

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

MEHANIZMI INTERAKCIJA MEZENHIMALNIH  
MATIČNIH ĆELIJA I MAKROFAGA U  
REGULACIJI STRES ERITROCITOPOEZE

doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

MECHANISMS OF INTERACTION BETWEEN  
MESENCHYMAL STEM CELLS AND  
MACROPHAGES IN THE REGULATION OF  
STRESS ERYTHROPOIESIS

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

**Mentor:**

Prof. dr Andrija Bogdanović, redovni profesor Medicinskog fakulteta

Univerziteta u Beogradu

**Komentor:**

Dr sc.med. Sanja Vignjević Petrinović, naučni saradnik Instituta za medicinska istraživanja

Univerziteta u Beogradu

**Članovi komisije:**

Prof. dr Marija Plješa Ercegovac, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Doc. dr. sc.med. Danijela Leković, docent Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Prof. dr Marija Vukelić-Nikolić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Nišu

*Ovim putem htela bih da se zavalim svom šefu i komentoru dr Sanji Vignjević Petrinović na ukazanom poverenju, strpljenju, kontinuiranoj pomoći, konstruktivnim razgovorima i dobronamernim sugestijama tokom izrade ove doktorske disertacije.*

*Veliko hvala mom mentoru Prof. dr Andriji Bogdanoviću na korisnim sugestijama, razumevanju i pruženom zadovoljstvu da sarađujem sa njim.*

*Dr Maji Milošević zahvaljujem na nesebičnoj pomoći, korisnim stručnim savetima i sugestijama koji su značajno doprineli ovom istraživanju.*

*Zahvaljujem dr Huanu Santibanjezu što nam je poklonio ćelijsku liniju makrofaga za istraživanja sprovedena u okviru ove disertacije.*

*Dr Dragani Marković, dr Slavku Mojsiloviću, Dr Ivani Drvenici, dr Urošu Gašiću zahvaljujem na praktičnoj pomoći u izradi ove disertacije. Takođe, zahvaljujem Snežani Marković na nezamenljivoj tehničkoj pomoći i podršci.*

*Hvala kolegama iz Instituta za medicinska istraživanja: dr Ivani Okić, dr Oliveri Mitrović Ajtić, dr Drenki Trivanović, dr Dragoslavi Đikić, dr Tijani Subotički, dr Milošu Dikliću, dr Milici Vukotić, dr Teodori Dragojević i Emiliji Živković na savetima, druženju i podršci.*

*Posebnu zahvalnost dugujem dr Sunčici Kapor, mojoj prijateljici i kumi, na podršci, savetima, razumevanju i korisnim sugestijama tokom izrade ove disertacije.*

*Najveću zahvalnost dugujem svom suprugu, deci, roditeljima i sestrama na puno ostavljenog prostora za rad, na razumevanju, pružanju podrške i ljubavi.*

*Zahvaljujem koautorima radova koji su proizašli kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske teze jer su učestvovali u:*

- 1. Kreiranju koncepta teze: dr Sanja Vignjević Petrinović, prof. dr Andrija Bogdanović*
- 2. Istraživanju: dr Sanja Vignjević Petrinović, dr Maja Milošević*
- 3. Metodologiji: dr Dragana Marković, dr Slavko Mojsilović, dr Dušica Kočović*
- 4. Superviziji: prof. dr Andrija Bogdanović*
- 5. Pisanju – originalni nacrt: dr Sanja Vignjević Petrinović*
- 6. Pisanju- recenzija i uređivanje: dr Sanja Vignjević Petrinović, dr Maja Milošević, dr Dragana Marković*

## MEHANIZMI INTERAKCIJA MEZENHIMALNIH MATIČNIH ĆELIJA I MAKROFAGA U REGULACIJI STRES ERITROCITOPOEZE

### SAŽETAK

U uslovima narušene homeostaze, poput krvarenja, stresa, inflamacije i drugog, dolazi do smanjene oksigenacije tkiva što za posledicu ima aktivaciju različitih mehanizama u cilju održavanja adekvatnog snabdevanja tkiva kiseonikom. Povećane potrebe organizma za eritrocitima u navedenim uslovima dovode do aktivacije stres eritrocitopoeze (SE). Tokom procesa SE dolazi do migracije eritroidnih progenitora iz koštane srži u slezinu gde pod uticajem signalnog molekula koštanog morfogenetskog proteina (engl. bone morphogenetic protein 4, BMP4) ove ćelije poprimaju karakteristike specifičnih stres eritroidnih progenitora i dolazi do njihove nagle ekspanzije. U koštanoj srži i slezini eritrocitopoeza se odvija unutar specijalizovanih eritroblastnih ostrva u kojima centralno mesto zauzimaju makrofagi koji imaju ključnu ulogu u formiranju zrelih eritrocita. U uslovima povećanih potreba za eritrocitima monociti se pod uticajem hemokina, izlučenih iz crvene pulpe slezine, iz koštane srži regrutuju u slezinu gde se diferenciraju u makrofage eritroblastne niše. Pored makrofaga, značajnu komponentu hematopoezne mikrosredine čine mezenhimalne matične ćelije (engl. mesenhal stem cells, MSC) koje proizvode brojne citokine uključene u imunomodulaciju, proliferaciju, diferencijaciju i migraciju hematopoeznih ćelija. U zavisnosti od mikrosredine MSC i makrofagi ostvaruju interakcije posredstvom različitih signalnih molekula. Međutim, uloga makrofaga i mehanizmi njihovih interakcija sa MSC u okviru tkivno-specifične mikrosredine tokom SE do sada nisu razjašnjeni. Cilj ove studije bio je da se ispita uloga makrofaga i njihovih tkivno-specifičnih interakcija sa MSC u regulaciji procesa SE, s posebnim osvrtom na učešće azot-monoksida (engl. nitric oxide, NO), vanćelijskih nukleotida i purinergičkog signalnog sistema u ispitivanim interakcijama. U tu svrhu korišćeni su miševi, mužjaci Balb/c soja, kao i mono i ko-kulture RAW264.7 ćelija i MSC izolovanih iz koštane srži i slezine miša. Miševi su bili podvrgnuti hroničnom psihološkom stresu 7 dana uzastopno u trajanju od 2h. Deplecija makrofaga je vršena intraperitonealnom aplikacijom lipozoma koji sadrže klodronat dva dana pre početka eksperimenta radi uklanjanja rezidentnih makrofaga, a zatim svaki treći dan tokom eksperimenta, u cilju uklanjanja novostvorenih makrofaga. Ćelijske mono- i ko-kulture su tretirane eritropoetinom (EPO), kortikosteronom, blokatorom azot-monoksida sintetaze (engl. nitric oxide synthases, NOS) i/ili blokatorom enzimske aktivnosti molekula CD73. Deplecija makrofaga u koštanoj srži i slezini tretiranih životinja potvrđena je analizom proteina F4/80, primenom *Western blota*. Za detekciju progenitorskih ćelija eritrocitne loze hematopoezne ćelije su kultivisane na podlozi od metilceluloze obogaćenoj odgovarajućim citokinima. Metodama protočne citofluorometrije izvršena je detekcija i kvantifikacija eritroblasta u ispitivanim uzorcima koštane srži i slezine. Specifična aktivnost enzima određena je kolorimetrijski (detekcijom neorganskog fosfata kao proizvod enzimske reakcije). Grisova reakcija je korišćena za određivanje ukupnih nitrata i nitrita (NO<sub>x</sub>), a koncentracija vanćelijskog adenozin-trifosfata (ATP) je određena luminometrijski, primenom komercijalnog kita. Koncentracija adenozina je određena primenom tečne hromatografije visoke performanse i masene spektrometrije (engl. ultra high-performance liquid chromatography-Mass spectrometry, *UHPLC-DAD MS/MS*). Relativna ekspresija ispitivanih gena je određena metodom *Real-Time* PCR. Rezultati su pokazali da je hronični psihološki stres smanjio broj eritrocita i nivo hemoglobina u krvi, a deplecija makrofaga je značajno pogoršala anemiju kod stresiranih životinja. Hronični psihološki stres je doveo do znatnog povećanja broja CFU-E i BFU-E ćelija u koštanoj srži i slezini, a deplecija makrofaga je suprimirala ovaj efekat stresa. Deplecija makrofaga u koštanoj srži je prevenirala efekat stresa na CD71<sup>+</sup>/Ter119<sup>+</sup>, CD71<sup>-</sup>/Ter119<sup>+</sup> u koštanoj srži i na CD71<sup>+</sup>/Ter119<sup>+</sup> u slezini. Takođe, u uslovima stresa, deplecija makrofaga je sprečila stresom-izazvano povećanje broja eritroidnih prekursora u okviru E1 i E2 subpopulacije u koštanoj srži, kao i povećanje broja E1, E2 i E3 ćelija u slezini. Odsustvo

makrofaga nije značajno uticalo na stresom-indukovano povećanje ekspresije BMP4, MCP-1 i TLX1 u slezini. Ekspresija markera za karakterizaciju MSC (fibronektin, vimentin, CD29, CD105 i  $\alpha$ -SMA) u koštanoj srži je značajno povećana kod životinja koje su bile tretirane klodronat-lipozomom i bile izložene *restraint* stresu u odnosu na kontrolne životinje i životinje koje su bile izložene samo *restraint* stresu. Slezine životinja koje su primile klodronat-lipozom i bile izložene stresu imaju povećanu ekspresiju iRNK za vimentin,  $\alpha$ -SMA i CD105 u odnosu na miševe koji su bili izloženi samo *restraint* stresu i kontrolne životinje, dok je ekspresija iRNK za fibronektin povećana samo u odnosu na ekspresiju ovih gena u slezini kontrolnih životinja. Hronični psihološki stres je doveo do smanjene sposobnosti adipogene i osteogene diferencijacije MSC iz koštane srži, a deplecija makrofaga nije uticala na adipogenu diferencijaciju ovih ćelija tokom stresa, dok je sprečila stresom-indukovano smanjenje osteogenog potencijala MSC. Hronični psihološki stres je značajno povećao klonogeni potencijal MSC iz koštane srži i slezine, a deplecija makrofaga je suprimirala ovaj efekat stresa samo na MSC iz koštane srži. Hronični psihološki stres je uzrokovao smanjenu produkciju NOx u koštanoj srži. Tretman klodronat-lipozomima je dodatno umanjio stresom-izazvano smanjenje proizvodnje NOx u koštanoj srži. U slezini ni *restraint* stres ni deplecija makrofaga nisu značajno uticali na proizvodnju NOx. Ponavljano izlaganje *restraint* stresu je povećalo nivoe vanćelijskog ATP-a u koštanoj srži i slezini. Deplecija makrofaga je značajno smanjila stresom-izazvano povećanje ATP-a u koštanoj srži i slezini. Tretman klodronat-lipozomima je sprečio stresom-izazvanu ushodnu regulaciju ekspresije P2X7R receptora u koštanoj srži i slezini. Hronični psihološki stres je povećao aktivnost i ekspresiju enzima CD39 u koštanoj srži i slezini, dok je deplecija makrofaga poništila ove efekte stresa. Izlaganje psihološkom stresu nije uticalo na aktivnost i ekspresiju CD73 enzima, a deplecija makrofaga je povećala specifičnu aktivnost CD73 tokom stresa u koštanoj srži i slezini. Hronični stres je povećao ekspresiju gena za receptore ADORA2A i ADORA2B, a deplecija makrofaga je prevenirala stresom-izazvanu ushodnu regulaciju gena za receptor ADORA2A. Tretman kortikosteroidima i EPO je značajno povećao proizvodnju ATP-a u ko-kulturama MSC iz koštane srži i RAW264.7 ćelija, dok je blokada NOS-a poništila efekat stresa na produkciju ATP-a i dovela je do povećane ekspresije gena za CD73. U ko-kulturi MSC iz slezine sa RAW264.7 ćelijama medijatori SE su uz blokadu NOS-a doveli do povećanog oslobađanja ATP-a. Tretman medijatorima SE izazvao je smanjenu koncentraciju adenoizina u ko-kulturi MSC koštane srži/slezine i RAW264.7 ćelija, a blokada NOS-a nije uticala na ovo smanjenje. Inhibicija enzimske aktivnosti CD73 u ko-kulturama tretiranim kortikosteronom i EPO je dodatno redukovala smanjenu proizvodnju NOx i značajno je uticala na ekspresiju NOS enzima. Gledano u celini, rezultati ove doktorske disertacije su pokazali ključnu ulogu makrofaga i značajan doprinos njegovih interakcija sa MSC u regulaciji procesa SE. Takođe, pokazano je da su u uslovima SE interakcije između MSC i makrofaga tkivno-specifične i da su posredovane signalima purinergičkog signalnog sistema i NO. Dobijeni rezultati doprinose razumevanju i pružanju temelja za dalja istraživanja kompleksnih mehanizama koji regulišu eritrocitopoezu u uslovima stresa, a mogu doprineti i razvoju novih i potencijalno efikasnijih modaliteta lečenja anemije.

