so, tako kot MMC KM1, učinkovito zavrle proliferacijo MNC oseb A in B, izzvano s PHA, in sicer v koncentracijskem razponu od 50×10^3 do $12,5 \times 10^3$, ne pa v primeru dodatka $6,25 \times 10^3$ celic k stimuliranim MNC osebe B. Predstavljeni rezultati kažejo, da so MMC KM2 v dodanih količinah 50×10^3 , 25×10^3 in $12,5 \times 10^3$ statistično primerljivo zavrle mitogensko izzvano proliferacijo MNC osebe B (Grafa 7 in 8), medtem ko so največje, statistično primerljivo zaviralno delovanje na proliferacijo MNC osebe A, izkazale v koncentracijah 25×10^3 in $12,5 \times 10^3$ (Grafa 5 in 6). Največji izračunani povprečni obseg inhibicije proliferacije MNC osebe A z MMC KM2 je bil 68,5% (25×10^3), v primeru MNC osebe B pa 73,0% ($12,5 \times 10^3$).

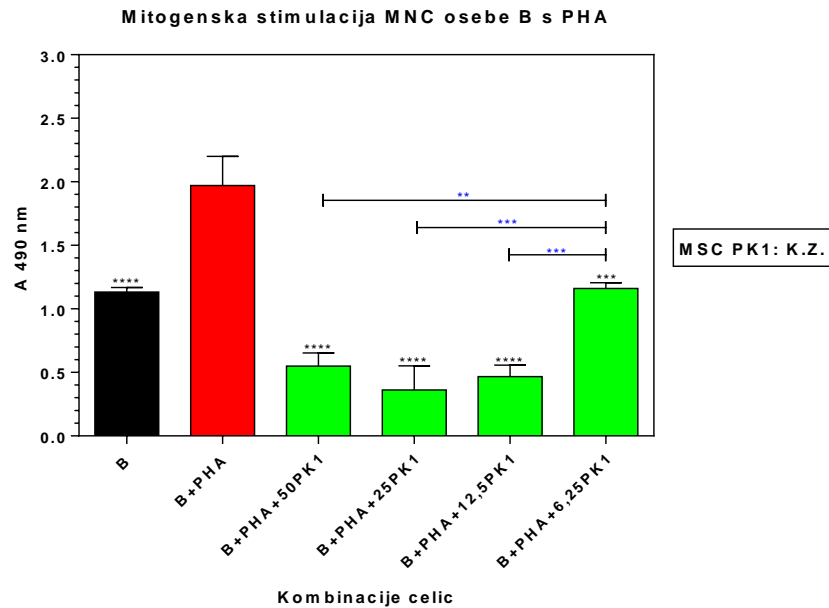
4.2.2 Določanje obsegov proliferacije MNC oseb A in B, izzvane s PHA, v prisotnosti MMC, izoliranih iz popkovničnega tkiva dveh darovalcev (PK1 in PK2)



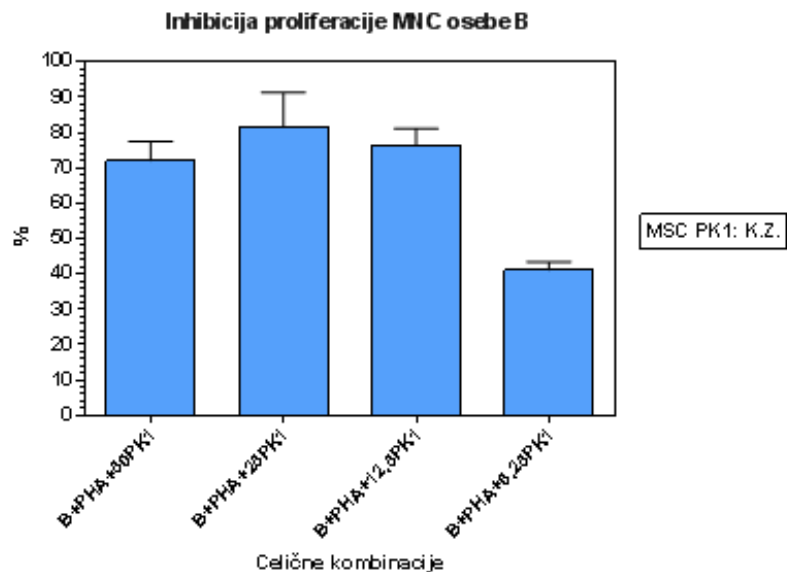
Graf 9: Prikaz obsegov proliferacije MNC osebe A, izzvane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC iz popkovničnega tkiva prvega darovalca (PK1). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno konrolo (A+PHA), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 25×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC PK1.



Graf 10: Odstotki inhibicije proliferacije MNC osebe A, izzvane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC PK1



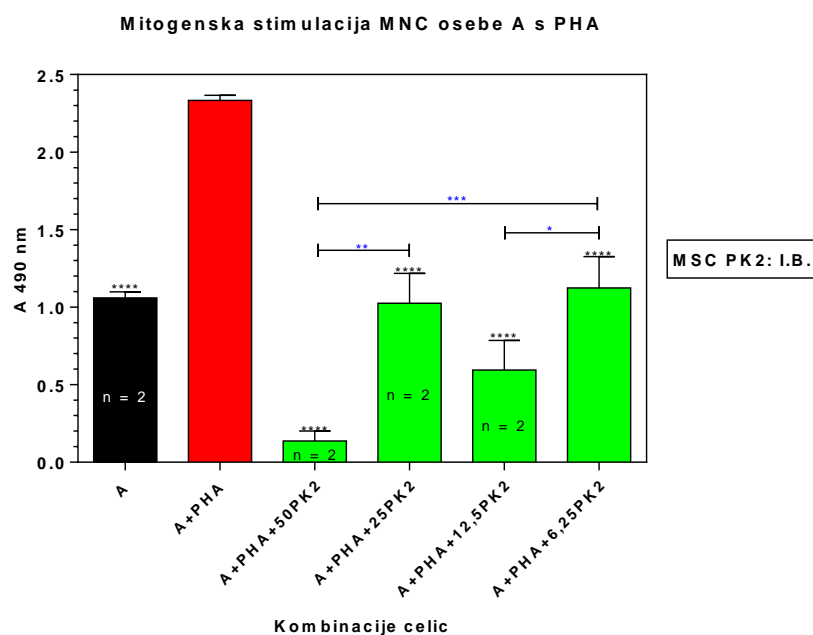
Graf 11: Prikaz obsegov proliferacije MNC osebe B, izzvane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC iz popkovničnega tkiva prvega darovalca (PK1). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno kontrolo (B+PHA), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 25×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC PK1.



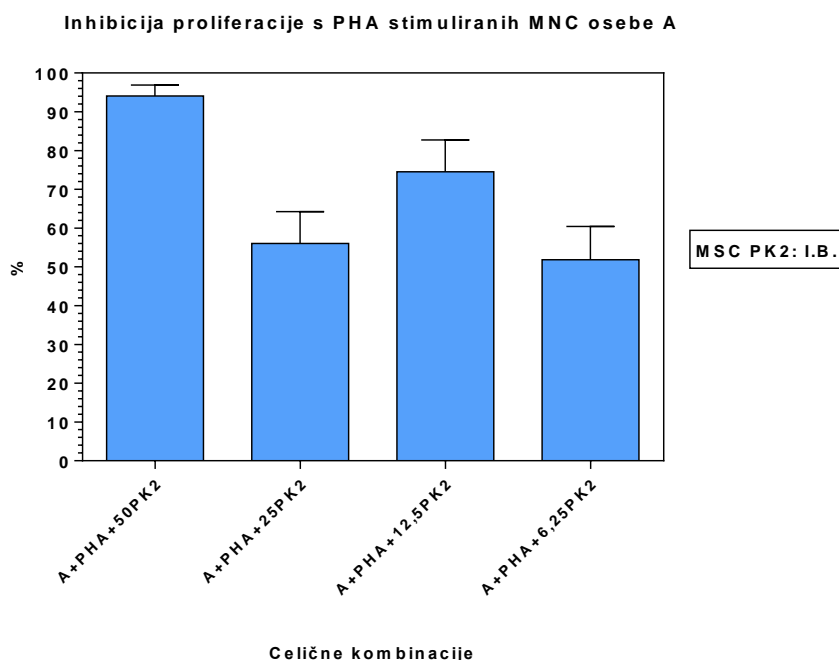
Graf 12: Odstotki inhibicije proliferacije MNC osebe B, izzvane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC PK1.

MMC iz popkovničnega tkiva prvega darovalca (PK1) so v statistično primerljivih obsegih zavrele proliferacijo MNC osebe A, v dodanih količinah 25×10^3 , $12,5 \times 10^3$ in $6,25 \times 10^3$, najmanj učinkovito pa v koncentraciji 50×10^3 celic (Grafa 9 in 10). V primeru MNC osebe B pa smo ugotovili, da so MMC PK1 delovale statistično primerljivo zaviralno v količinah 50×10^3 , 25×10^3 in $12,5 \times 10^3$, medtem ko je bila njihova imunosupresivna učinkovitost v primeru uporabe $6,25 \times 10^3$ celic najmanj učinkovita, a še vedno statistično značilna glede na pozitivno kontrolo

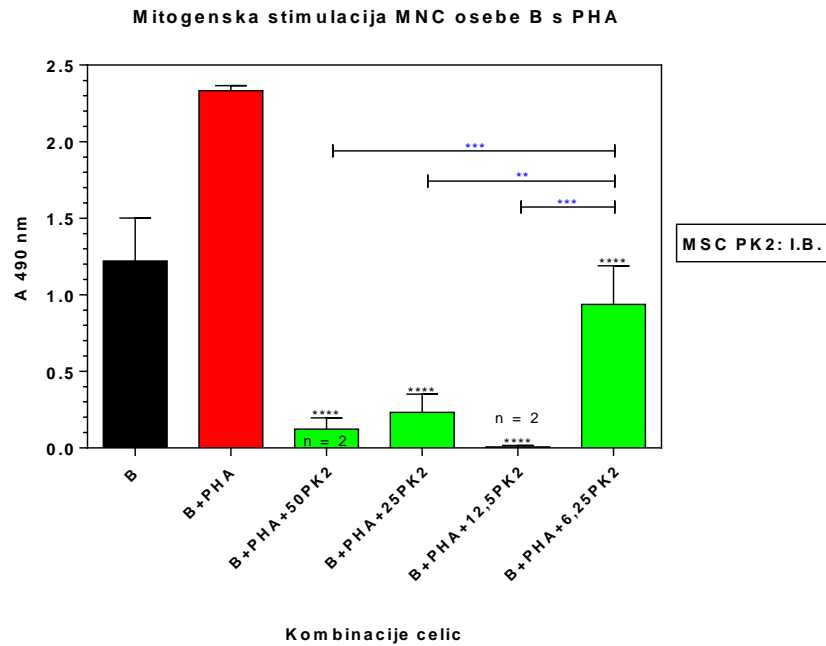
(B+PHA) (Grafa 11 in 12). Največji izračunani povprečni obseg inhibicije proliferacije MNC osebe A z MMC PK1 je bil 56,2% (25×10^3), v primeru MNC osebe B pa 81,6% (25×10^3).