**Ključne reči:** stres eritrocitopoeza, makrofagi, mezenhimalne stromalne ćelije, azot monoksid, purinergički signalni sistem

**Naučna oblast:** Medicina

**Uža naučna oblast:** Molekularna medicina

UDK broj: \_\_\_\_\_

## MECHANISMS OF INTERACTION BETWEEN MESENCHYMAL STEM CELLS AND MACROPHAGES IN THE REGULATION OF STRESS ERYTHROPOIESIS

### ABSTRACT

In conditions of disturbed homeostasis, such as bleeding, stress, inflammation, etc., tissue hypoxia occurs, leading to the activation of various mechanisms to maintain adequate oxygen supply. Increased demand for erythrocytes in these conditions results in the activation of stress erythropoiesis (SE). During the SE process, erythroid progenitors migrate from the bone marrow to the spleen, where these cells affected with bone morphogenetic protein 4 (BMP4) gain characteristics specific to stress erythroid progenitors and extend rapidly. In the bone marrow and spleen, erythropoiesis takes place within specialized erythroblastic islands, with macrophages playing a crucial role in the formation of mature erythrocytes. In conditions of increased erythrocyte demand, monocytes are recruited to the spleen under the influence of chemokines released from the red pulp, where they differentiate into macrophages within the erythroblastic niche. Besides macrophages, a significant component of the hematopoietic microenvironment is composed of mesenchymal stem cells (MSC), which produce numerous cytokines involved in immunomodulation, proliferation, differentiation, and migration of hematopoietic cells. Depending on the microenvironment, MSCs and macrophages establish interactions through various signaling molecules. However, the role of macrophages and the mechanisms of their interactions with MSCs within the tissue-specific microenvironment during SE have not been clarified yet. The aim of this study was to investigate the role of macrophages and their tissue-specific interactions with MSCs in the regulation of stress erythropoiesis, with a particular focus on the involvement of nitric oxide (NO), extracellular nucleotides, and the purinergic signaling system in the examined interactions. For this purpose, male Balb/c mice were used, as well as mono- and co-cultures of RAW264.7 cells and MSC isolated from the bone marrow and spleen of mice. The mice were subjected to chronic psychological stress for 7 consecutive days, 2 hours per day. Macrophage depletion was performed by intraperitoneal administration of liposomes containing clodronate two days before the start of the experiment to remove resident macrophages, followed by administration every third day of the experiment to eliminate newly formed macrophages. Cell mono- and co-cultures were treated with erythropoietin (EPO), corticosterone, a nitric oxide synthase (NOS) inhibitor, and/or a CD73 inhibitor. Macrophage depletion in the bone marrow and spleen of treated animals was confirmed by analyzing the F4/80 protein using Western blotting. To detect erythroid progenitor cells, hematopoietic cells from the erythroid lineage were cultured on methylcellulose-enriched substrates with appropriate cytokines. Flow cytometry methods were used for the detection and quantification of erythroblasts in the examined samples of bone marrow and spleen. Enzyme-specific activity was determined colorimetrically by detecting inorganic phosphate as the product of the enzymatic reaction. Gris reaction was used to determine total nitrates and nitrites (NOx), while the concentration of extracellular adenosine triphosphate (ATP) was determined luminometrically using a commercial kit. Adenosine concentration was determined using high-performance liquid chromatography and Mass spectrometry (*UHPLC-DAD MS/MS*). Relative expression of the examined genes was determined by Real-Time PCR. The results showed that chronic psychological stress reduced the number of red blood cells and hemoglobin levels in the blood, and macrophage depletion significantly altered anemia in stressed animals. Chronic psychological stress led to a significant increase in the number of colony-forming units-erythroid (CFU-E) and burst-forming units-erythroid (BFU-E) cells in the bone marrow and spleen, and macrophage depletion suppressed this stress effect. Macrophage depletion in the bone marrow prevented the stress effect on CD71<sup>+</sup>/Ter119<sup>+</sup> and CD71<sup>+</sup>/Ter119<sup>+</sup> populations in the bone marrow and spleen, respectively. Also, under stress conditions, macrophage depletion prevented stress-induced increases in the number of immature erythroid precursors within the E1 and E2 subpopulations in the bone marrow,



as well as the increased number of E1, E2, and E3 cells in the spleen. The absence of macrophages did not significantly affect the stress-induced increase in BMP4, MCP-1, and TLX1 expression in the spleen. The expression of markers for characterizing MSCs (fibronectin, vimentin, CD29, CD105, and  $\alpha$ -SMA) in the bone marrow significantly increased in animals treated with clodronate liposomes and exposed to restraint stress compared to control animals and those exposed only to restraint stress. Spleens of animals receiving clodronate liposomes and exposed to stress showed increased expression of mRNA for vimentin,  $\alpha$ -SMA and CD105, compared to mice exposed only to restraint stress and control animals, while mRNA expression for fibronectin increased only compared to the expression of these genes in the spleen of control animals. Chronic psychological stress led to a decreased ability of adipogenic and osteogenic differentiation of MSCs from the bone marrow, and macrophage depletion did not affect adipogenic differentiation of these cells during stress, while it prevented stress-induced reduction in the osteogenic potential of MSCs. Chronic psychological stress significantly increased the clonogenic potential of MSCs from the bone marrow and spleen, and macrophage depletion suppressed this stress effect only on MSCs from the bone marrow. Chronic psychological stress caused a reduced production of NOx in the bone marrow. Treatment with clodronate liposomes further reduced stress-induced NOx production in the bone marrow. In the spleen, neither restraint stress nor macrophage depletion significantly affected NOx production. Repeated exposure to restraint stress increased extracellular ATP levels in the bone marrow and spleen. Macrophage depletion significantly reduced stress-induced increases in ATP levels in the bone marrow and spleen. Treatment with clodronate liposomes prevented stress-induced upregulation of P2X7R receptor expression in the bone marrow and spleen. Chronic psychological stress increased the activity and expression of CD39 enzyme in the bone marrow and spleen, while macrophage depletion nullified these stress effects. Repeated exposure to psychological stress did not affect the activity and expression of the CD73 enzyme, and macrophage depletion increased the specific activity of CD73 during stress in the bone marrow and spleen. Chronic stress increased the expression of genes for ADORA2A and ADORA2B receptors, and macrophage depletion prevented stress-induced upregulation of the gene for the ADORA2A receptor. Treatment with corticosteroids and EPO significantly increased ATP production in co-cultures of MSCs from the bone marrow and RAW264.7 cells, while NOS blockade nullified the stress effect on ATP production and led to increased expression of the CD73 gene. In co-culture of MSCs from the spleen with RAW264.7 cells, SE mediators, along with NOS blockade, led to increased ATP release. Inhibition of CD73 enzymatic activity in co-cultures treated with corticosterone and EPO further reduced reduced NOx production and significantly affected NOS enzyme expression. Treatment with SE mediators caused a decreased concentration of adenosine in co-culture of bone marrow/spleen MSCs and RAW264.7 cells, and NOS blockade did not affect this decrease. Overall, the results of this doctoral dissertation demonstrated the key role of macrophages and their significant contribution to their interactions with MSC in the regulation of SE processes. Additionally, it was shown that under SE conditions, interactions between MSCs and macrophages are tissue-specific and mediated by signals from the purinergic signaling system and nitric oxide. The obtained results contribute to the understanding and provide the basis for further research into the complex mechanisms regulating erythropoiesis in stress conditions and may contribute to the development of new and potentially more effective modalities for the treatment of anemia.

Keywords: stress erythropoiesis, macrophages, mesenchymal stem cells, nitric oxide, purinergic signaling system

**Scientific field:** Medicine

**Subfield:** Molecular medicine

UDC number: \_\_\_\_\_

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. ERITROCITOPOEZA</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Regulacija eritrocitopoeze u bazalnim uslovima .....	2
1.1.2. Stres eritrocitopoeza .....	4
<b>1.2. MAKROFAGI</b> .....	<b>6</b>
1.2.1. Polarizacija makrofaga .....	7
1.2.2. Uloga makrofaga tokom eritrocitopoeze .....	8
1.2.3. Uloga makrofaga u SE.....	9
<b>1.3. MEZENHIMALNE MATIČNE ĆELIJE</b> .....	<b>10</b>
1.3.1. Mezenhimalne matične ćelije i hematopoeza .....	10
1.3.2. Međućelijske interakcije makrofaga i MSC.....	12
<b>1.4. AZOT-MONOKSID</b> .....	<b>14</b>
1.4.1. Azot-monoksid i eritrocitopoeza.....	15
1.4.2. Azot-monoksid i makrofagi .....	16
1.4.3. Azot-monoksid i MSC .....	16
<b>1.5. PURINERGIČKA SIGNALIZACIJA I VANĆELIJSKI NUKLEOTIDI</b> .....	<b>16</b>
1.5.1. Purinergička signalizacija i eritrocitopoeza .....	18
1.5.2. Purinergička signalizacija i makrofagi .....	19
1.5.3. Purinergička signalizacija i MSC.....	20
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b> .....	<b>21</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1. MATERIJAL</b> .....	<b>22</b>
3.1.1. Eksperimentalne životinje.....	22
3.1.2. Ćelijske linije .....	22
3.1.3. Medijumi .....	22
<b>3.2 EKSPERIMENTALNI DIZAJN</b> .....	<b>23</b>
3.2.1. In vivo .....	23
3.2.2. In vitro .....	24
<b>3.3.METODE</b> .....	<b>24</b>
3.3.1.Hematološki parametri .....	24
3.3.2. Ćelije i ćelijske kulture.....	25
3.3.3. Protočna citometrija .....	27
3.3.4. Određivanje koncentracije NO.....	27
3.3.5. Određivanje vanćelijskog ATP-a .....	28
3.3.6. Određivanje aktivnosti CD39 i CD73 enzima .....	28
3.3.7. Određivanje adenoizina .....	28
3.3.8. Western blot analiza .....	29
3.3.9. Analiza ekspresije gena .....	30