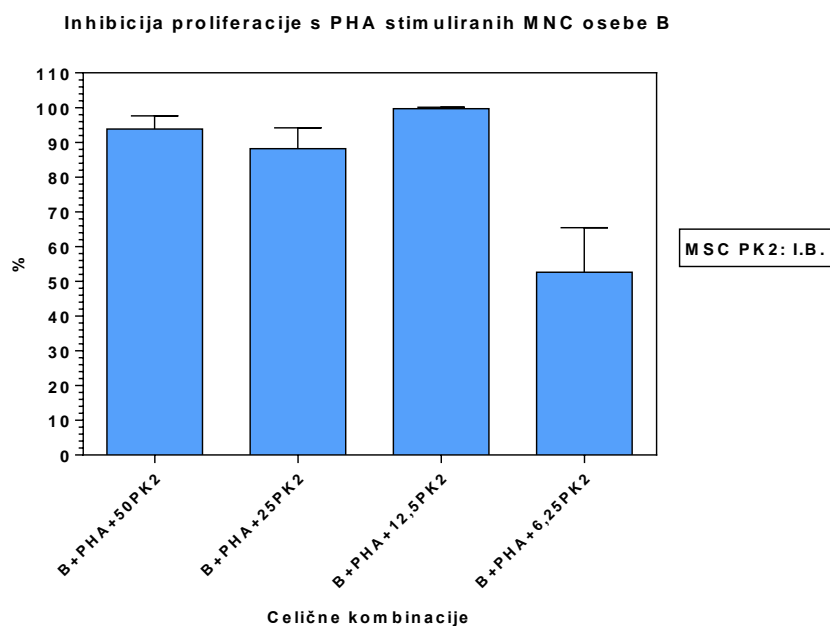
Graf 13: Prikaz obsegov proliferacije MNC osebe A, izzvane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC iz popkovničnega tkiva drugega darovalca (PK2). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno kontrolo (A+PHA), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 25×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC PK2.



Graf 14: Odstotki inhibicije proliferacije MNC osebe A, izzvane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC PK2.



Graf 15: Prikaz obsegov proliferacije MNC osebe B, izzване s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC iz popkovničnega tkiva drugega darovalca (PK2). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno konrolo (B+PHA), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 2×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC PK2.

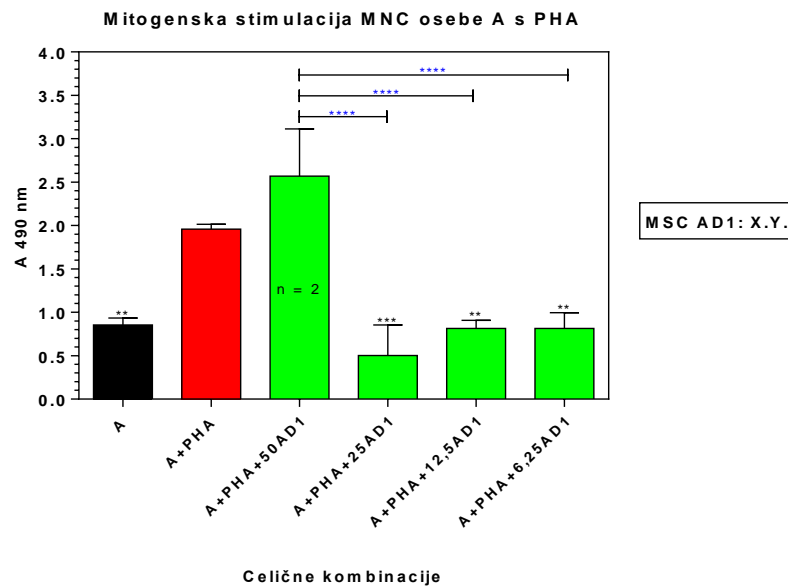


Graf 16: Odstotki inhibicije proliferacije MNC osebe B, izzване s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC PK2.

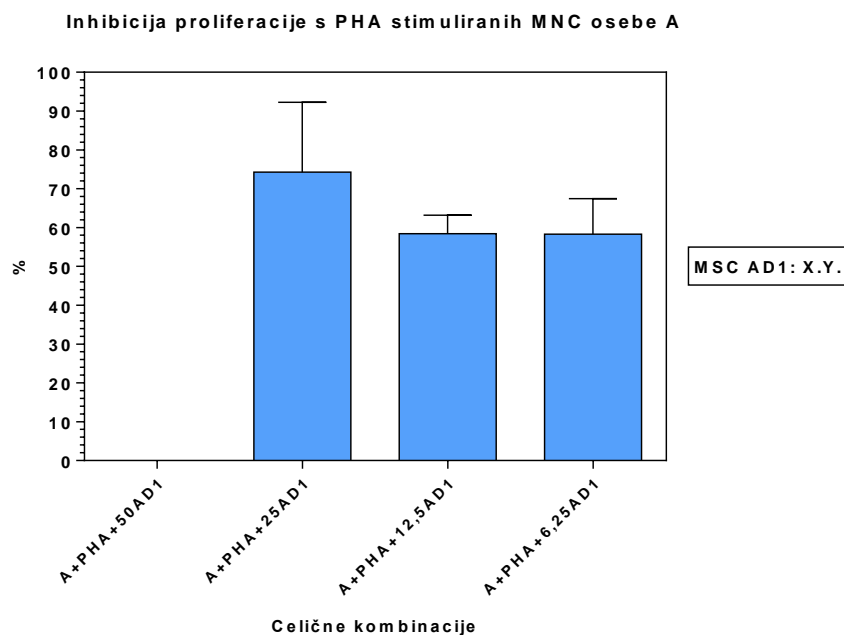
MMC iz popkovničnega tkiva drugega darovalca (PK2) so statistično značilno najučinkoviteje zavrele proliferacijo MNC osebe A v koncentraciji 50×10^3 , statistično primerljivo v koncentracijah 25×10^3 in $12,5 \times 10^3$, medtem, ko so v koncentraciji $6,25 \times 10^3$ delovale najmanj učinkovito, a še vedno statistično značilno glede na pozitivno kontrolo (A+PHA) (Grafa 13 in

14). V primeru MNC osebe B pa smo ugotovili, da so MMC PK2 na njihovo proliferacijo delovale statistično primerljivo zaviralno v obsegu od 50×10^3 do $12,5 \times 10^3$, medtem ko so bile v koncentraciji $6,25 \times 10^3$ najmanj učinkovite, a še vedno statistično značilno glede na pozitivno kontrolo (B+PHA) (Grafa 15 in 16). Največji izračunani povprečni obseg inhibicije proliferacije MNC osebe A z MMC PK2 je bil 94,1% (50×10^3), v primeru MNC osebe B pa 99,7% ($12,5 \times 10^3$).

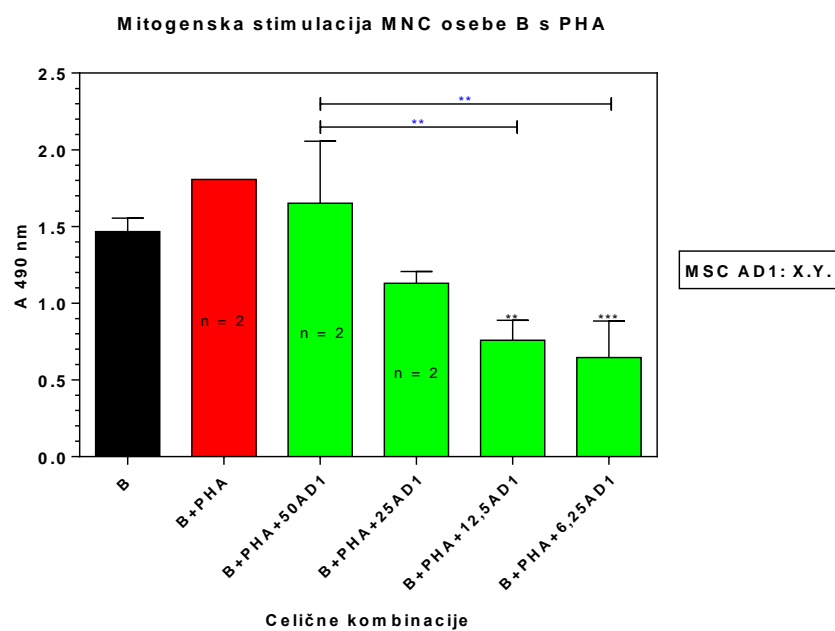
4.2.3 Določanje obsegov proliferacije MNC oseb A in B, izzvane s PHA, v prisotnosti MMC, izoliranih iz maščobnega tkiva dveh darovalcev (AD1 in AD2)



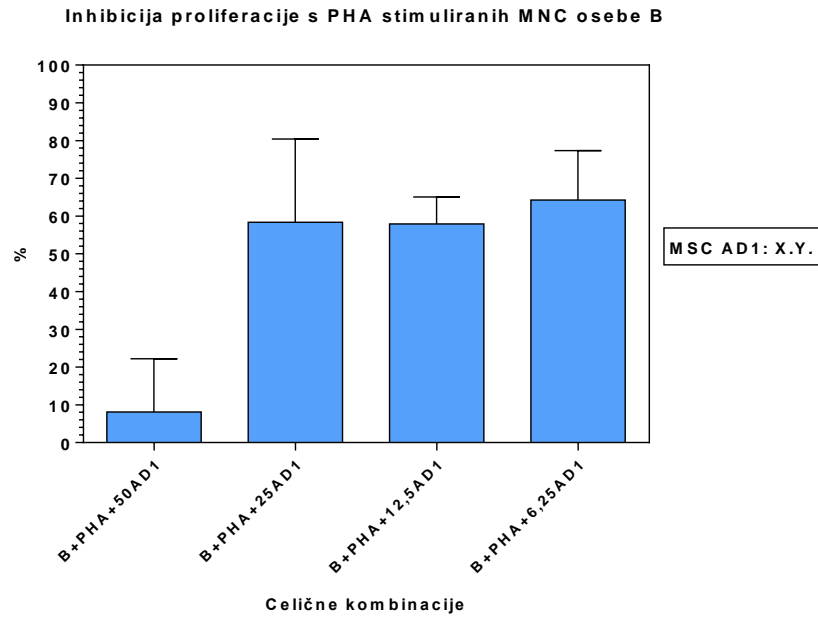
Graf 17: Prikaz obsegov proliferacije MNC osebe B, izzvane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC iz maščobnega tkiva prvega darovalca (AD1). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno kontrolo (A+PHA), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 2×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC AD1.



Graf 18: Odstotki inhibicije proliferacije MNC osebe A, izzavane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC AD1.

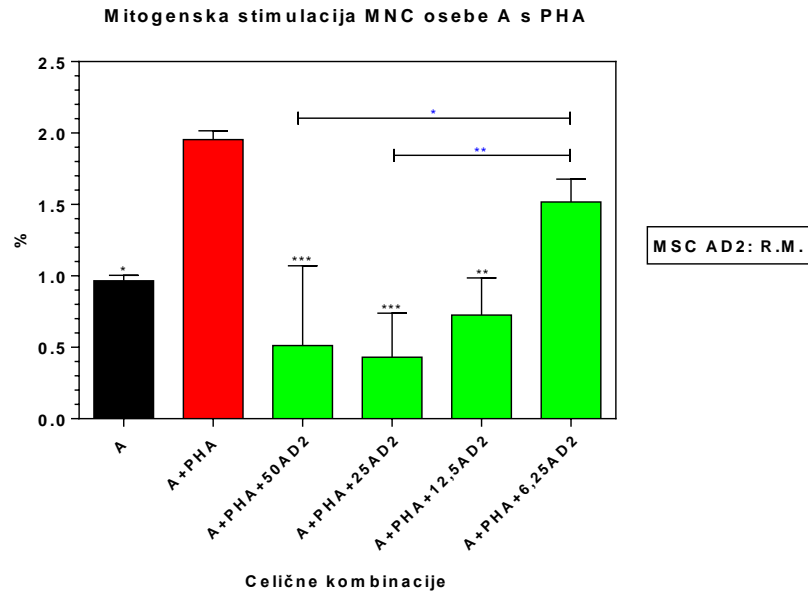


Graf 19: Prikaz obsegov proliferacije MNC osebe B, izzavane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC iz maščobnega tkiva prvega darovalca (AD1). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno konrolo (B+PHA), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 2×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC AD1

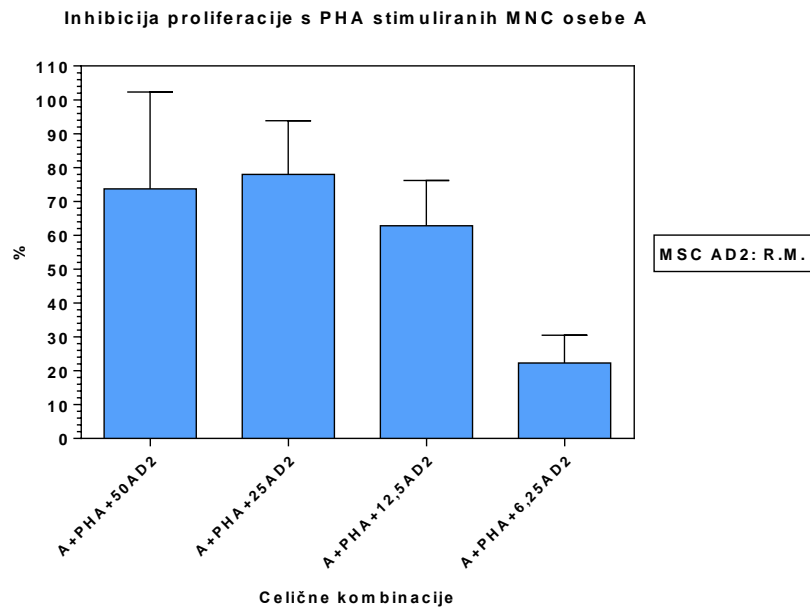


Graf 20: Odstotki inhibicije proliferacije MNC osebe B, izzvane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC AD1.

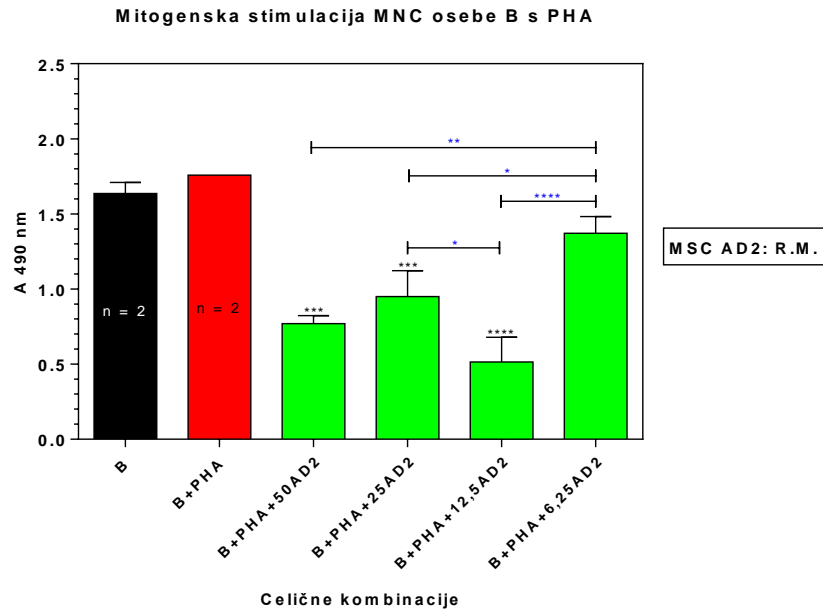
MMC iz maščobnega tkiva prvega darovalca (AD1) so v statistično primerljivih obsegih zavrle proliferacijo MNC osebe A v količinah 25×10^3 , $12,5 \times 10^3$ in $6,25 \times 10^3$, medtem ko so bile povsem neučinkovite v koncentraciji 50×10^3 celic (Grafa 17 in 18). Pri spremljanju inhibicije mitogeno vzpodbujene proliferacije MNC osebe B pa smo ugotovili, da so MMC AD1 delovale statistično primerljivo zaviralno v količinah $12,5 \times 10^3$ in $6,25 \times 10^3$, medtem ko je bila njihova imunosupresivna učinkovitost v primeru uporabe 50×10^3 in 25×10^3 celic najmanj učinkovita, saj ni bila statistično značilna glede na pozitivno kontrolo (B+PHA) (Grafa 19 in 20). Največji izračunani povprečni obseg inhibicije proliferacije MNC osebe A z MMC AD1 je bil 74,3% (25×10^3), v primeru MNC osebe B pa 64,2% ($6,25 \times 10^3$).



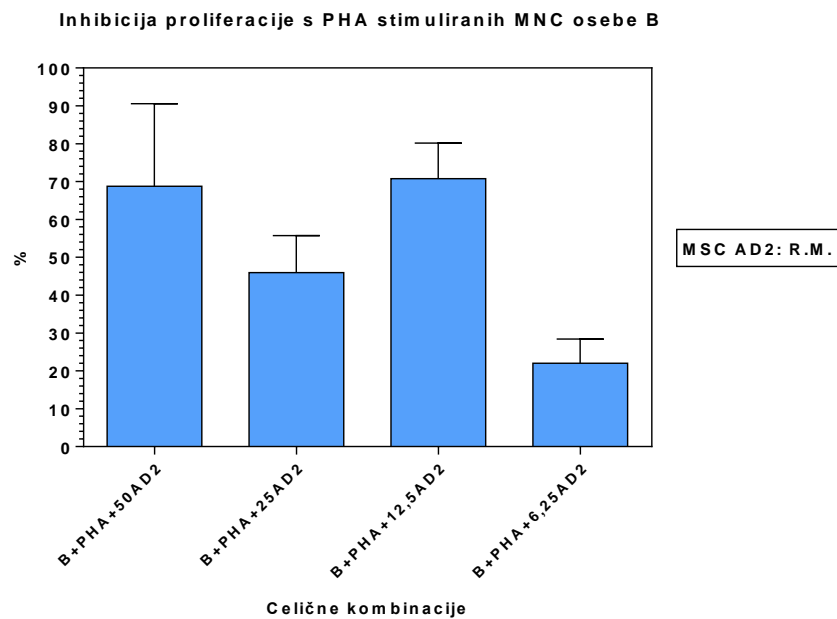
Graf 21: Prikaz obsegov proliferacije MNC osebe A, izzvane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC iz maščobnega tkiva drugega darovalca (AD2). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno konrolo (A+PHA), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 25×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC AD2.



Graf 22: Odstotki inhibicije proliferacije MNC osebe A, izzvane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC AD2.



Graf 23: Prikaz obsegov proliferacije MNC osebe B, izzvane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC iz maščobnega tkiva drugega darovalca (AD2). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno kontrolo (B+PHA), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 25×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC AD2.



Graf 24: Odstotki inhibicije proliferacije MNC osebe B, izzvane s PHA, v prisotnosti različnega števila MMC AD2.

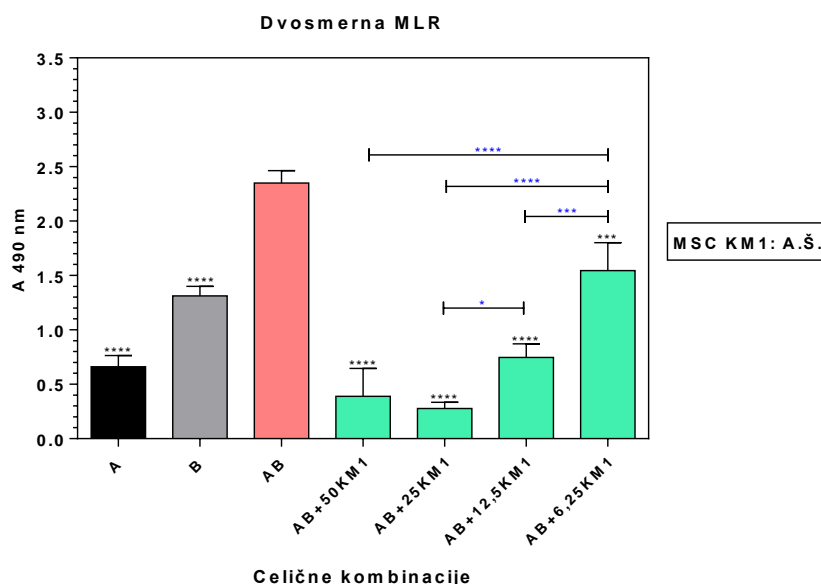
MMC iz maščobnega tkiva drugega darovalca (AD2) so v statistično primerljivih obsejih zavrele proliferacijo MNC osebe A v količinah 50×10^3 , 25×10^3 in $12,5 \times 10^3$, medtem ko so bile najmanj učinkovite v koncentraciji $6,25 \times 10^3$ celic (statistično neznačilno glede na pozitivno kontrolo A+PHA) (Grafa 21 in 22). Pri inhibiciji mitogensko vzpodbujene proliferacije MNC osebe B pa so bile MMC AD2 statistično značilno najučinkovitejše v koncentraciji $12,5 \times 10^3$

ter malo slabše, a statistično medsebojno primerljivo delujoče v količinah 50×10^3 in 25×10^3 . Njihova imunosupresivna učinkovitost v primeru uporabe $6,25 \times 10^3$ celic pa je bila najmanj učinkovita, saj ni bila statistično značilna glede na pozitivno kontrolo (B+PHA) (Grafa 23 in 24). Največji izračunani povprečni obseg inhibicije proliferacije MNC osebe A z MMC AD2 je bil 78,0% (25×10^3), v primeru MNC osebe B pa 70,8% ($12,5 \times 10^3$).

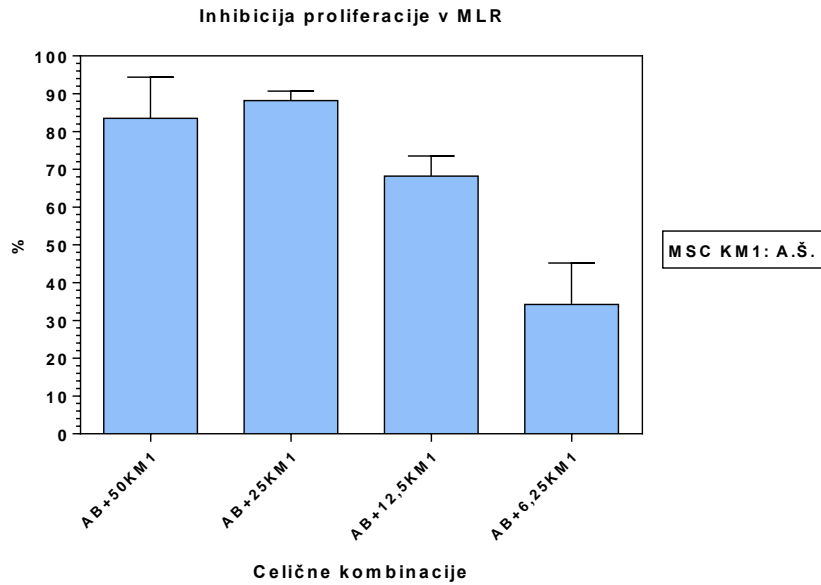
4.3 Modulacija celične proliferacije, izzvane z aloantigeni v dvosmernih kulturah pomešanih MNC oseb A in B (MLC)

Rezultati so prikazani grafično, v obliki absorbanca, izmerjenih pri 490 nm, 7,5 – 8 h po dodatku reagenta MTS, ob upoštevanju ustreznih kontrol (samo MMC) ter odstotkov inhibicije proliferacije, glede na obsege proliferacije pozitivnih kontrol (pomešane MNC oseb A in B).