3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	33
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>34</b>
4.1. UTICAJ DEPLECIJE MAKROFAGA NA STRES ERITROCITOPEZU .....	34
4.1.1. Uticaj deplecije makrofaga na ekspresije F4/80 protena u koštanoj srži i slezini .....	34
4.1.2. Uticaj deplecije makrofaga na hematološke paramete tokom SE.....	34
4.1.3. Uticaj deplecije makrofaga na BFU-E i CFU-E kolonije tokom SE .....	35
4.1.4. Uticaj deplecije makrofaga na Ter119 pozitivne ćelije u koštanoj srži i slezini miša tokom SE .....	36
4.1.5. Uticaj deplecije makrofaga na različite subpopulacije Ter119 pozitivnih ćelija u koštanoj srži i slezini miša tokom SE.....	38
4.1.6. Uticaj deplecije makrofaga na ekspresiju BMP4 molekula tokom SE.....	41
4.1.7. Uticaj hroničnog psihološkog stresa i deplecije makrofaga na ekspresiju MCP-1 molekula u slezini.....	42
4.1.8. Uticaj hroničnog psihološkog stresa i deplecije makrofaga na ekspresiju TLX1 molekula u slezini.....	42
4.2. ISPITIVANJE UTICAJA DEPLECIJE MAKROFAGA NA KARAKTERISTIKE I POTENCIJAL DIFERENCIJACIJE MSC IZOLOVANIH IZ KOŠTANE SRŽI I SLEZINE HRONIČNO STRESIRANIH MIŠEVA .....	43
4.2.1. Izolacija MSC.....	43
4.2.2. Karakterizacija MSC .....	43
4.2.3. Diferencijacija MSC .....	44
4.2.4. Uticaj deplecije makrofaga na karakterizaciju MSC tokom hroničnog stresa.....	45
4.2.5. Uticaj makrofaga na potencijal diferencijacije MSC tokom hroničnog stresa.....	48
4.2.6. Uticaj makrofaga na klonogeni potencijal MSC tokom hroničnog stresa.....	50
4.3. ULOGA MAKROFAGA U REGULACIJI NO I ATP-a TOKOM SE .....	51
4.3.1. Uticaj deplecije makrofaga na produkciju nitrata i nitrita tokom SE.....	51
4.3.2. Uticaj deplecije makrofaga na ekspresiju NOS enzima u ćelijama koštane srži .....	52
4.3.3. Uticaj deplecije makrofaga na produkciju ATP i ekspresiju P2X7R tokom SE u koštanoj srži i slezini .....	52
4.3.5. Uticaj deplecije makrofaga na aktivnost i ekspresiju CD73 enzima tokom SE u koštanoj srži i slezini .....	54
4.3.6. Uticaj deplecije makrofaga na ekspresiju ADORA2A i ADORA2B receptora tokom SE u koštanoj srži .....	55
4.4. ISPITIVANJE ULOGE NO, VANĆELIJSKIH NUKLEOTIDA I PURINERGIČNOG SIGNALNOG SISTEMA U INTERAKCIJAMA MAKROFAGA SA MSC IZOLOVANIM IZ KOŠTANE SRŽI I SLEZINE MIŠA .....	56
4.4.1. Uticaj blokade NOS-a na produkciju ATP-a i adenzina .....	56
4.4.2. Uticaj blokade NOS-a na ekspresiju P2X7R, ADORA2B, CD39 i CD73 .....	58
4.4.3. Uticaj blokade CD73 enzima na produkciju nitrata i nitrita .....	58
4.4.4. Uticaj blokade CD73 enzima na ekspresiju NOS-a .....	59
5. DISKUSIJA .....	61
6. ZAKLJUČCI.....	70



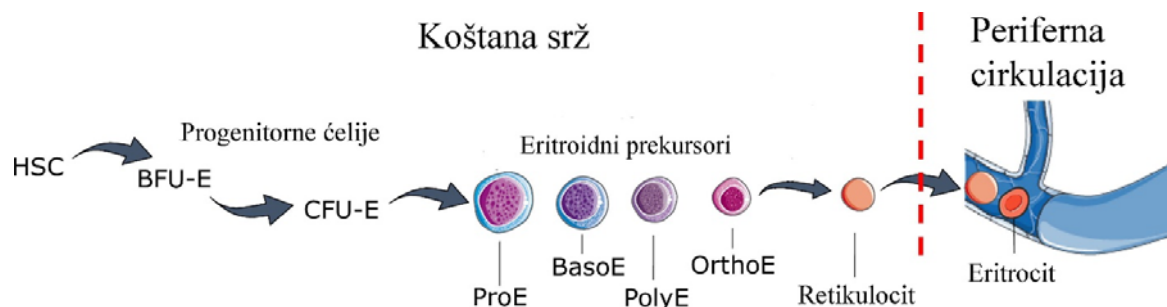
# 1. UVOD

## 1.1. ERITROCITOPOEZA

Eritrocitopoeza je kontinuiran proces prilikom koga nastaju crvena krvna zrnca (eritrociti). Zahvaljujući eritrocitopoezi omogućeno je stalno snabdevanje tkiva i organa kiseonikom. Ovaj proces je deo šireg hematopoetskog procesa prilikom kojeg nastaju sve ćelijske komponente krvi i odvija se, kako tokom adultnog perioda, tako i tokom embrionalnog razvoja. Hematopoeza kod kičmenjaka se odvija u dva talasa: primitivni i definitivni (*Galloway i Zon, 2003*).

Primitivni talas podrazumeva formiranje eritroidnih progenitora, eritrocita i makrofaga, pri čemu je njegova glavna uloga da omogući adekvatnu oksigenaciju tkiva tokom embrionalnog perioda (*Palis i Yoder, 2001*). Kod sisara se ove eritroidne progenitorne ćelije prvo pojavljuju u ekstra-embrionalnoj žumančanoj kesi u ranom razvoju (*Paik i Zon, 2010*). Definitivna hematopoeza, za razliku od primitivne hematopoeze, javlja se u kasnijem razvoju, u različitim vremenskim tačkama, kod različitih vrsta. U većini organizama postoji prolazni talas definitivne hematopoeze u okviru kojeg nastaju tzv. eritroidno-mijeloidni progenitori (engl. erythro-myeloid progenitors, EMP) (*McGrath i sar., 2011*). Definitivna hematopoeza kasnije uključuje matične ćelije hematopoeze (engl. hematopoietic stem cells, HSC), koje su multipotentne i mogu dovesti do stvaranja ćelija svih krvnih loza kod odraslog organizma. Kod kičmenjaka se definitivne HSC pojavljuju u regionu aortno-gonadnog mezonefrosa (AGM) embriona u razvoju. One migriraju u fetalnu jetru, a zatim u koštanu srž, koja je mesto produkcije HSC kod odraslih (*Cumano i Godin, 2007*). Asimetričnom deobom HSC nastaju opredeljene matične ćelije koje se dalje diferenciraju u zrele ćelije određene loze.

Kod ljudi u adultnom periodu eritrocitopoeza se uglavnom odvija u koštanoj srži, dok kod miša, pored koštane srži, slezina ima veliku ulogu tokom ovog procesa. Diferencijacijom HSC najpre nastaju zajednički mijeloidni progenitori (engl. common myeloid progenitors, CMP), megakariocitni/eritroidni progenitori, a zatim i prve prepoznatljive forme eritroidnih progenitora, tzv. BFU-E ćelije (engl. burst-forming unit- erythroid). BFU-E progenitori su krupne ćelije koje poseduju veliki proliferativni kapacitet i diferenciraju se u CFU-E (engl. colony forming unit-erythroid). CFU-E ćelije imaju manju mitotsku aktivnost i poseduju dosta krupnije jedro. Daljom deobom i diferencijacijom dolazi do stvaranja niza morfološki različitih prethodnika eritrocita. Najpre nastaju proeritroblasti (ProE) koji predstavljaju najveće ćelije eritroidne loze. Proeritroblasti imaju veliko jedro i 1-5 jedaraca okruženih izrazito bazofilnom citoplazmom. Deobom proeritroblasta nastaju bazofilni eritroblasti. Ove ćelije su manje, sadrže veliki broj slobodnih ribozoma, a jedro često nije vidljivo. Od bazofilnih eritroblasta nastaju polihromatofilni eritroblasti. Ove ćelije su još manje, smanjuje se i jedro, a u citoplazmi, koja je predominantno bazofilna, mogu se uočiti i acidofilna polja. Daljom deobom polihromatofilnih eritroblasta nastaju acidofilni eritroblasti. Acidofilni eritroblasti se više ne dele, već podležu samo procesu sazrevanja, pri čemu je njihovo jedro jako malo, a veći deo zauzima citoplazma koja sadrži dosta hemoglobina. Nakon izbacivanja jedra od strane acidofilnih eritroblasta nastaju retikulociti. Retikulociti napuštaju koštanu srž preko sinusoida i ulaze u krvotok. U ovim ćelijama se još neko vreme vrši sinteza hemoglobina. Retikulociti u perifernoj krvi sazrevaju u zrele eritrocite u roku od 24-48 sata (*Antić S i sar., 2009; Momčilović i sar., 2024*) (**Slika 1.1**).



**Slika 1.1.** Definitivna eritrocitopoeza: od progenitora, eritroidnih prekursora do eritrocita. Modifikovano prema: Ginzburg i sar. *Elife* 2023;12:e90189

Tokom sazrevanja eritrocita, pored izraženih morfoloških promena, uključujući smanjenje ćelije, povećanje hemoglobinizacije, povećanu kondenzaciju hromatina i enukleaciju, dolazi i do dramatičnih promena u ekspresiji, kao i sastavu membranskih proteina (Chang i sar., 1976; Blikstad i sar., 1983). Ekspresija c-kit (CD117)–receptora, za koji se vezuje faktor rasta matičnih ćelija (engl. stem cell factor, SCF), pre svega je izražena na pluripotentnim matičnim ćelijama i prisutna je sve do stadijuma bazofilnog eritroblasta. Za razliku od c-kit receptora, ekspresija transferinskog receptora (CD71) se postepeno povećava od proeritroblasta do bazofilnih eritroblasta, a zatim se postepeno smanjuje. Ekspresija membranskog antigena Ter119 se kontinuirano povećava počev od proeritroblasta pa sve do zrelog eritrocita. Zahvaljujući morfološkim promenama i različitoj ekspresiji membranskih proteina tokom procesa sazrevanja eritrocita moguće je pratiti razvojne forme ćelija crvene krvne loze (Koulnis i sar., 2011).

### 1.1.1. Regulacija eritrocitopoeze u bazalnim uslovima

Životni vek eritrocita iznosi 120 dana, a odrastao čovek dnevno proizvede  $200 \times 10^9$  eritrocita (Palis, 2014). U zavisnosti od potražnje njihova proizvodnja se može prilagoditi i značajno povećati. Sposobnost prilagođavanja proizvodnje eritrocita, u zavisnosti od potrebe organizma, kontrolisana je složenom koordinacijom velikog broja faktora (Hattangadi i sar., 2011).

GATA1 je označen kao glavni transkripcioni faktor koji reguliše diferencijaciju i proliferaciju eritroidnih progenitora. On pokreće eritrocitopoezu regulacijom transkripcije nekoliko gena povezanih sa diferencijacijom eritroidnih ćelija, potom anti-apoptičnih gena iz porodice BH3, gene uključene u regulaciju ćelijskog ciklusa, a ujedno je i glavni regulator ekspresije mRNA za eritropoetinski receptor (EpoR) u ovim ćelijama (Valent i sar., 2018). Za razliku od njega GATA-2 transkripcioni faktor reguliše održavanje i proliferaciju hematopoetskih matičnih i progenitornih ćelija. On je visoko ekspimiran u HSC i CMP, a njegova se ekspresija postepeno smanjuje ka eritroidnim progenitorima (Moriguchi i sar., 2014).