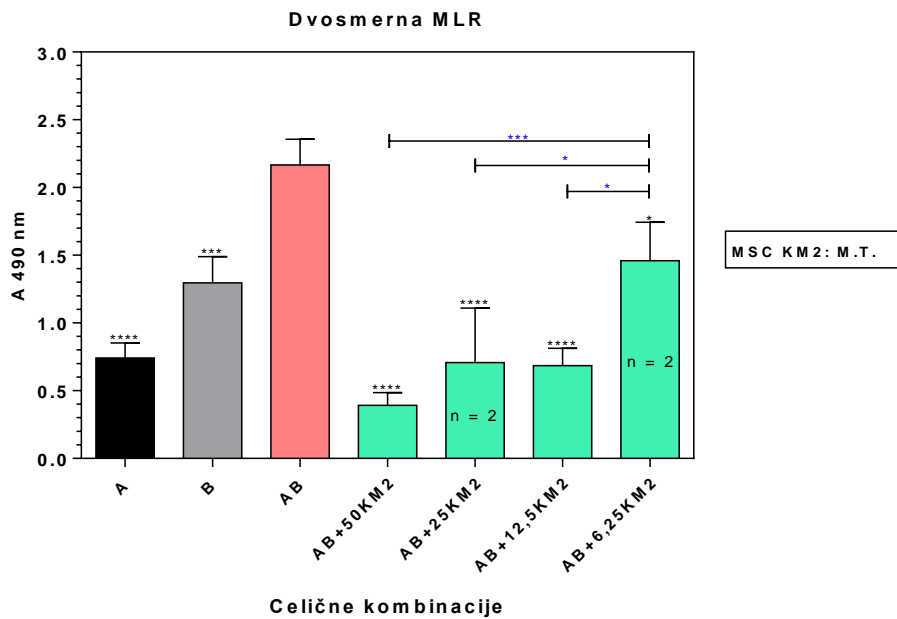
4.3.1 Določanje obsegov proliferacije v dvosmernih reakcijah pomešanih MNC oseb A in B (MLR), v prisotnosti MMC, izoliranih iz kostnega mozga dveh darovalcev (KM1 in KM2)



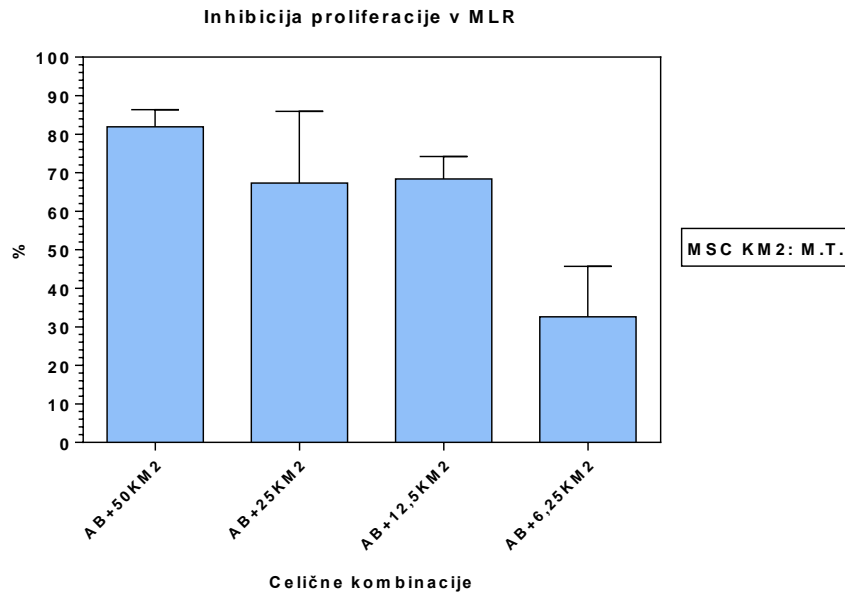
Graf 25: Prikaz obsegov proliferacije pomešanih MNC oseb A in B (AB) v dvosmernih MLR, v prisotnosti različnega števila MMC iz kostnega mozga prvega darovalca (KM1). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno kontrolo (AB), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 25×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC KM1.



Graf 26: Odstotki inhibicije proliferacije pomešanih MNC oseb A in B v dvosmernih MLR (AB), v prisotnosti različnega števila MMC KM1.



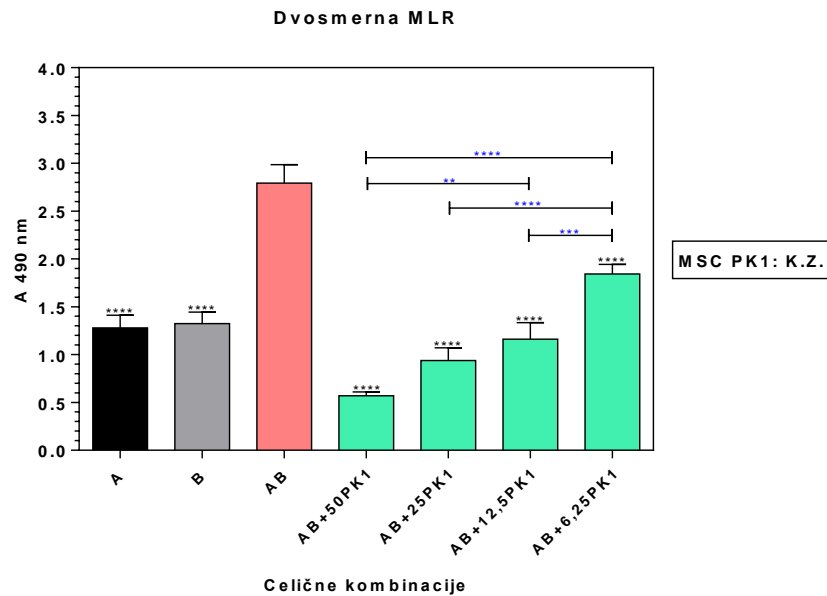
Graf 27: Prikaz obsegov proliferacije pomešanih MNC oseb A in B (AB) v dvosmernih MLR, v prisotnosti različnega števila MMC iz kostnega mozga drugega darovalca (KM2). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno konrolo (AB), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 2×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC KM2.



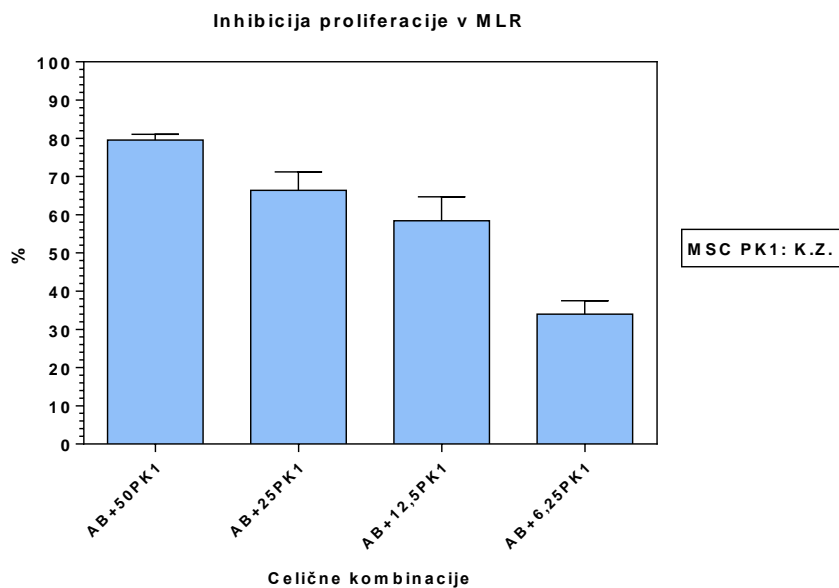
Graf 28: Odstotki inhibicije proliferacije pomešanih MNC oseb A in B v dvosmernih MLR (AB), v prisotnosti različnega števila MMC KM2.

Ugotovili smo, da so MMC iz kostnega mozga prvega darovalca (KM1) statistično značilno primerljivo učinkovito zavrle proliferacijo pomešanih MNC nesorodnih oseb A in B v dvosmernih MLR, v koncentracijah 50×10^3 in 25×10^3 celic. Malenkost šibkeje so delovale v količini $12,5 \times 10^3$, najmanj učinkovite pa so bile takrat, ko smo jih v ustrezne mikrokulture dodali po $6,25 \times 10^3$, vendar pa v obeh primerih še vedno statistično značilno glede na pozitivno kontrolo (AB) (Grafa 25 in 26). MMC iz kostnega mozga drugega darovalca (KM2) pa so statistično primerljivo učinkovito zavrle celično proliferacijo v dvosmernih MLR v koncentracijah 50×10^3 , 25×10^3 in $12,5 \times 10^3$, medtem ko je količina $6,25 \times 10^3$ celic delovala najmanj imunosupresivno, a še vedno statistično značilno glede na pozitivno kontrolo (AB) (Grafa 27 in 28). Največji izračunani povprečni obseg inhibicije alogensko izzvane proliferacije pomešanih MNC oseb A in B v dvosmernih MLR, povzročen z dodatkom MMC KM1 je bil 88,2% (25×10^3), v primeru MMC KM2 pa 81,9% (50×10^3).

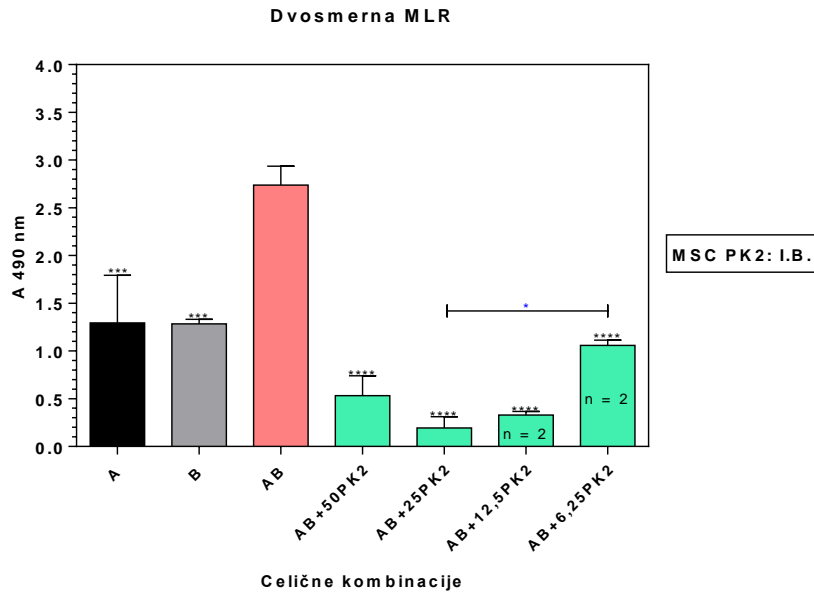
4.3.2 Določanje obsegov proliferacije v dvosmernih reakcijah pomešanih MNC oseb A in B (MLR), v prisotnosti MMC, izoliranih iz popkovničnega tkiva dveh darovalcev (PK1 in PK2)



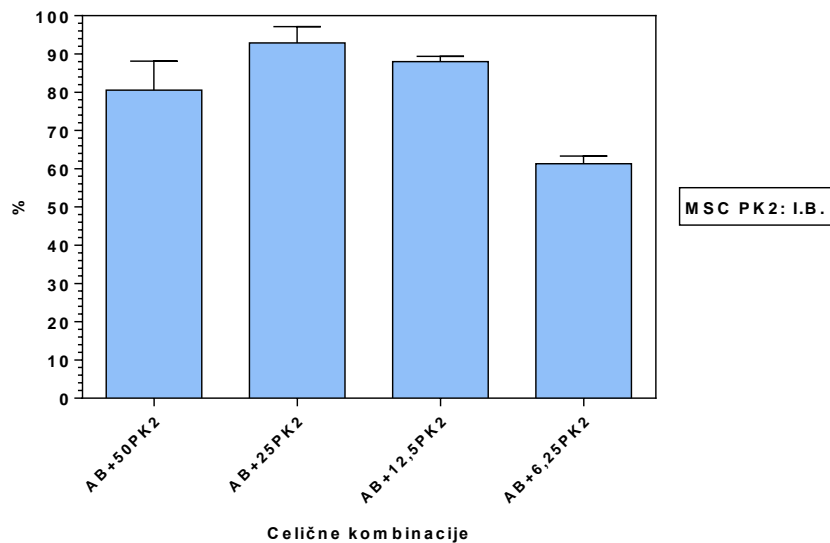
Graf 29: Prikaz obsegov proliferacije pomešanih MNC oseb A in B (AB) v dvosmernih MLR, v prisotnosti različnega števila MMC iz popkovničnega tkiva prvega darovalca (PK1). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno konvalo (AB), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 2×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC PK1.