*Krüppel-like factor 1* (KLF1) je još jedan transkripcioni faktor koji učestvuje u regulaciji, kako embrionalne eritrocitopoeze, tako i eritrocitopoeze u adultnom periodu. KLF1 se vezuje u neposrednoj blizini GATA-1 i SCF što sugeruje da ovi proteini zajedno učestvuju u programu transkripcije. Ekspresija i aktivnost KLF1 je strogo regulisana tokom diferencijacije (Yien i Bieker, 2013). KLF1 je protein kojeg ima u izobilju u eritroidnim ćelijama i sadrži tri C2H2 cinkova prsta na svom C-kraju. Njegova primarna uloga u eritrocitopoezi je aktivacija transkripcije gena koji inhibiraju diferencijaciju megakariocita, a promovišu ranu diferencijaciju eritrocita (Kim i sar., 2020). KLF1 igra važnu ulogu u završnim fazama ćelijskog ciklusa i kondenzacije hromatina, koji stimulišu proizvodnju eritrocita. U nedostatku KLF1, denukleacija eritrocita je poremećena, a

proliferacija eritroblasta je povećana. Iako je KLF1 pretežno aktivator transkripcije, on takođe može delovati i kao transkripcioni inhibitor (*Caulier i Sankaran, 2022*).

Neophodnost prisustva SCF i interleukina (IL)-3 za rast BFU-E ćelija *in vitro* ukazuje na značaj ovih molekula za preživljavanje nezrelih ćelija eritroidne loze. SCF se vezuje za svoj receptor c-kit, tirozin kinazu koja aktivira nekoliko signalnih molekula uključujući fosfatidilinozitol 3 kinazu-(PI-3 kinazu), Src kinaze i fosfolipaze C i D  $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ). Eritropoetin (EPO) i SCF deluju sinergistički kako bi povećali proizvodnju eritrocita putem nekoliko molekularnih mehanizama. SCF povećava osetljivost ćelija na EPO, pa je samim tim zahtev za EPO manji prilikom proliferacije, dok istovremeno SCF usporava diferencijaciju eritroidnih progenitora, što može dovesti do ekspanzije ovih ćelija (*Bunn, 2013; Wu i sar., 1995*).

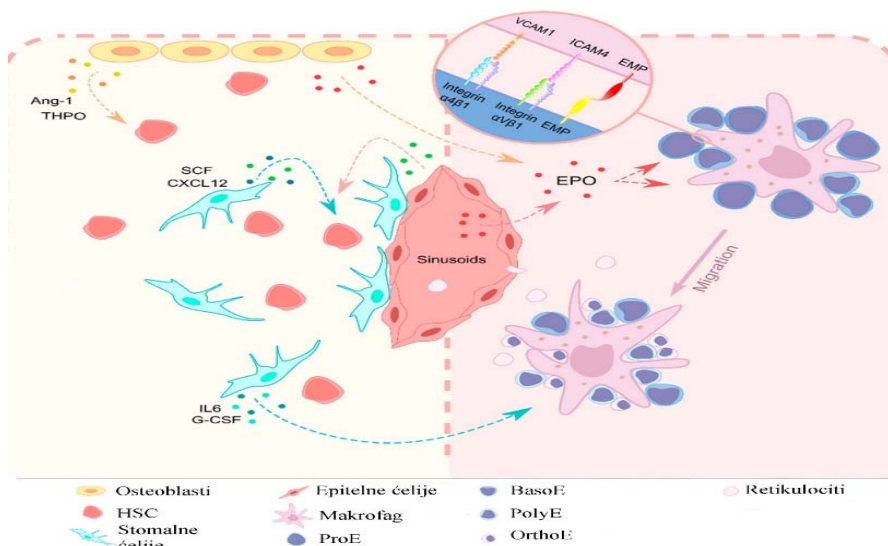
EPO se sintetiše u peritubularnim ćelijama bubrega, pri čemu njegova proizvodnja zavisi od koncentracije kiseonika u krvi. Osnovni faktor koji reguliše produkciju EPO je faktor transkripcije tzv. hipoksijom indukovani faktor 1  $\alpha$  (engl. Hypoxia-inducible factor 1-alpha, HIF $\alpha$ ), a njegova stabilnost zavisi od enzima prolil-hidroksilaze i koncentracije kiseonika (*Halawi i sar., 2017*). Prisustvo EpoR na nezreljim formama ćelija eritroidne loze, pre svega CFU-E i proeritroblastima u većoj meri, kao i smanjenje broja ovih receptora na nemerljiv nivo kod zrelijih formi (*Broudy i sar., 1991*) eritroidnih ćelija ukazuje na značaj EPO u održavanju proliferacije i sposobnosti diferencijacije eritroidnih progenitora. Vezivanje EPO za EpoR na površini eritroidnih progenitora dovodi do aktivacije višestrukih intracelularnih puteva za transdukciju signala. Jedan od glavnih signalnih puteva posredovan interakcijom EPO/EpoR je aktivacija JAK2, koji zatim fosforiliše i aktivira pretvarač signala i aktivatora transkripcije 5 (engl. signal transducer and activator of transcription 5, STAT5). Drugi nishodni putevi aktivacije uključuju protein kinazu aktiviranu mitogenom (MAPK) i PI-3 kinazu. Svi ovi putevi su uključeni u proliferaciju i diferencijaciju eritroidnih progenitora (*Zhang i sar., 2014*). Pored EPO značajnu ulogu tokom eritrocitopeze imaju i brojni hormoni (tiroidni, androgeni, kortikosteroni), vitamin B12 i folna kiselina, gvožđe i regulatori metabolizma gvožđa (*Fisher i Crook, 1962*).

Eritrocitopoeza je regulisana i parakrinim efektom. Naime, zreli eritroblasti inhibiraju preživljavanje i diferencijaciju nezrelih eritroblasta kroz Fas/Fas-L interakcije, pri čemu su Fas ligandi ekspimirani na zrelih eritroidnim ćelijama, a Fas receptori su prisutni na površini nezrelih eritroblasta (povećana ekspresija sa BFU-E na CFU-E ćelije, da bi se dostigao maksimalni nivo na stadijumu proeritroblasta i bazofilnih eritroblasta) (*De Maria i sar., 1999*). Osetljivost na Fas-L povećana je citokinima koji indukuju ćelijski ciklus eritroidnih progenitora, uključujući SCF, IL-3 i trombopoetički faktor rasta (TPO).

Eritrocitopoeza se odvija predominantno unutar mikrokruženja koštane srži. Pored koštane srži odvija se i u fetalnoj jetri i crvenoj pulpi slezine. Unutar mikrosredine, stromalne i imunske ćelije igraju važnu ulogu u regulaciji eritrocitopoeze obezbeđujući faktore koji uključuju integrine i/ili njihove ligande i citokine. Ovi faktori su sposobni da izazovu proliferaciju i preživljavanje ćelija, što omogućava da se odvija program diferencijacije eritroidnih progenitora (*Hanspal, 1997; Kapur i sar., 2001*). Specijalizovane niše u kojima dolazi do razmnožavanja, diferencijacije i enukleacije nazivaju se eritroblastna ostrva (engl. Erythroid Blast Island, EBI) (**Slika 1.2**).

Marsel Besis (1958) je prvi opisao eritroblastna ostrva kao specijalizovane odeljke mikrokoline unutar kojih se eritroblasti sisara razmnožavaju i diferenciraju tokom svoje druge faze sazrevanja. Svako EBI se sastoji od eritroblasta koji okružuju centralno postavljen makrofag. Broj eritroblasta koji okružuju makrofag može da varira. U EBI pacova ih je oko desetak (*Yokoyama i sar., 2002*), dok se kod čoveka ovaj broj kreće od 5 do 30 ćelija (*Lee i sar., 1988*). Postoje dva tipa EBI. Prvi, tzv. nezrela EBI, koja su udaljena od sinusoida, sadrže centralno pozicioniran makrofag koji je sitniji i kupastog oblika, a oko njega se uglavnom nalaze proeritroblasti. Drugi tip, zrela EBI se nalaze blizu sinusoida i sadrže veći makrofag koji je okružen pre svega acidofilnim

eritroblastima. Tokom sazrevanja eritrocita dolazi i do migracije EBI prema sinusoidu (*Yokoyama i sar., 2003*). Interakcije između samih eritroblasta, kao i između centralnih makrofaga i eritroblasta, unutar EBI, su ključne za preživljavanje i sazrevanje eritroblasta.



**Slika 1.2.** Eritroblastno ostrvo u sklopu hematopoezne niše. Modifikovano prema: *Deleschaux i sar. International journal of molecular sciences 2020; 21:5263.*

### 1.1.2. Stres eritrocitopoeza

U uslovima narušene homeostaze, kao što je krvarenje, stres, inflamacija i dr, usled nemogućnosti adekvatnog snabdevanja tkiva kiseonikom, dolazi do aktivacije stres eritrocitopoeze. (SE) (*Paulson i sar., 2011*). Naime, usled nemogućnosti koštane srži da proizvede dovoljan broj eritrocita, proces eritrocitopoeze se odvija i van nje i označava se kao ekstramedularna eritrocitopoeza. Kod čoveka se ovaj proces dešava predominantno u slezini, dok se kod miša, pored slezine, javlja i u jetri.

Ispitivanja ovakvog oblika eritrocitopoeze najviše su rađena na miševima. Pokazano je da tokom SE u slezini nastaju potpuno drugačije progenitorne ćelije koje se označavaju kao „stres“ BFU-E. „Stres“ BFU-E formiraju veće kolonije za kraći vremenski period i za razliku od BFU-E ćelija iz koštane srži, mogu da rastu samo uz prisustvo EPO, što ih čini sličnim fetalnim BFU-E (*Valtieri i sar., 1989*).

„Stres“ BFU nastaju od specijalnih hematopoetskih matičnih ćelija (engl. short-term hematopoietic stem cells, ST-HSC), okarakterisanih kao CD34+Kit+Sca1+Lineage<sup>neg</sup> ćelije, koje tokom SE migriraju iz koštane srži u slezinu (*Harandi i sar., 2010; Xiang i sar., 2015*). U koštanoj srži ove ćelije imaju potencijal da generišu sve ćelijske linije, međutim, po dolasku u slezinu, signali u mikrookruženju slezine usmeravaju ove ćelije ka eritroidnoj lozi. Ključni signali u ovom procesu su *Hedgehog* i koštani morfogenetski protein 4 (engl. bone morphogenetic protein, BMP4) (*Perry i sar., 2009*). *Hedgehog* signalizacija na ST-HSC indukuje ekspresiju BMP4, a zatim ova dva signala sinergistički deluju u stvaranju „stres“ BFU-E (**Slika 1.3**).



Mutacije u signalnom putu *Hedgehog* ne utiču na eritrocitopoezu u bazalnim uslovima. Nasuprot tome, gubitak signalizacije *Hedgehog* sprečava održavanje puta koji zavisi od BMP4 (Perry i sar., 2009).

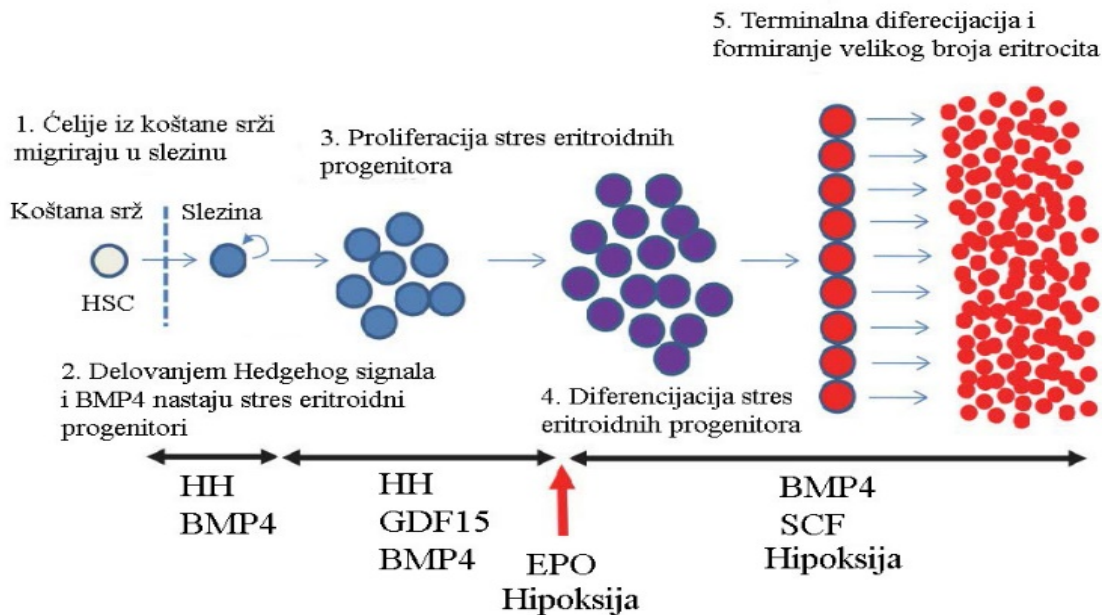
Molekul BMP4 je ključni signal u održavanju SE. Pripada familiji proteina tzv. transformišući faktor rasta beta (engl. transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ), pri čemu svoje dejstvo ispoljava vezivanjem za specifične receptore – receptore za koštane morfogenetske proteine (engl. bone morphogenetic protein receptor, BMPR) tipa I i II. Aktivacija ovih receptora dovodi do aktivacije reaktora majke protiv dekapentaplegijskog homologa 5 (engl. mothers against decapentaplegic homolog 5, Smad5) (Sieber i sar., 2009) koji za posledicu ima ekspanziju “stres” BFU-E ćelija. Značaj ovog molekula pokazan je na tzv. *Flexed-tail* (f/f) miševima koji razvijaju anemiju tokom neonatalnog i fetalnog perioda, a koja se povlači dve nedelje nakon rođenja (Cole i Regan, 1976). Zatim je pokazano da kod ovih miševa izostaje oporavak nakon eksperimentalno indukovane anemije i to usled defekta u ekspanziji BFU-E u slezini (Lenox i sar., 2005). Kod f/f mutiranih miševa zahvaćen je genski lokus koji kodira sintezu proteina Smad5 usled čega izostaje aktivacija signalnog molekula BMP4 (Hegde i sar., 2007).

Deo ST-HSC ostaje na nivou nezrelih eritroidnih stres progenitora (SEP) ne bi li se njihovom proliferacijom obezbedio dovoljan broj progenitora koji mogu adekvatno odgovoriti na uslove povećane potrebe za eritrocitima. Ulogu u ekspanziji ovih ćelija ima faktor diferencijacije rasta 15 (engl. growth differentiation factor-15, GDF15) i Wnt signalni put (Hao i sar., 2019; Perry i sar., 2007). Pored njih, c-kit receptor i njegov ligand SCF takođe učestvuju u ovom procesu. Povećana ekspresija c-kit receptora u slezini miša tokom SE izazvane hroničnim psihološkim stresom uz povećanje broja „stres“ BFU-E ukazuje na značaj ovog receptora u procesu SE (Vignjević, 2014). Mutacija c-kit ili SCF dovodi do makrocitne anemije, što ukazuje na potrebu za ovim signalnim putem, kako u homeostatskim uslovima, tako i u stresom-indukovanoj eritrocitopoezi zavisnoj od signalnog molekula BMP4 (Russell, 1979).

Neadekvatna oksigenacija tkiva dovodi do produkcije HIF1 $\alpha$  koji potom reguliše produkciju EPO u peritubularnim ćelijama bubrega. Na ovaj način hipoksija reguliše SE. Pored toga, pokazano je da u uslovima hipoksije, kultivacija BFU-E dobijenih iz ukupnih ćelija koštane srži i krvi pupčanika, kao i mišje fetalne jetre i koštane srži dovodi do većeg broja i veličine BFU-E progenitora nego kultivacija ovih ćelija u uslovima normoksije (Cipolleschi i sar., 1997; Lu i sar., 1985; Maeda i sar., 1986; Rich i sar., 1982). Hipoksija indukuje i ekspresiju BMP4 u stromalnim ćelijama slezine (Lenox i sar., 2005). John M. Perry (2007) je sa svojim saradnicima pokazao da BFU-E dostižu proliferativni maksimum tek nakon kultivacije ovih ćelija u uslovima hipoksije uz prisustvo BMP4, EPO i SCF.

EPO čija je produkcija povećana tokom SE deluje na SEP pri čemu one gube sposobnost proliferacije i počinju diferencijaciju ka eritroidnim ćelijama. Razlika u mikrookruženju između slezine i koštane srži dovodi do toga da u slezini EPO ne deluje direktno na SEP već posredstvom makrofaga. EPO utiče na makrofage tako da povećava produkciju prostaglandina (PG) J2, što rezultira inhibicijom Wnt signalnog puta i smanjenjem proliferacije SEP. Istovremeno, EPO podstiče diferencijaciju SEP putem makrofaga povećanom produkcijom PGE2 (Chen i sar., 2020). Tokom ovog procesa SEP gube ekspresiju markera matičnih ćelija i počinju da ekspimiraju EpoR, koji pokreće terminalnu diferencijaciju ćelija. Drugi signali koji doprinose ovoj tranziciji su glukokortikoidni hormoni. Glukokortikoidni hormoni su hormoni nadbubrežne žlezde koji se pojačano luče tokom stresa. Njihov uticaj na eritrocitopoezu ogleda se i kod pacijenata koji su na terapiji glukokortikoidima, a koji kao neželjeni efekat razvijaju policitemiju. Glukokortikoidni hormoni deluju zajedno sa EPO i c-kit receptorom obezbeđujući proliferaciju eritroidnih progenitora, ali i diferencijaciju ovih ćelija tokom SE (Wessely i sar., 1997, von Lindern i sar., 1999). U uslovima hroničnog psihološkog stresa dejstvom glukokortikoidnih hormona dolazi do

povećane proliferacije BFU-E i CFU-E u slezini. Glukokortikoidni hormoni deluju preko svojih glukokortikoidnih receptora, čijom blokadom tokom SE izostaje povećanje broja CFU-E, ali ne i BFU-E ćelija u slezini. Ovo ukazuje na činjenicu da su za ekspanziju BFU-E progenitora u slezini pored glukokortikoidnih hormona potrebni i drugi signali, što nije slučaj sa zrelijim formama progenitornih ćelija eritroidne loze (Vignjevic i sar., 2015).



**Slika 1.3.** Model stres eritrocitopoeze. Modifikovano prema: Sneha Hariharan. Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science, 2016.

SE se, poput eritrocitopoeze u bazalnim uslovima, odvija u specijalizovanoj sredini, gde pored navedenih faktora u njenoj regulaciji učestvuju i brojne međucelijske interakcije koje su tkivno-specifične. U slezini dolazi do formiranja EBI gde makrofagi takođe zauzimaju centralnu poziciju. Iako i u koštanoj srži i slezini postoje EBI koji imaju istu funkciju koja podrazumeva obezbeđivanje dovoljnog broja eritrocita za adekvatnu oksigenaciju tkiva, razvoj ovih EBI, kao i međucelijske interakcije unutar EBI u mikrosredini slezine i koštane srži, nisu iste.

## 1.2. MAKROFAGI

Makrofagi su ćelije primarnog i nespecifičnog imunskog sistema. Njihova uloga se ogleda u održavanju homeostaze, uklanjanju ostarelih i apoptotičnih ćelija, pokretanju adekvatnog imunološkog odgovora aktivacijom odgovarajućih komponenti imunskog sistema, ali i u suprimiranju procesa inflamacije kada za njim više nema potrebe, kao i u obnavljanju oštećenog tkiva.

Makrofagi nastaju od pluripotentnih HSC čijim sazrevanjem nastaju ćelije eritromijeloidne loze, a zatim mijeloidne loze od koje nastaju monociti. U cirkulaciji, normalni opseg monocita obuhvata između 2% i 8% ukupnog broja belih krvnih zrnaca, što odgovara broju od 200-800 monocita po mikrolitru krvi. Monociti su okrugle ćelije sa jedrom u obliku bubrega i veličine su 25-30  $\mu\text{m}$ . Nakon sazrevanja u makrofage, oni poprimaju različite oblike u zavisnosti od njihove funkcionalnosti i obično postaju još veći (Lendeckel i sar., 2022). Ulaskom u tkiva monociti prelaze u makrofage gde obavljaju svoju funkciju. Pored makrofaga koji nastaju na ovaj način postoje i

tkivno-rezidentni makrofagi za koje se smatra da su nastali još tokom embrionalnog perioda i mogu se obnavljati direktno od prekursora monocita. Postoje i makrofagi koji su tkivno-specifični, pa tako Kupferove ćelije predstavljaju makrofage u jetri, Langerhansove ćelije makrofage u koži, dok su alveolarni makrofagi prisutni u plućima, osteoklasti u kostima, histociti u vezivnom tkivu i mikroglija u centralnom nervnom sistemu.

Kontrola homeostatskog razvoja monocita/makrofaga uglavnom je pod uticajem faktora rasta makrofagnih kolonija (engl. Macrophage Colony-Stimulating Factor, M-CSF), koji se proizvodi u stromalnim ćelijama u krvi i tkivima (Hamilton, 2008). Makrofagi poseduju receptore za CSF-1 (CSF-1R) i vezivanjem za njih smanjuje se raspoloživost ovog faktora rasta i redukuje se proliferacija monocita (Tushinski i sar., 1982; Bartocci i sar., 1987). Sposobnost vezivanja za ovaj receptor ima i IL-34 (Lin i sar., 2008; Ma i sar., 2012), međutim, njegovo delovanje je ograničeno samo na Langrehansove ćelije i mikrogliju (Wang i sar., 2012). U uslovima narušene homeostaze, ulogu u sazrevanju ćelija monocitno/makrofagnog sistema ima faktor rasta granulocitno-makrofagnih kolonija (engl. Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF ) (Burgess i Metcalf, 1980; Gasson, 1991).

### 1.2.1. Polarizacija makrofaga

U zavisnosti od mikrookruženja i potreba organizma mogu nastati dva potpuno fenotipski i funkcionalno različita tipa makrofaga: M1 tip makrofaga, aktivirani klasičnim putem, koji se još označavaju kao proinflamatorni makrofagi i M2 tip, alternativno aktivirani, koji se označavaju kao antiinflamatorni. Zahvaljujući postojanju različitih funkcionalnih tipova, makrofagi imaju sposobnost da kontrolišu brojne procese u organizmu (Lendeckel i sar., 2022).