Graf 30: Odstotki inhibicije proliferacije pomešanih MNC oseb A in B v dvosmernih MLR (AB), v prisotnosti različnega števila MMC PK1.



Graf 31: Prikaz obsegov proliferacije pomešanih MNC oseb A in B (AB) v dvosmernih MLR, v prisotnosti različnega števila MMC iz popkovničnega tkiva drugega darovalca (PK2). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno konrolo (AB), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikro kultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 2×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC PK2.

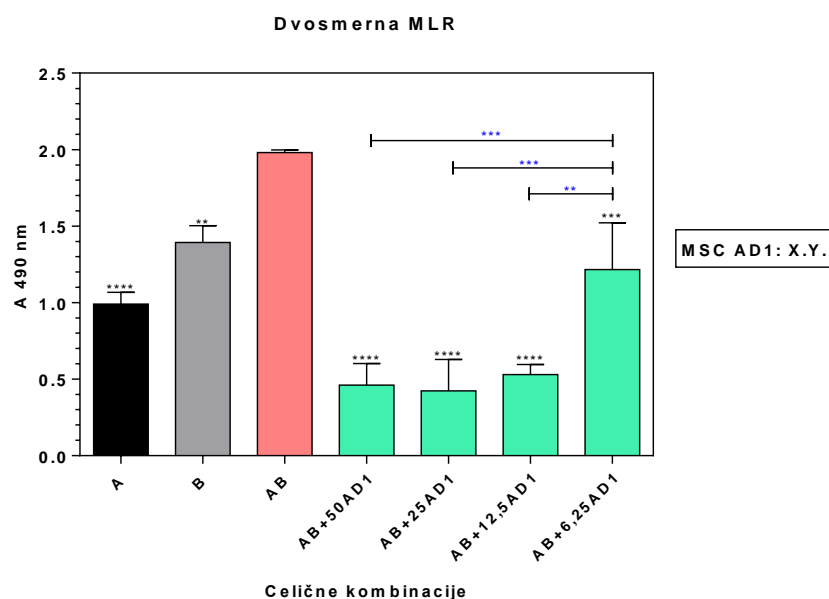


Graf 32: Odstotki inhibicije proliferacije pomešanih MNC oseb A in B v dvosmernih MLR (AB), v prisotnosti različnega števila MMC PK2.

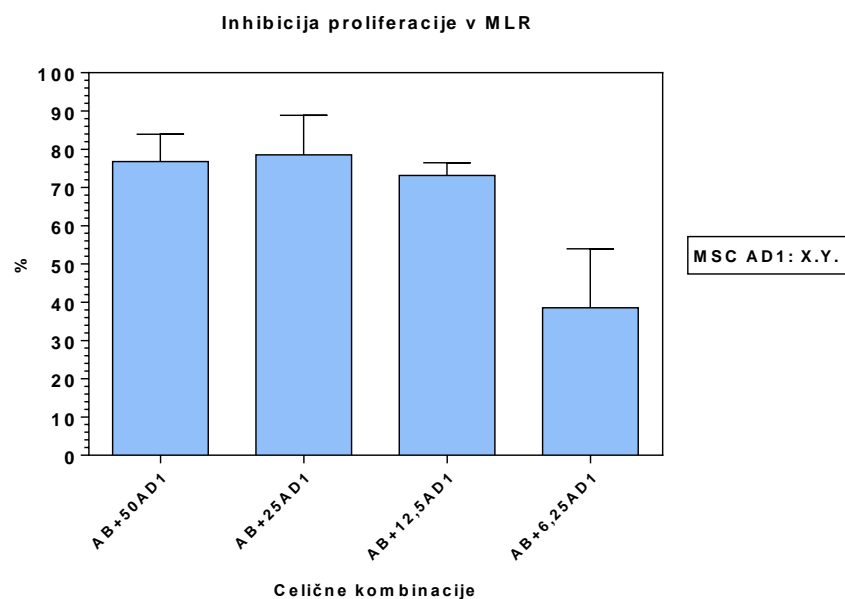
MMC iz popkovničnega tkiva prvega darovalca (PK1) so statistično značilno zavrle proliferacijo pomešanih MNC nesorodnih oseb A in B v dvosmernih MLR, v vseh uporabljenih koncentracijah 50×10^3 do $6,25 \times 10^3$ celic. Statistično primerljivo učinkovite so bile v količinah 50×10^3 in 25×10^3 . Malenkost šibkeje so delovale v količini $12,5 \times 10^3$, najmanj učinkovite pa so bile takrat, ko smo jih v ustrezne mikrokulture dodali po $6,25 \times 10^3$, vendar pa v obeh primerih še vedno statistično značilno glede na pozitivno kontrolo (AB) (Grafa 29 in 30). MMC,

pridobljene iz popkovničnega tkiva drugega darovalca (PK2) pa so statistično primerljivo učinkovito zavrle proliferacijo alogensko stimuliranih MNC v dvosmernih MLR v koncentracijah 50×10^3 , 25×10^3 in $12,5 \times 10^3$, medtem ko je količina $6,25 \times 10^3$ celic delovala najmanj imunosupresivno, a še vedno statistično značilno glede na pozitivno kontrolo (AB) (Grafa 21 in 32). Največji izračunani povprečni obseg inhibicije alogensko izzvine proliferacije pomešanih MNC oseb A in B v dvosmernih MLR, povzročen z dodatkom MMC PK1 je bil 79,6% (50×10^3), v primeru MMC PK2 pa 92,9% (25×10^3).

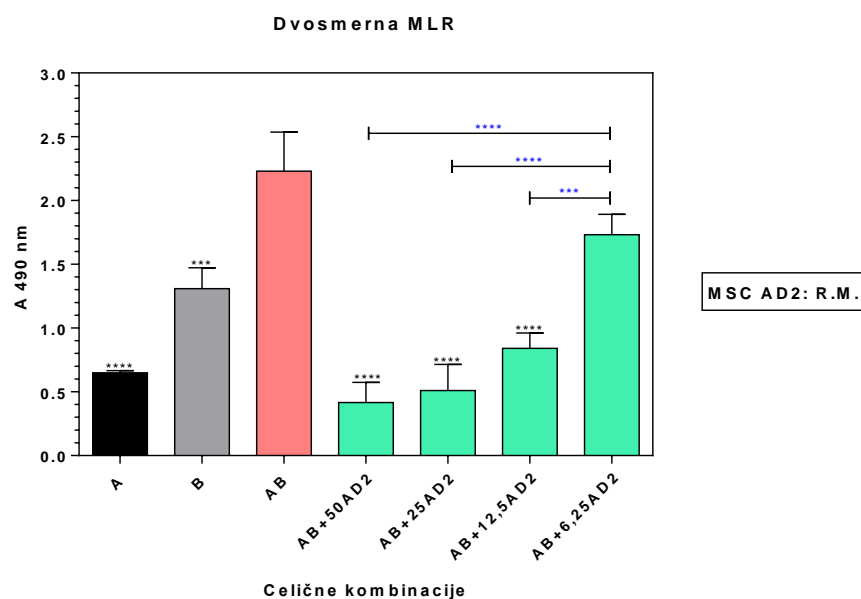
4.3.3 Določanje obsegov proliferacije v dvosmernih reakcijah pomešanih MNC oseb A in B (MLR), v prisotnosti MMC, izoliranih iz maščobnega tkiva dveh darovalcev (AD1 in AD2)



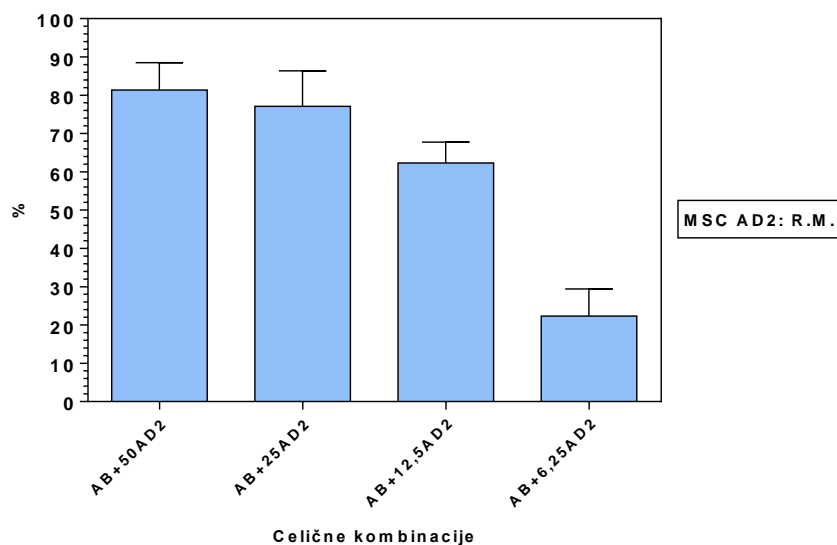
Graf 33: Prikaz obsegov proliferacije pomešanih MNC oseb A in B (AB) v dvosmernih MLR, v prisotnosti različnega števila MMC iz maščobnega tkiva prvega darovalca (AD1). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno konrolo (AB), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 25×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC AD1.



Graf 34: Odstotki inhibicije proliferacije pomešanih MNC oseb A in B v dvosmernih MLR (AB), v prisotnosti različnega števila MMC AD1.



Graf 35: Prikaz obsegov proliferacije pomešanih MNC oseb A in B (AB) v dvosmernih MLR, v prisotnosti različnega števila MMC iz maščobnega tkiva drugega darovalca (AD2). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno konrolo (AB), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 2×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC AD2.

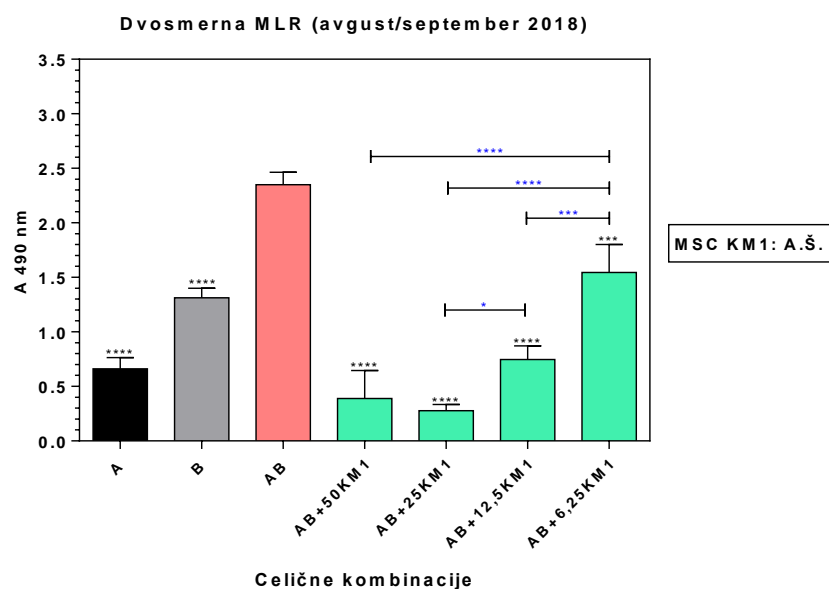
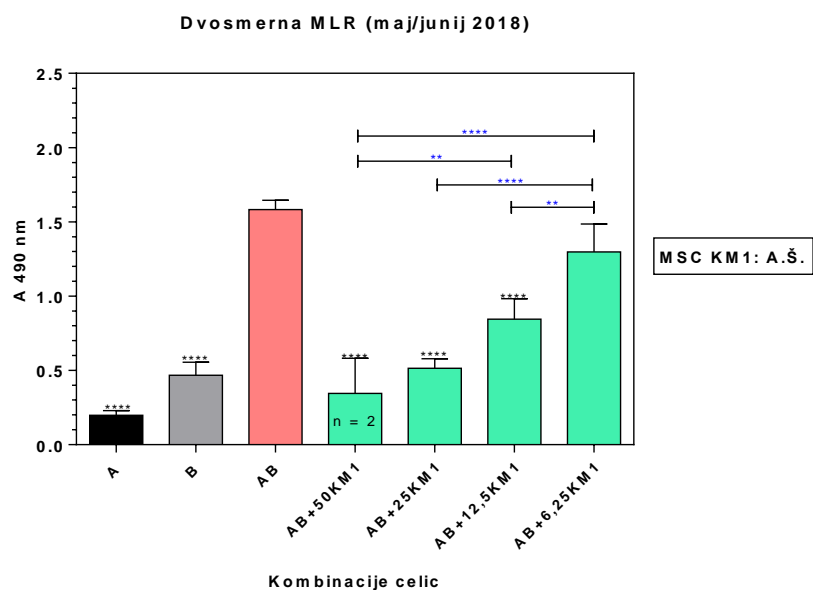


Graf 36: Odstotki inhibicije proliferacije pomešanih MNC oseb A in B v dvosmernih MLR (AB), v prisotnosti različnega števila MMC AD2.