Polarizacija makrofaga zavisi od molekula kojima su aktivirani i citokina u mikrookruženju. Lipopolisaharidi i interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) pokreću polarizaciju M1 makrofaga, što izaziva proinflamatorni odgovor sa lučenjem faktora nekroze tumora- $\alpha$  (eng. tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), IL-6 i IL-1 $\beta$ , koji su neophodni za uništavanje nekih patogena. M2 makrofagi se međutim mogu podeliti na M2a, M2b, M2c i M2d podtipove, i to na osnovu specifičnog profila eksprimiranih gena (Mantovani i sar., 2004). Tako se, M2a podtip aktivira citokinima IL-4 i IL-13. Makrofagi M2b se aktiviraju putem IL-1, imunskih kompleksa i lipopolisaharida, dok se M2c aktivira delovanjem IL-10, transformišućeg faktora rasta- $\beta$  (eng. transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ) i glukokortikoida. Četvrti tip, M2d, aktivira se putem IL-6 i adenozina. M2 makrofagi igraju centralnu ulogu u odgovorima na parazite, remodeliranju tkiva, angiogenezi i alergijskim reakcijama. Jedna od glavnih razlika među navedenim tipovima makrofaga leži u metabolizmu arginina (Karp i Murray, 2012; Sica i Mantovani, 2012). M1 makrofagi metabolišu arginin posredstvom inducibilne azot-monoksid sintetaze (engl. inducible nitric oxid sintetasa, iNOS ili NOS2) sa posledičnom produkcijom azot-monoksida (NO). M2 makrofagi sa druge strane metabolišu L-arginine dejstvom enzima arginaze 1 (Arg1), pri čemu nastaje L-ornitin za koji se pretpostavlja da doprinosi sintezi poliamina. Osim toga, makrofagi mogu igrati različite uloge i menjati svoj fenotip zavisno od tkiva u kojem se nalaze (Locati i sar., 2020). Naime, podela makrofaga na M1 i M2 tip je nastala na osnovu aktivacije Th1 ili Th2 imunološkog odgovora, međutim, postoji i tzv "plastičnost" makrofaga (Stout i Suttles, 2004). Tokom inflamatornog procesa dolazi do aktivacije M1 i M2 tipa makrofaga u zavisnosti od potrebe mikrookruženja i ne bi se mogla postaviti jasna granica koji od makrofaga je tačno M1, a koji M2, s obzirom da postoji mogućnost promene fenotipa. Važno je napomenuti da M1/M2 opisuje potpuno suprotne odgovore, a da se "plastičnost" odnosi na sposobnost makrofaga da se postepeno ili kontinuirano prilagođavaju kako bi postigli M1 ili M2 prevladavajuću aktivnost, ili različite mešavine ovih odgovora. *In vitro* istraživanja su pokazala da makrofagi imaju ulogu tokom diferencijacije i proliferacije HSC. Tako, M1 tip makrofaga posredstvom produkovanog NO dovodi do povećene proliferacije, diferencijacije i apoptoze HSC, dok M2 doprinosi samoobnavljanju ovih ćelija (Luo i sar., 2018).

### 1.2.2. Uloga makrofaga tokom eritrocitopoeze

Kao što je prethodno navedeno, makrofagi zauzimaju centralno mesto u EBI i uspostavljaju interakcije sa eritroblastima koji ih okružuju i posreduju tokom njihovog sazrevanja. Makrofagi EBI su okarakterisani kao M2 tip, antiinflamatorni makrofagi koji ekspresiraju CD169, VCAM-1 i F4/80. Ekspresija ovih markera je heterogena, što može uzrokovati fenotipske razlike EBI lociranih u različitim zonama koštane srži. EBI makrofagi takođe ekspresiraju CD163, receptor za kompleks hemoglobin-haptoglobin, koji, pored uloge u uklanjanju slobodnog hemoglobina, može delovati kao adhezivni molekul za eritroblaste, iako je njegov ligand još uvek nepoznat (*Fabrick i sar., 2007*). Interesantno je da i eritroidne ćelije i 90% EBI makrofaga ekspresira receptor za EPO, pa stoga EPO može delovati istovremeno na obe vrste ćelija, poboljšavajući formiranje EBI putem povećane ekspresije adhezivnih molekula na makrofagima (*Li W i sar., 2019*). Protein makrofaga i eritroblasta (engl. erythroblast macrophage protein, EMP) predstavlja transmembranski protein koji je prisutan i kod eritroblasta i kod makrofaga i ima ulogu, kako u interakcijama između eritroblasta, tako i u interakcijama eritroblasta sa makrofagom putem homofilnog vezivanja (*Javan i sar., 2018*). Citoplazmatski domen EMP sadrži nekoliko potencijalnih mesta vezivanja za SH2 domene i potencijalno mesto vezivanja za domen koji vezuje fosfotirozin, što sugerise signalnu funkciju ovog proteina. Unutar ostrva, vezivanje eritroblasta/centralnog makrofaga posredovano je i integrinom eritroblasta,  $\alpha 4\beta 1$  i intraćelijskim adhezivnim molekulom (engl. intercellular adhesion molecule 4, ICAM-4) sa njegovim kontrareceptorima na centralnim makrofagima, tj. sa vaskularnim molekulom ćelijske adhezije-1 (engl. vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) i integrinom  $\alpha v$  (*Sadahira i sar., 1995; Lee i sar., 2006*). Važno je napomenuti da se sekretovana forma ICAM-4, ICAM-4S, povećava kod eritroblasta u kasnim fazama diferencijacije i pretpostavlja se da konkuriše membranskom ICAM-4 vezujući se sa  $\alpha v$  integrinom u makrofagima. Na taj način nezreli retikulociti se mogu odvojiti od makrofaga i ući u krvotok (*Fabrick i sar., 2007*).

Faktori koje luče makrofagi, takođe, doprinose određenim fazama eritrocitopoeze u EBI mikrookruženju. Eritroblasti pokazuju veću proliferativnu sposobnost kada se kultivisu u prisustvu makrofaga. Iako nisu poznati svi faktori proizvedeni od strane makrofaga u okviru EBI, pokazano je da proliferacija eritroidnih ćelija indukovana od strane makrofaga ne zavisi od EPO (*Rhodes i sar., 2008*). Nedavni naponi usmereni na otkrivanje ovih faktora pokazali su da EBI makrofagi sekretuju insulinu sličan faktor rasta 1 (engl. insulin like growth factor, IGF1) i IL-18 (*Li W i sar., 2019*), sugerišući ulogu ovih medijatora u proliferaciji, preživljavanju ili diferencijaciji eritroidnih ćelija. Ekspresija IGF1 receptora (IGF1R) je takođe izražena u eritroidnim ćelijama u različitim fazama razvoja, a poznato je da IGF1 povećava eritrocitopoezu (*Miyagawa i sar., 2000*). Pored toga, prisustvo IL-18R je takođe uočeno u ćelijama eritroidne linije (*Li J i sar., 2014*), iako uloga IL-18 sekretovanog u EBI nije istražena. S druge strane, eritroblasti luče vaskularni endotelni faktor rasta A, faktor rasta placente i protein Gas6 (engl. growth arrest-specific 6) koji dovode do proliferacije makrofaga (*Tordjman i sar., 2001; Majka i sar., 2001; Angelillo-Scherrer i sar., 2008; Akinosoglou i sar., 2012*). Osim ovih faktora koji pozitivno utiču na proliferaciju ćelija eritroidne loze i makrofaga, nekoliko sekretovanih faktora negativno reguliše eritrocitopoezu. Oni uključuju faktore kao što su: TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  i INF- $\gamma$  (*De Maria i sar., 1999; Zama i sar., 2000; Zermati i sar., 2000; Libregts i sar., 2011*). INF- $\gamma$  i TNF- $\alpha$  negativno regulišu eritrocitopoezu uglavnom izazivanjem apoptoze. Proizvodnja TNF- $\alpha$  od strane makrofaga dovodi do razgradnje transkripcionog faktora GATA-1 posredstvom kaspaze (*De Maria i sar., 1999*). TGF- $\beta$  značajno ubrzava i povećava diferencijaciju, ali u isto vreme izaziva gubitak proliferativnog potencijala u prekursorima eritrocita i na taj način deluje inhibitorno na eritrocitopoezu (*Zermati i sar., 2000*). Iako su nova važna istraživanja otkrila ranije nepoznate solubilne faktore uključene u razvoj eritrocita, potrebno je još studija kako bi se otkrili drugi mogući medijatori i faktori rasta koje proizvode makrofagi, njihovi odgovarajući receptori na eritroblastima, kao i njihov potencijalni uticaj na različite faze procesa eritrocitopoeze.

Tokom sazrevanja eritroblasta u retikulocite jedro i veliki broj organela se izbacuju iz ovih ćelija. Izbačena jedra, poznata kao pirenociti, fagocituju se od strane makrofaga EBI-a, koji se prepoznaju fosfatidilserin mehanizmom slično prepoznavanju apoptotskih ćelija. Nakon što budu fagocitovane, genomska i mitohondrijalna DNK se razgrađuju od strane DNaze II, koju poseduju centralni makrofagi. Ovaj enzim je esencijalan za život jer se u odsustvu DNaze II ne razgrađuje sva fagocitovana DNK, već se nakuplja unutar makrofaga vodeći ove ćelije u smrt i uzrokujući posledično inhibiciju eritrocitopoeze i anemiju (*Kawane i sar., 2001*).

Transkripcioni faktor koji najbolje karakteriše makrofage EBI je KLF1. KLF1 se direktno vezuje za promotor DNaze II i embrioni bez KLF1 imaju smanjenu ekspresiju DNaze II (*Porcu i sar., 2011*). Istraživanja *in vitro* otkrila su da je KLF1 odgovoran za nekoliko karakteristika makrofaga EBI, kao što su posedovanje VCAM-1, CD163 i CD169, kao i DNaze II, omogućavajući makrofagima da učestvuju u regulaciji sazrevanja eritrocita (*Lopez i sar., 2019*).

### 1.2.3. Uloga makrofaga u SE

S obzirom da se SE odvija prevashodno u slezini, makrofagi crvene pulpe slezine i makrofagi nastali od regrutovanih monocita učestvuju u formiranju EBI. Makrofagi crvene pulpe tokom homeostaze imaju ulogu u uklanjanju ostarelih eritrocita. Označeni su kao F4/80+VCAM1+ i mogu se obnoviti monocitima iz koštane srži. Oni ekspimiraju i CD163, Spi-C, hem-oksigenazu (HO-1) i feroportin koji im obezbeđuju regulaciju metabolizma gvožđa.

Usled narušene homeostaze dolazi do povećane produkcije proinflamatornih citokina koji stimulišu povećanu produkciju ćelija imunskog sistema, pa samim tim i ćelija monocitno/makrofagne loze. Makrofagi slezine u ovakvim stanjima proizvode monocitni hemotaksni protein-1 (eng. monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) koji regrutuje cirkulišuće monocite, učestvujući u formiranju novih EBI u slezini. Makrofagi EBI proizvode BMP4, SCF, GDF15 i Wnt koji stimulišu proliferaciju SEP. Oni poseduju i EpoR preko kojih se ispoljava dejstvo EPO u uslovima SE, i to indirektno, produkcijom prostaglandina. (*Chen i sar., 2020*). Stimulacija EpoR-a u makrofagima je ključna za eritrocitopoezu tokom SE, budući da oštećenje EPO/STAT5 signalizacije u makrofagima ometa SE. Vezivanjem EPO za makrofage dolazi do smanjene produkcije signala koji stimulišu proliferaciju SEP, a indukuju se signali koji dovode do njihove diferencijacije. Ove promene deo su širih transformacija u okolini. Naime, iz proinflamatornog stanja dominiranog signalima karakterističnim za M1 makrofage, dolazi do prelaska u antiinflamatorno stanje dominirano signalima M2 makrofaga. Makrofagi slezine regulišu cirkulaciju eritroidnih ćelija slezine uklanjanjem starih i oštećenih eritrocita i intereaguju sa eritroidnim progenitorima. Istraživanja su pokazala da tokom narušene homeostaze dolazi do povećane fagocitoze eritrocita od strane makrofaga slezine uz povećanu ekspresiju Spi-c i receptora sličnih Tollu (engl. Toll-like receptors TLR) što za posledicu ima povećanu produkciju GDF15 i BMP4 (*Bennett i sar., 2019*).