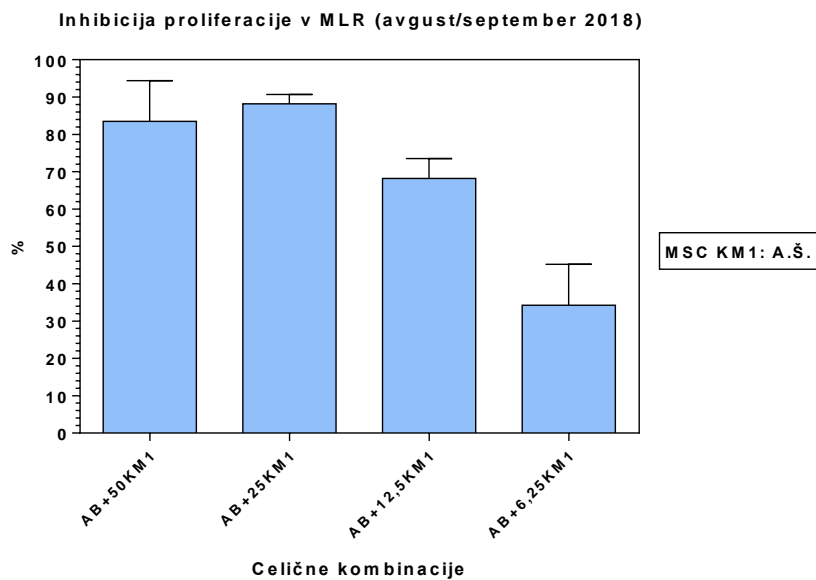
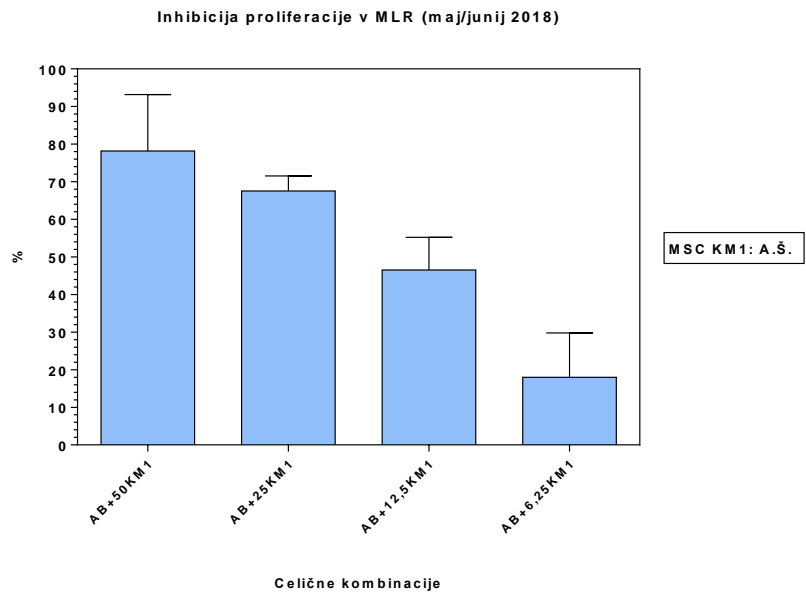
MMC iz maščobnega tkiva prvega darovalca (AD1) so statistično značilno in primerljivo zavrle proliferacijo pomešanih MNC nesorodnih oseb A in B v dvosmernih MLR, v količinah 50×10^3 , 25×10^3 in $12,5 \times 10^3$. Imunosupresivno najšibkejše delovanje pa so pokazale pri koncentraciji $6,25 \times 10^3$ celic, a je bilo to še vedno statistično značilno glede na pozitivno kontrolo (AB) (Grafa 33 in 34). MMC, pridobljene iz maščobnega tkiva drugega darovalca (AD2), so prav tako statistično primerljivo učinkovito zavrle proliferacijo alogensko stimuliranih MNC v dvosmernih MLR v koncentracijah 50×10^3 , 25×10^3 in $12,5 \times 10^3$, medtem v količini $6,25 \times 10^3$ celic niso bile učinkovite (Grafa 35 in 36). Največji izračunani povprečni obseg inhibicije alogensko izzvane proliferacije pomešanih MNC oseb A in B v dvosmernih MLR, povzročen z dodatkom MMC AD1 je bil 78,6% (25×10^3), v primeru MMC AD2 pa 81,4% (50×10^3).

4.3.4 Ponovljivost rezultatov neradioaktivnega testiranja zaviranja proliferacije pomešanih MNC oseb A in B v dvosmernih MLR, z MMC, izoliranimi iz kostnega mozga dveh darovalcev (KM1 in KM2)

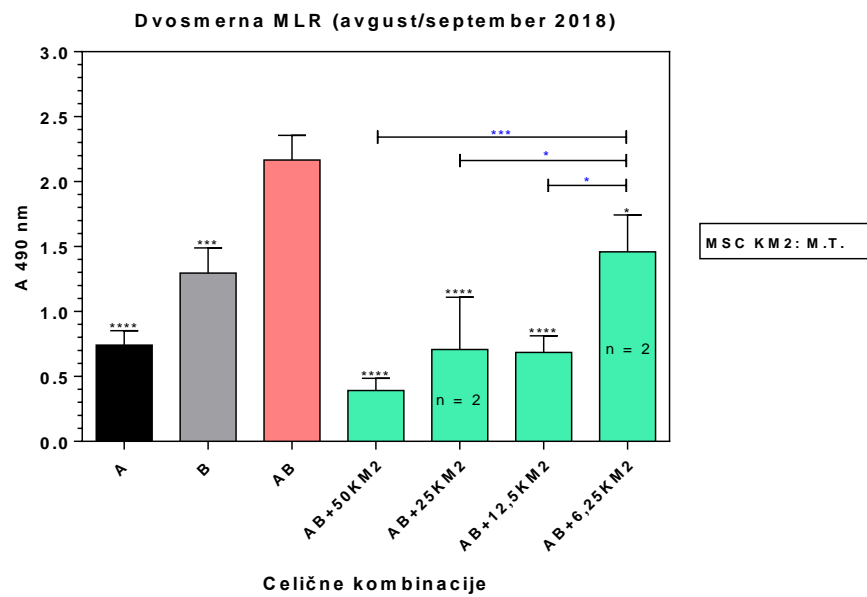
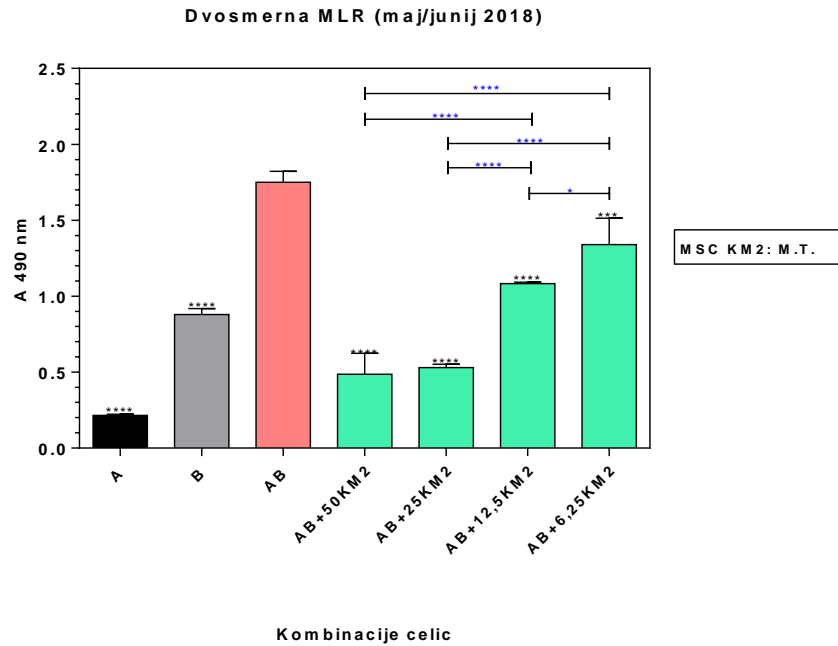
Da bi ugotovili, kako zanesljivi oz. primerljivi so rezultati ugotavljanja imunosupresivnega delovanja MMC na proliferacijo MNC, izzvano z aloantigeni v dvosmernih MLR, smo testiranje z uporabo enakih vrst celic, pod enakimi pogoji, izvedli v dveh časovnih obdobjih, prvič konec maja/začetek junija, drugič pa konec avgusta/začetek septembra 2018. Rezultati so predstavljeni v Grafih 37 do 40.



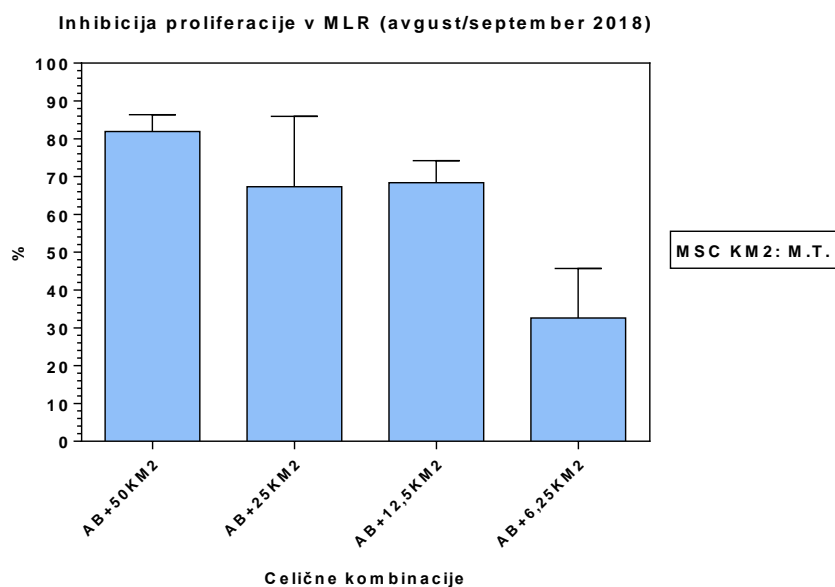
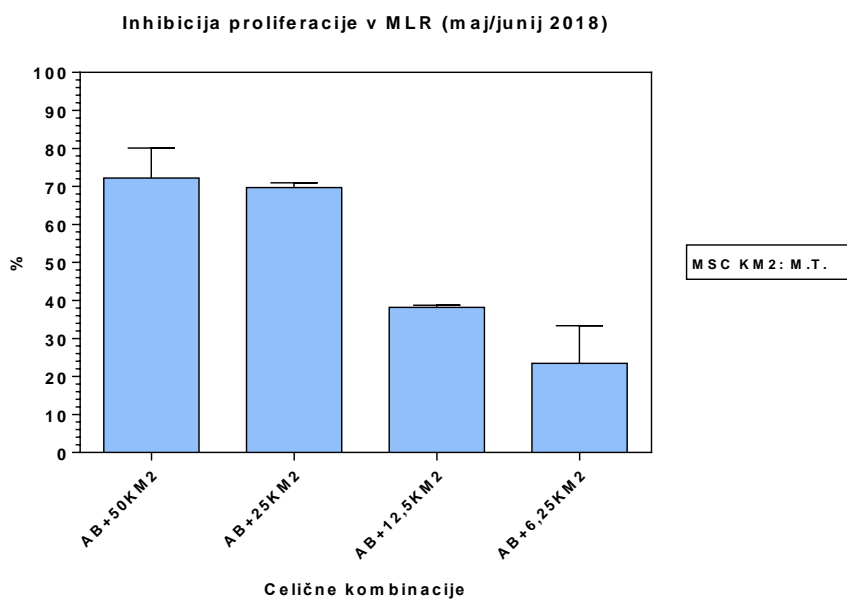
Graf 37: Primerjava obsegov proliferacij pomešanih MNC oseb A in B (AB) v dvosmernih MLR, v prisotnosti različnega števila MMC iz kostnega mozga prvega darovalca (KM1). Poskusa smo z enakimi MNC in MMC, pod enakimi pogoji izvedli konec maja in v začetku junija (zgornji graf) ter v začetku septembra 2018 (spodnji graf). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno konrolo (AB), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 2×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC KM1.