Interakcija između makrofaga i eritroblasta se i ovde, pored produkcije citokina, odvija putem adhezivnih molekula. Međutim, ispitivanjem pojedinih mutacija je otkriveno da određeni adhezivni molekuli imaju veću ulogu tokom SE, dok drugi tokom eritrocitopoeze u stabilnom stanju. Pa tako mutacija u genu za  $\alpha 4\beta 1$  integrin pokazuje mali efekat tokom eritrocitopoeze u bazalnim uslovima, ali prouzrokuju odloženi oporavak nakon akutne anemije (*Ulyanova i sar., 2014*). Nasuprot tome, mutacija gena EMP remeti eritrocitopoezu u bazalnim uslovima, dok je SE očuvana (*Wei i sar., 2019*).

Istraživanja su pokazala da je glukokortikoidni hormon odgovoran za diferencijaciju monocita u makrofage sa fenotipskim profilom EBI. *In vitro* kultivacija monocita u prisustvu deksametazona dovela je do njihove diferencijacije u makrofage koji su imali sposobnost da intereaguju sa eritrocitima promovšući eritrocitopoezu (*Heideveld i sar., 2018*). Patofiziologija

nekih hemolitičkih anemija, policitemije vere i  $\beta$ -talasemije slična je patofiziologiji hronične SE. Oba oboljenja dele karakteristike SE, kao što su splenomegalija, širenje eritroidnih progenitora i retikulocitoza. Doprinos makrofaga u patologiji policitemije vere i  $\beta$ -talasemije pokazan je u istraživanjima na miševima, budući da je deplecija makrofaga preokrenula neke ključne karakteristike povezane sa ova dva oboljenja (*Ramos i sar., 2013*). Makrofagi su se pokazali neophodnim za razvoj ekstramedularne eritrocitopoeze i splenomegalije prisutne kod miševa sa ovim poremećajima.

Pokazano je da eliminacijom makrofaga *in vitro* izostaje SE (*Ramos i sar., 2012*). Međutim, molekularni mehanizmi kojima makrofagi kontrolišu ovaj proces kao i međućelijske interakcije koje doprinose SE još uvek nisu ispitani. Neke od ćelija koje su svakako prisutne u mikrosredini koštane srži i slezine su mezenhimalne matične ćelije (engl. mesenchymal stem cells, MSC). S obzirom da se o njihovoj ulozi tokom SE veoma malo zna, tema ove doktorske disertacije se odnosi na ispitivanje uloge MSC u SE kroz njihove interakcije sa makrofagima.

### 1.3. MEZENHIMALNE MATIČNE ĆELIJE

MSC su nehematološke pluripotentne ćelije koje se još nazivaju i mezenhimalne stromalne ćelije. Karakteriše ih sposobnost samoobnavljanja i višelinijaska diferencijacija (*Jiang i sar., 2002*). Prvobitno su izolovane iz aspirata koštane srži na osnovu njihove sposobnosti da adheriraju za plastiku, pri čemu su imale karakterističan izgled koji podseća na fibroblaste i tada su ih nazvali jedinice koje stvaraju fibroblastne kolonije (engl. *colony-forming unit – fibroblastic*, CFU-F) (*Friedenstein i sar., 1976*). Kasnije su MSC izolovane iz nekoliko drugih tkiva, uključujući pupčanu vrpцу (*Erices i sar., 2000*), masno tkivo, jetru (*Kholodenko i sar., 2019*), slezinu, zubnu pulpu i plućno tkivo (*Foronjy i Majka, 2012*). Kako bi se olakšala identifikacija MSC, Međunarodno društvo za ćelijsku terapiju je 2006. godine uvelo kriterijume za identifikaciju ovih ćelija (*Dominici i sar., 2006*). Naime, da bi se ćelije okarakterisale kao MSC moraju da demonstriraju sposobnost adheriranja za plastiku prilikom uzgoja; da 95% i više ćelija eksprimira CD73 (ekto-5'-nukleotidaza), CD90 (glikofosfatidilinozitol) i CD105 (endoglin), dok u isto vreme, više od 95% ovih ćelija bude bez ekspresije CD45 (zajednički leukocitni antigen), CD11b (integrin), HLA-DR, CD34 (marker hematopoetskih ćelija), CD19 i CD79 $\alpha$  (markeri B limfocita) i da poseduju sposobnost *in vitro* diferencijacije ćelija u tri loze: osteoblaste, adipocite i hondroblaste.

Pored toga što MSC imaju sposobnost diferencijacije u ćelije mezodermalne linije, MSC su sposobne da se diferenciraju u ćelije nemezodermalnog porekla tj. ektodermalne i endodermalne linije, kao što su neuronske ćelije, kardiomiociti, hepatociti ili epitelne ćelije (*Lee i sar., 2004; Paunescu i sar., 2007; Quevedo i sar., 2009; Gervois i sar., 2015*). Ova plastičnost im daje prednost u regeneraciji tkiva.

Mezenhimalne matične ćelije postale su najčešće korišćeni tip matičnih ćelija za kliničku primenu zbog brojnih prednosti. Pored različitog izvornog i višelinijaskog potencijala diferencijacije MSC takođe poseduju sposobnost da migriraju na povređena mesta kao odgovor na signale okoline.

#### 1.3.1. Mezenhimalne matične ćelije i hematopoeza

MSC su sastavni deo hematopoezne niše. Kako je hematopoezna niša mikrosredina koja je podložna dinamičnim promenama, uključujući promenu mesta, broja i funkcije, u zavisnosti od uslova i potreba organizma (*Scadden, 2006*), MSC imaju ulogu u regulaciji sastava mikrosredine, a samim tim i procesa hematopoeze. MSC tokom hematopoeze svoju ulogu obavljaju sekrecijom odgovarajućih faktora rasta, direktnim kontaktom ili produkcijom vanćelijskog matriksa, obezbeđujući mikrosredinu koja je neophodna kao podrška hematopoetskim ćelijama za preživljavanje, samoobnavljanje, migraciju i diferencijaciju (*Dazzi i sar., 2006; Pontikoglou i sar., 2011*). U prilog ovom konceptu nekoliko studija je pokazalo prisustvo MSC na mestima

hematopoeze, počevši od embrionalne razvojne faze E11 u aortro-gonado-mezonefrosu i nakon razvoja hematopoetskog sistema u jetri, slezini i koštanoj srži (*Mendes i sar., 2005*).

Radi boljeg razumevanja kompleksne interakcije MSC sa okolnim strukturama tokom hematopoeze, korišćeni su miševi različitih sojeva kao modeli za proučavanje humane hematopoeze. Iako ljudske MSC pokazuju različite funkcionalne karakteristike, molekularni mehanizmi koji leže u osnovi podrške MSC, prvobitno identifikovani u mišjim modelima, bili su ključni za razumevanje složenosti ljudske hematopoetske niše. Ovakva istraživanja su dovela do saznanja o postojanju heterogene grupe MSC koje mogu eksprimirati leptinske receptore (leptR+ MSC), neuron-glia antigen 2 (NG+MSC) ili retikularne (CAR) stromalne ćelije obogaćene hemokin ligandom 12 (CXCL12). Ove ćelije su lokalizovane oko sinusoida ili samih arterija pri čemu učestvuju u regulaciji hematopoeze, kako direktnim kontaktom, tako i posredstvom raznih molekula. Kao glavni molekul koji učestvuje u ovom procesu, označen je CXCL12, koji održava HSC u stanju mirovanja i stimuliše njihovu mobilizaciju i diferencijaciju kada je to potrebno (*Sugiyama i sar., 2006*). MSC predstavljaju i izvor SCF koji je od suštinskog značaja za regeneraciju HSC. Takođe, veliki broj faktora sekretovanih od strane MSC, koji imaju ulogu u inflamatornim reakcijama i apoptozi, učestvuju i regulaciji funkcije HSC. Tu spadaju vaskularni endotelni faktor rasta (engl. vascular endothelial growth factor, VEGF), faktor rasta fibroblasta-2 (engl. fibroblast growth factor 2, FGF-2), angiopoetin (ANGPT) i faktor rasta hepatocita (engl. hepatocyte growth factor, HGF), svi povezani sa različitim signalnim putevima (*Hattori i sar., 2001; Blank i sar., 2008; Jalili i sar., 2010; Itkin i sar., 2012; Aqmasheh i sar., 2017*). Novija istraživanja su pokazala da MSC sekretuju vanćelijske vezikule koje sadrže lipide, proteine ili genetski materijal i učestvuju u regulaciji hematopoeze (*Crippa i sar., 2021*). Pored toga, MSC podržavaju hematopoezu produkcijom i drugih citokina kao što su Flt-3-ligand, trombopoetin, leukemijski inhibitorni faktor, TGF- $\beta$ , IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, faktor stimulacije rasta granulocitno-makrofagnih kolonija (GM-CSF) i faktor stimulacije rasta makrofagnih kolonija (M-CSF). Adhezivni molekuli, koji su prisutni na MSC, a učestvuju u interakciji prilikom hematopoeze, su N-kadherin, VCAM-1, VLA-4 (*Majumdar i sar., 2000; Dazzi i sar., 2006*).

Rezultati brojnih *in vitro* istraživanja ukazuju na ulogu MSC tokom eritrocitopoeze. Pokazano je da ko-kultura MSC sa HSC može dovesti do stvaranja eritrocita, pri čemu se ćelijski kontakt označava kao neophodan za održavanje ćelijskog ciklusa i ekspanziju HSC (*Jing i sar., 2010*). Da bi se bolje definisala njihova uloga i optimizovala eritrocitopoeza *in vitro*, stromalne ćelije su korišćene kao hranljivi sloj u protokolima ko-kulture kako bi obezbedile fiziološko okruženje. Giarratana (2005) je sa svojim saradnicima koristeći liniju mišjih stromalnih ćelija MS5 i humane HSC sa dodatkom SCF, IL-3 i EPO, uspeo da stvori potpuno zrele i funkcionalne eritrocite koji sadrže hemoglobin.

Oponašanje mikrosredine koštane srži sa MSC postao je pristup koji koriste mnogi istraživači i pokazalo se da značajno poboljšava rezultate *in vitro*. Međutim, koštana srž je složen tkivni sistem koji uključuje i druge važne komponente, pa ponašanje MSC zavisi od uslova mikrosredine. One reaguju na udružene faktore okoline kao što su druge ćelije, vanćelijski matriks, parakrini molekuli, humoralni signali, fizički, metabolički i nervni impulsi.

Uloga MSC pokazana je i tokom ekstramedularne hematopoeze. Kako je slezina jedno od glavnih mesta ekstramedularne hematopoeze, identifikovane su MSC slezine koje učestvuju tokom ovog procesa. One su označene kao PDGFR $\beta$  (platelet derived growth factor receptor  $\beta$ ) pozitivne ćelije koje luče CXCL12 i CSF, tako da liče na perivaskularne/perisinusoidne retikularne ćelije opisane prvobitno u koštanoj srži hematopoetske niše (*Inra i sar., 2015*). Rezultati najnovijih istraživanja pokazuju da MSC slezine eksprimiraju i transkripcioni faktor TLX1, čija povećana

ekspresija dovodi do proliferacije HSC i posledičnog razvoja ekstramedularne hematopoeze u slezini (*Oda i sar., 2018*).

### 1.3.2. Međućelijske interakcije makrofaga i MSC

Poznato je da MSC imaju imunomodulatornu ulogu. One ovo svoje dejstvo ispoljavaju intereagujući sa ćelijama imunskog sistema, pri čemu parametri mikrosredine mogu uticati i na imunomodulatorno svojstvo ovih ćelija. Studije su pokazale da MSC imaju sposobnost da regulišu funkciju T limfocita, B limfocita i dendritičnih ćelija (*Uccelli i sar., 2006; Shi C i sar., 2011*). Istovremeno, MSC intereaguju i sa ćelijama urođenog imuniteta, pri čemu je dokazano da MSC mogu regulisati polarizaciju, fagocitozu i metabolizam makrofaga.