Graf 38: Primerjava odstotkov inhibicije proliferacije pomešanih MNC oseb A in B v dvosmernih MLR (AB), v prisotnosti različnega števila MMC KM1. Poskusa smo z enakimi MNC in MMC, pod enakimi pogoji izvedli konec maja in v začetku junija (zgornji graf) ter v začetku septembra 2018 (spodnji graf).



Graf 39: Primerjava obsegov proliferacij pomešanih MNC oseb A in B (AB) v dvosmernih MLR, v prisotnosti različnega števila MMC iz kostnega mozga drugega darovalca (KM2). Poskusa smo z enakimi MNC in MMC, pod enakimi pogoji izvedli konec maja in v začetku junija (zgornji graf) ter v začetku septembra 2018 (spodnji graf). Zvezdice nad stolpci označujejo statistično značilne razlike v absorbancah, glede na pozitivno kontrolo (AB), modro obarvane zvezdice pa statistično značilne razlike v absorbancah mikrokultur z dodanimi MMC. Legenda: 50 – 50×10^3 , 25 – 2×10^3 , 12,5 – $12,5 \times 10^3$ in 6,25 – $6,25 \times 10^3$ MMC KM2.



Graf 40: Primerjava odstotkov inhibicije proliferacije pomešanih MNC oseb A in B v dvosmernih MLR (AB), v prisotnosti različnega števila MMC KM2. Poskusa smo z enakimi MNC in MMC, pod enakimi pogoji izvedli konec maja in v začetku junija (zgornji graf) ter v začetku septembra 2018 (spodnji graf).

Glede na predstavljene rezultate lahko trdimo, da je naš test, ki temelji na alogensko izzvani proliferaciji pomešanih MNC dveh oseb v dvosmerni MLR, dovolj zanesljiv in ponovljiv, pri čemer lahko opažene razlike pripišemo normalnim tehnično pogojenim variacijam oz. odstopanjem, npr. na račun odmrzovanja MNC štetja celic v Neubauerjevi komori ter pripravi celičnih suspenzij.

4.4 Primerjava imunosupresivnih učinkov MMC iz različnih tkiv na mitogensko in alogensko izzvano proliferacijo MNC različnih oseb

Ker veljajo MMC, pridobljene iz kostnega mozga, za nekakšen zlati standard, smo rezultate naših testov, v katerih smo preskušali imunosupresivno delovanje omenjenih celic dveh različnih darovalcev (KM1 in KM2) upoštevali kot osnovo za primerjavo z rezultati, ki smo jih zabeležili z ostalimi MMC.

V primerih z mitogenim lektinom PHA izzvane stimulacije MNC osebe A smo ugotovili, da celične proliferacije v najvišji dodani količini (50×10^3 celic) niso uspele zavreti MMC PK1 in MMC AD1, medtem ko MMC AD2 in MMC KM1 – niso bile učinkovite pri najmanjši dodani količini ($6,25 \times 10^3$ celic). Sklepamo, da je neuspešna zavora proliferacije pri največji dodani količini MMC posledica težav zaradi zadrževanja barvila v celičnih skupkih ter oteženih stikov med MMC ter MNC (velika gostota celic). Neuspešna inhibicija pri najnižji količini pa je najverjetneje posledica premajhnega števila MMC. Ko smo s PHA stimulirali MNC osebe B, proliferacije niso učinkovito zavrle populacije celic MMC KM1, MMC KM2 in MMC AD2, in sicer v najnižji dodani koncentraciji ($6,25 \times 10^3$). MMC AD1 pa niso bile učinkovite v količini 50×10^3 in 25×10^3 celic. Sicer pa smo opazili, da so MMC iz drugih tkiv izrazile primerljive imunosupresivne učinke kot MMC KM1 in MMC KM2. V primeru mitogenske stimulacije MNC osebe A, ob upoštevanju celičnih kombinacij, pri katerih smo zaznali največji obseg inhibicije celične proliferacije, so MMC PK2 in MMC AD2 izkazale nekoliko večjo učinkovitost kot MMC KM1. V primerjavi z MMC KM2 pa so bile nekoliko uspešnejše MMC PK2, MMC AD1 in MMC AD2. To pomeni, da je bil imunosupresivni učinek MMC, pridobljenih iz ostalih tkiv, vsaj primerljiv, če ne celo nekoliko večji kot pri MMC iz KM, kar je v skladu s podatki v literaturi (16, 40, 42, 43, 50). Nekoliko večji obseg inhibicije proliferacije MNC osebe B, izzvane s PHA, so, ob upoštevanju celičnih kombinacij, ki so izrazile največji obseg inhibicije, ki so bile v tem smislu glede na KM1 najuspešnejše, izrazile MMC PK2, glede na MMC KM2 pa MMC PK1 in MMC PK2. Ko smo proliferacijo MNC izzvali z aloantigeni v dvosmernih MLC, pa učinkovite inhibicije niso izkazale le MMC AD2, in sicer pri najnižji uporabljeni količini ($6,25 \times 10^3$ celic). PHA sproži poliklonsko aktivacijo celic tako, da se veže na določene glikoproteine na celični membrani limfocitov T (kot so TCR, CD2, CD3), kar sicer posnema t.i. prvi signal za aktivacijo teh celic, odsoten pa je signal, ki ga limfocitom T posredujejo APC (16). Posledica tega je lahko, da v mikrookolju ni prisotna ustrezna količina specifičnih vnetnih citokinov, ki so nujni za optimalno imunosupresivno delovanje MMC. Zato

sklepamo, da je dvosmerna MLC bolj primerna za vrednotenje imunosupresivnih učinkov MMC kot mitogenska stimulacija s PHA, saj bolje posnema procese *in vivo*, po presaditvi alogenskih krvotvornih matičnih celic (KMC). Težava je le v tem, da so darovalci KMC za posamezne bolnike izbrani tako, da se kar najbolje ujemajo z njimi v molekulah poglobitnega kompleksa tkivne skladnosti (MHC), zato naj bi se načeloma kombinacije njihovih MNC v MLC *in vitro* ne dražile in zato tudi ne povzročale medsebojno izzvane proliferacije. Nekaj avtorjev navaja, da MMC običajno zmorejo zavreti mitogensko izzvano proliferacije MNC, ne pa vedno tiste v kulturi pomešanih MNC dveh oseb (MLC), katere obseg je odvisen predvsem od uporabljene kombinacije MNC (38,43). Mi smo bili pri tovrstnih poskusih uspešni, saj smo v pomešanih kulturah namenoma uporabili MNC dveh nesorodnih oseb, ki se med seboj razlikujeta v molekulah MHC razredov I in II, pri čemer so za alogensko izzvano proliferacijo odgovorne razlike v slednjih (razred II). V prihodnje bi zato morali opraviti še dodatne poskuse za vrednotenje imunosupresivnega učinka MMC, v katerih bi uporabili različne kombinacije MNC več nesorodnih oseb, ki bi se morali v molekulah MHC razlikovati v različnih stopnjah.

Glede na to, da smo opazili razlike tudi med populacijami MMC, pridobljenimi iz enakih tkiv, a od različnih darovalcev, na učinkovitost imunomodulacije *in vitro* očitno vplivajo interindividualne lastnosti posameznih celičnih populacij oz. njihovih donorjev. Zavedati se moramo, da razlike izhajajo tudi iz samih MNC, ki različno proliferirajo. Tako kot so to pokazali že v številnih študijah, smo tudi mi ugotovili, da je bil obseg inhibicije proliferacije na različne načine stimuliranih MNC odvisen od dodane količine MMC. Populacija MMC, pridobljena iz popkovničnega tkiva drugega darovalca (PK2) je izkazala zelo močan imunosupresiven učinek na proliferacijo MNC, in sicer tako po njihovi mitogenski kot alogenski stimulaciji. Obseg inhibicije pa je bil pri tem večji od tistega, ki smo ga opazili pri uporabi MMC, izoliranih iz kostnega mozga dveh različnih darovalcev (KM1 in KM2). Tudi Li in sod. so pokazali, da imajo MMC iz popkovničnega tkiva najmočnejši zaviralni učinek na proliferacijo limfocitov T po stimulaciji s PHA. Poleg tega so dokazali, da te celice izražajo manjše količine genov za molekule MHC razreda II kot tiste, pridobljene iz KM ali MT, zato naj bi bile še posebej primerne za klinično uporabo (50). Sicer pa več podatkov v literaturi navaja, da imajo MMC, izolirane iz MT, močnejše imunosupresivne učinke kot tiste, pridobljene iz KM (40,42,43). V našem primeru, smo tak rezultat zabeležili le v primeru zaviranja mitogenske stimulacije MNC osebe A. Poudariti je treba, da je le malo raziskav, ki bi med seboj neposredno primerjale imunosupresivno delovanje omenjenih treh populacij MMC, poleg tega pa se razlikujejo v številnih pogojih izvedbe, npr. v: načinih izolacije in gojenja

MMC, količini in času njihovega dodatka k aktiviranim MNC, razmerju MNC:MMC v mikrokulturah, vrsti in aktivacijskemu statusu imunskih celic prisotnih v mikrokulturah ter prisotnih citokinov v mikrookolju. Vsi naštetih dejavniki pa so seveda ključni za imunomodulatorno delovanje MMC. Zato bi bilo v prihodnje potrebno v čim večji meri standardizirati pogoje preskušanja imunosupresivnih učinkov različnih vrst MMC *in vitro*. Zaključimo lahko torej, da smo z našimi poskusi pokazali, da so MMC, pridobljene iz pokovničnega (PT) in maščobnega tkiva (MT) izkazale primerljive imunosupresivne učinke kot tiste, izolirane iz kostnega mozga, pri čemer so bile MMC iz PT drugega darovalca (PK2) najučinkovitejše med vsemi.

Za namene klinične uporabe bi bilo seveda smiselno, da bi predhodno, v pogojih *in vitro*, ovrednotili imunosupresivne učinke MMC izbranih darovalcev na dejanskih kombinacijah MNC darovalec presadka-njegov prejemnik ter se na osnovi rezultatov odločili za tiste MMC, ki bi bile najučinkovitejše. Poleg tega bi bilo potrebno opraviti tudi študije, s katerimi bi preverili, kako rezultati, ki jih pridobimo v okviru poskusov *in vitro*, korelirajo z dejansko imunosupresivno učinkovitostjo izbranih MMC *in vivo*. Natančno bi morali opredeliti tudi tiste skupine bolnikov, ki se na tovrstno celično terapijo dejansko odzivajo. Le tako, bomo v prihodnje lahko v kar največji meri izkoristili izjemne klinične potenciale MMC, tako pri zdravljenju imunsko posredovanih bolezni kot tudi v regenerativni medicini.

5 SKLEP

MMC so učinkovito zavre proliferacijo MNC, izzvano z mitogenim rastlinskim lektinom PHA in z aloantigeni v dvosmernih mešanih kulturah MNC dveh nesorodnih oseb (MLC). Obseg inhibicije proliferacije MNC spodbujene na ta dva načina je bil odvisen od količine dodanih MMC. Ugotovili smo, da je za *in vitro* vrednotenje imunosupresivnih učinkov MMC bolj primerna dvosmerna MLC nesorodnih oseb, saj bolje posnema procese *in vivo* po presaditvi alogenskih krvotvornih matičnih celic (KMC). Pokazali smo, da je naš neradioaktiven test za vrednotenje obsega celične proliferacije MNC, izzvane v dvosmernih mešanih MLC, dovolj zanesljiv in ponovljiv, saj smo dobili primerljive rezultate, ko smo ga izvedli v različnih časovnih obdobjih, a pod enakimi pogoji in z enakimi celičnimi populacijami.

Ugotovili smo, da imajo MMC, izolirane iz maščobnega in popkovničnega tkiva primerljive imunosupresivne učinke kot tiste iz kostnega mozga. Razlike, ki smo jih v poskusih opazili izhajajo iz individualnih lastnosti MNC in darovanih MMC ter iz virov, iz katerih so bile slednje izolirane. Opazili smo, da se tudi MMC, izolirane iz enakega tkiva, razlikovale v imunosupresivnem delovanju. To nakazuje na to, da na te mehanizme vplivajo tudi interindividualne lastnosti teh celičnih populacij oz. lastnosti njihovih darovalcev, te so lahko spol, starost, presnovna aktivnost, ... V nekaterih primerih so MMC, izolirane iz maščobnega in popkovničnega tkiva, izkazale celo nekoliko večjo inhibicijo proliferacije MNC. Populacija MMC, izoliranih iz popkovničnega tkiva drugega darovalca (PK2), se je izkazala za najučinkovitejšo. Zaključimo lahko, da MMC, izolirane iz drugih tkiv, izkazujejo podobne imunosupresivne lastnosti kot tiste iz kostnega mozga. Zaradi tega so prav tako primerne za klinično uporabo, njihovo pridobivanje je enostavnejše, izplen količine celic pa večji. Za namene klinične uporabe v prihodnje bi bilo najprej potrebno izvesti teste *in vitro* za vrednotenje imunosupresivnega učinka na dejanskih kombinacijah celic darovalec – prejemnik, kot tudi preizkusiti različne celične populacije samih MMC (četudi izoliranih iz enakega tkiva). Prav tako bi bilo ustrezno opredeliti, kako na imunosupresivne učinke MMC vplivajo različne stopnje ujemanj v molekulah MHC razreda II med darovalcem in prejemnikom. To bi nam omogočilo optimalno izbiro celične populacije MMC in karseda največjo uspešnost tovrstne celične terapije v pogojih po presaditvi alogenskih KMC.

6 LITERATURA

1. Ullah I, Subbarao R B, Rho G J: Human mesenchymal stem cells – current trends and future prospective. *Bioscience Reports* 2015; 35: e00191
2. Zhao Q, Ren H, Han Z: Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of cellular immunotherapy* 2016; 2: 3-20
3. Rožman P, Strbad M, Knežević M: Uporaba matičnih celic v medicini. Genialna prihodnost- genetika, determenizem, svoboda- zbornik prispevkov 2007;202-212
4. https://c.ymcdn.com/sites/www.celltherapysociety.org/resource/resmgr/CommunityResources/ISCT_MSCpositionPaper.pdf, dostopno 25.8.18
5. TacGhee Y, Sun U S: Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Archives of Pharmacal Research* 2012; 35: 213-221
6. Castro-Manrreza M E, Montesinos J J: Immunoregulation by mesenchymal stem cells: Biological aspects and clinical applications. *Journal of Immunology research* 2015; 394917
7. Squillaro T, Peluso G, Galdersi U: Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell Transplantation* 2016; 25: 829-848
8. Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth S E, Ringden O: Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scandinavian Journal of Immunology* 2003;57:11-20
9. Hong H S, Kim Y H, Son Y: Perspectives on mesenchymal stem cells: tissue repair, immune modulation, and tumor homing. *Archives of pharmacal research* 2012; 35: 201-211
10. Obrez M, Montaln H, Tajnšek U, Lah Turnšek Tamara: Vloga matičnih celic pri napredovanju in zdravljenju glioma. *Zdravniški vestnik* 2013; 82: 113-122
11. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y: Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell death and differentiation* 2014; 21: 216-225

12. Chen G, Yue A, Ruan Z, Yin Y, Wang R, Ren Y, Zhu L: Monitoring the biology stability of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells during long-term culture in serum-free medium. *Cell Bank Tissue* 2014; 15: 513-521
13. Duffy M M, Ritter T, Ceredig R, Griffin M: Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem cell research & therapy* 2011; 2: 34
14. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Annanziato F: Role for interferon- γ in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells* 2006;24:386-398
15. Bernardo M E, Fibbe W E: Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell stem cell* 2013; 13: 392-402
16. Riberio A, Laranjeira P, Mendes S, Velada I, Leite C, Andrade P, Santos F, Henriques A, Graos M, Cardoso C M P, Martinho A, Pais M, Lobato da Silva C, Cabral J, Trindade H, Paiva A: Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Research&Therapy* 2013; 4: 125
17. Zupan J, Čamernik K, Jeras M, Barlič A, Drobnič M, Marc J: Mezenhimske matične celice: uporaba in potencial za zdravljenje ter diagnostiko mišično skeletnih bolezni. *Farmacevtski vestnik* 2017;68:234-247
18. Male D, Brostoff J, Roth D B, Roitt I: *Immunology*, 7.izdaja, Elseiver, 2006, str. 154-155
19. Lim J H, Kim J S, Yoon H, Shin J S, Nam H Y, Yang S H, Kim S J, Park C G: Immunomodulation of delayed-type hypersensitivity responses by mesenchymal stem cells is associated with bystander T cell apoptosis. *The Journal of Immunology* 2010; 185: 4022-402999999
20. Cagliani J, Grande D, Molmenti E P, Miller E J, Rilo H L R: Immunomodulation by mesenchymal stromal cells and their clinical applications. *J Stem cell regen biol.* 2017; 3: 2
21. English K, Ryan J M, Tobin L, Murphy M J, Mahon B P: Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human

- mesenchymal stem cell induction of CD4⁺CD25(High) forkhead box P3⁺ regulatory T cells. *Clinical&Experimental Immunology* 2009; 156: 149-160
22. Afzali B, Mitchell P, Lechler RI, John S, Lombardi G: Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells. *Clinical&Experimental Immunology* 2009; 159: 120-130
 23. Prevosto C, Zancolli M, Canevali P, Zocchi MR, Poggi A: Generation of CD4⁺ or CD8⁺ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica* 2007; 92: 881-888
 24. Rasmusson I, Ringden O, Sundberg B, Le Blanc K: Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 2003; 76: 1208-1213
 25. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M: Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogen stimuli. *Blood* 2002;99(10).3838-3843
 26. Najjar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H: Bone marrow mesenchymal stromal cells induce proliferative, cytokinetic and molecular changes during the T cell response: the importance of the IL-10/CD210 axis. *Stem Cell Reviews and reports* 2015; 11(3): 442-452
 27. Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, Roberts AI, Le AD, Shi S, Shao C, Shi Y: Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *Journal of Immunology* 2010; 184: 2321-2328
 28. Yan Z, Zhuansun Y, Chen R, Li J, Ran P: Immunomodulation of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells and its possible mechanism. *Experimental cell research* 2014; 324(1): 65-74
 29. Giuliani M, Fleury M, Vernochet A: Long-lasting inhibitory effects of fetal liver mesenchymal stem cells on T-lymphocyte proliferation. *PLoS ONE* 2011; 6(5): e119988
 30. Ghannam S, Pene J, Torcy-Moquet G, Jorgensen C, Yssel H: Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *Journal of immunology* 2010; 185(1): 302-312

31. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=mesenchymal+stem+cells&cntry=&state=&city=&dist=> dostopno 3.9. 2018
32. Tiercy JM: How to select the best available related or unrelated donor of hematopoietic stem cells?. *Haematologica* 2016;101(6): 680–687
33. Shipounova N I, Petinati N A, Bigildeev A E, Zezina E A, Drize N I, Kuzmina L A, Parovichnikova E N, Savchenko V G: Analysis of results of acute graft-versus-host disease prophylaxis with donor multipotent mesenchymal stromal cells in patients with hemoblastoses after allogenic bone marrow transplantation. *Biochemistry (Moscow)* 2014; 79: 12, 1363-1370
34. Munneke M J, Spruit M J A, Cornelissen A S, van Hoeven V, Voermans C, Hazenberg M D: The potential of mesenchymal stromal cells as treatment for severe steroid-refractory acute graft-versus-host disease: A critical Review of Literature. *Transplantation* 2016; 100: 2309-2314
35. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O: Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 2004;363:1439-1441
36. Česen Mazič M, Girandon L, Knežević M, Avčín S L, Jazbec J: Treatment of severe steroid-refractory acute-graft-vs.-host disease with mesenchymal stem cells-single center experience. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 2018;6:93
37. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringdén O: Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008;10:371(9624):1579-1586
38. Polchert D, Sobinsky J, Douglas GW, Kidd M, Moadsiri A, Reina E, Genrich K, Mehrota S, Setty S, Smith B, Bartholomew A: IFN- γ activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *European Journal of Immunology* 2008; 38: 1745-1755
39. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R: Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling* 2011; 9: 12

40. Mattar P, Bieback K: Comparing the immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth-associated tissue mesenchymal stromal cells. *Frontiers in Immunology* 2015; 6:560
41. Najar M, Raicevic G, Boufker HI, Fayyad Kazan H, De Bruyn C, Meuleman N: Mesenchymal stromal cell use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: combined comparison of adipose tissue, Wharton's jelly and bone marrow sources. *Cell Immunology* 2010;26: 171-179
42. Li C, Wu X, Tong J, Yang X, Zhao J, Zheng Q, Zhao G, Ma Z: Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Research & Therapy* 2015;6:55
43. Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A: Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British journal of haematology* 2004;129:118-129
44. Jeras M: The role of in vitro alloreactive T-cell functional tests in the selection of HLA matched and mismatched haematopoietic stem cell donors. *Transplant Immunology* 2002, 205-214
45. Yu Y, Arora A, Min W, Roifman CM, Grunebaum E: EdU incorporation is an alternative non-radioactive assay to 3H-thymidine uptake for in vitro measurement of mice T cell proliferation. *Journal of Immunological methods* 2009
46. Švajger U, Jeras M: Celična terapija z regulatornimi limfociti T – celice kot zdravila. *Farmacevtski vestnik* 2009, 60:143-149
47. Chao D, Bahl P, Houlbrook S, Hoy L, Harris AL, Austyn JM: Human cultured dendritic cells show differential sensitivity to chemotheraphy agents as assessed by the MTS assay. *British Journal of Cancer*, 1999, 81:1280-1284 27.
48. Riss T, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell viability assays. In: *Assay Guidance Manual*, e-Book. Editor in chief: Sittampalam GS; dostopano: 3.9.2018 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK51396/>

49. <https://www.biotek.com/resources/application-notes/an-absorbance-based-cytotoxicity-assay-using-high-absorptivity-water-soluble-tetrazolium-salts-cell-quantitation-using-wst-8-and-the-synergy-mx/> dostopano: 3.9.2018
50. Li X, Bai J, Ji X, Li R, Xuan Y, Wang Y: Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regard of their immune properties, proliferation and differentiation. International journal of molecular medicine 2014; 34: 695-704