U uslovima narušene homeostaze dolazi do povećane produkcije MCP-1 koji reguliše izlazak monocita iz koštane srži. Istraživanja su pokazala da pored makrofaga i MSC produkuju MCP-1 i na taj način regulišu migraciju monocita. Pokazano je da delecija MCP-1 gena u MSC dovodi do smanjene migracije monocita tokom infekcije (*Shi M i sar., 2011*). Pored toga, MCP-1 učestvuje u polarizaciji makrofaga. (*Giri i sar., 2020*). Rađena su brojna istraživanja čiji rezultati nedvosmisleno ukazuju na ulogu MSC u polarizaciji makrofaga. Tako je pokazano da kod makrofaga koštane srži, koji su zajedno kultivisani sa MSC, produkcija M1 faktora poput IL-6, IL-1 $\beta$ , iNOS je značajno smanjena. Nasuprot tome, markeri karakteristični za M2, kao što su IL-10, IL-4, CD206 i Arg1, značajno su povećani u ko-kulturama sa MSC (*Cho i sar., 2014*). Ove matične ćelije upravljaju plastičnošću makrofaga tako što menjaju metaboličko stanje makrofaga preko PGE2, TGF- $\beta$ , indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) i TSG6 (tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced gene/protein 6) (*Francois i sar., 2012; Sala i sar., 2015; Vasandan i sar., 2016; Lui i sar., 2019*). Iako većina literaturnih podataka ukazuje da imunomodulatorna svojstva MSC u velikoj meri zavise od lučenja rastvorljivih faktora, kontakt između ćelija je takođe važan funkcionalni mehanizam (*Li Y i sar., 2019*).

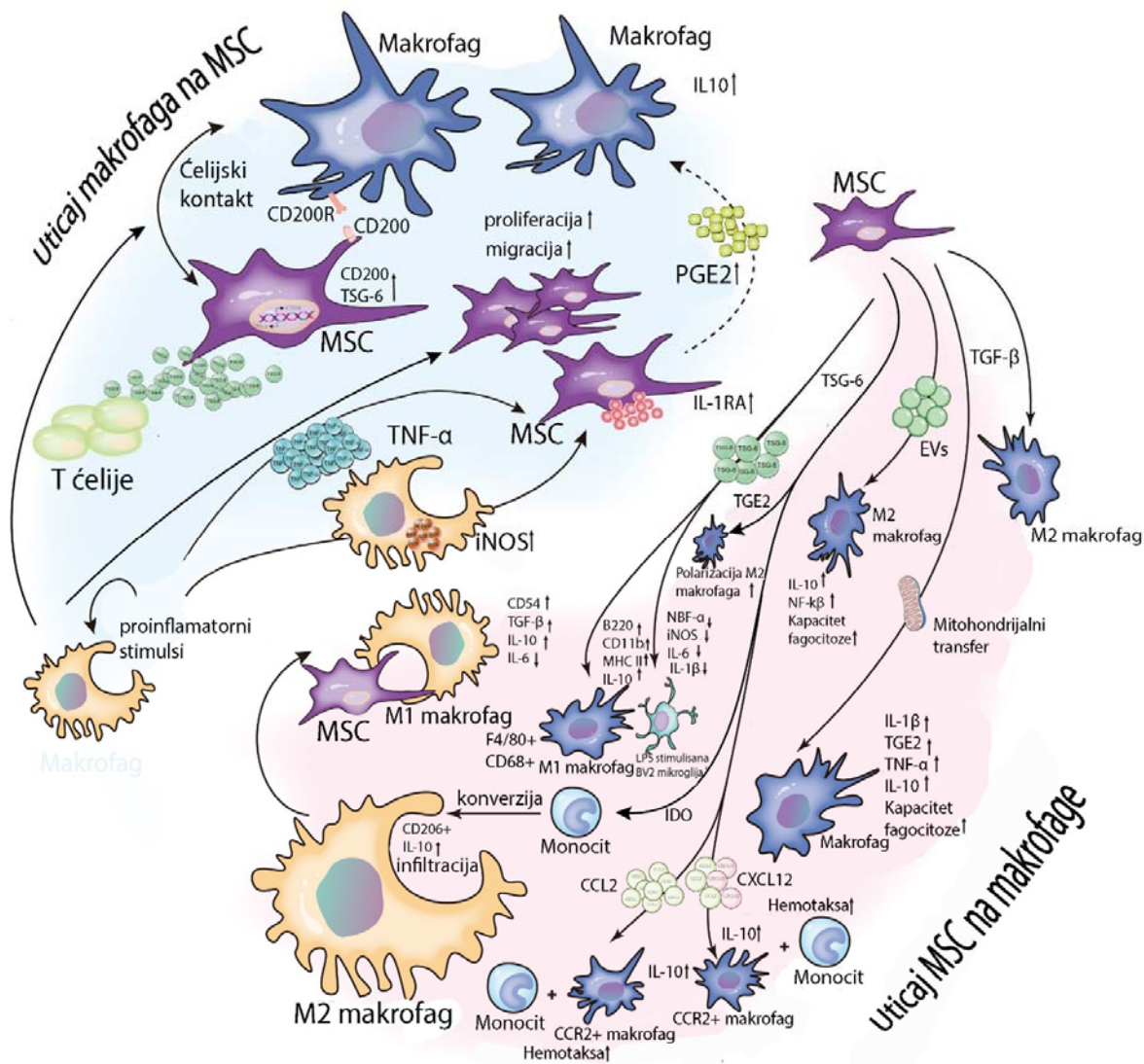
Interakcije MSC i makrofaga bile su predmet istraživanja kod velikog broja oboljenja. Tako je pokazano da MSC mogu efikasno doprineti oporavku od povrede kičmene moždine polarizovanjem makrofaga od tipa M1 do M2 (*Nakajima i sar., 2012*). Druge studije su pokazale da MSC mogu da utiču na bolesti jetre, kao što su akutna insuficijencija jetre i fibroza jetre, inhibiranjem proinflamatornih M1 ćelija i stimulacijom M2 antiinflamatornih ćelija (*Wang i sar., 2021*). Uticaj polarizacije makrofaga pod dejstvom MSC pokazao se značajnim kod dijabetesa i u ishemijski miokarda (*Gao i sar., 2019; Liao i sar., 2020*).

Istraživanja *in vitro* su pokazala da MSC promovišu apoptozu RAW264.7, ćelijske linije makrofaga. Takođe, pokazano je da MSC mogu smanjiti broj makrofaga u slezini (*Huang i sar., 2016*). Druga istraživanja su demonstrirala da MSC promovišu fagocitozu makrofaga putem mitohondrijalnog transfera kod različitih bolesti kao što su sindrom akutnog respiratornog distresa i sepsa (*Jackson i sar., 2016; Jackson i sar., 2017*). Pored toga, MSC promovišu diferencijaciju naivnih makrofaga i pojačavaju njihov baktericidni efekat.

S druge strane, makrofagi regulišu diferencijaciju, migraciju, apoptozu i imunomodulatorne funkcije MSC. Pokazano je da makrofagi, bez obzira na to da li su M1 ili M2, suprimiraju adipogenu diferencijaciju, dok M1 makrofagi stimulišu osteogenu diferencijaciju i mogu dovesti do apoptoze MSC, a M2 tip makrofaga promoviše proliferaciju i migraciju MSC (*Yu i sar., 2016; Xia Y i sar., 2020*). M2 tip makrofaga, stimulišući proliferaciju i integraciju MSC, posreduje u obnavljanju oštećenih tkiva (*Maldonado-Lasuncion i sar., 2021*). Ovi podaci pružaju novi uvid u potencijalnu upotrebu ciljane terapije makrofagima u reparaciji tkiva. Pokazano je da MSC ekspimiraju veći broj gena uključenih u imunoregulaciju kada su u ko-kulturi sa makrofagima, pri čemu makrofagi mogu vršiti fagocitozu MSC i na taj način regulisati njihova imunomodulatorna svojstva (*de Witte i sar., 2018*). U mikrosredini različitih bolesti postoji zatvoren krug interakcije



makrofaga i MSC. Proinflamatorni faktori oslobođeni od strane makrofaga aktiviraju MSC, koje zatim za uzvrat regulišu imunski odgovor i komuniciraju sa makrofagima, obezbeđujući na taj način homeostazu inflamatorne sredine. Pored toga, MSC mogu reprogramirati makrofage u M2 tip sa funkcijama fagocitoze i mogu smanjiti lučenje proinflamatornih faktora da bi kontrolisali inflamatornu mikrosredinu (Wolfe i sar., 2016). (Slika 1.4).



**Slika 1.4.** Interakcije MSC i makrofaga. Modifikovano po: Lu D i sar.2021. *Frontiers in cell and developmental biology.* 2021; 9:681171

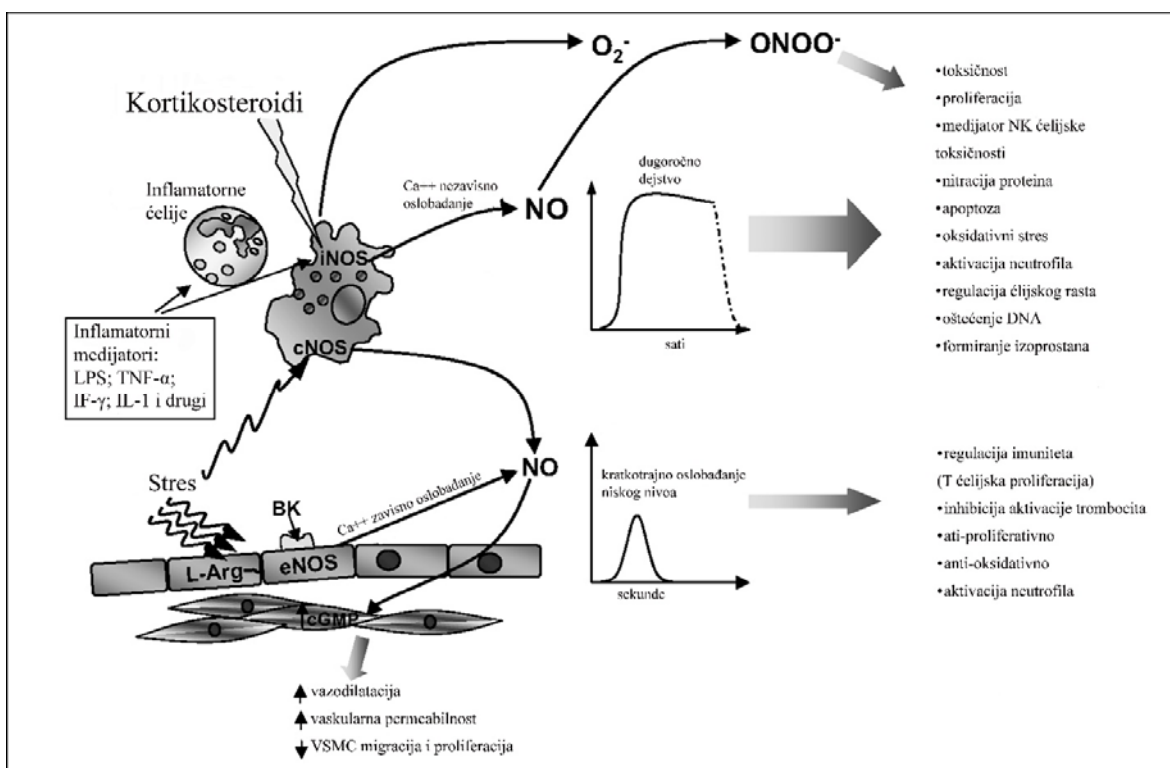
Interakcija MSC i makrofaga u koštanoj srži takođe je ključna za održavanje mikrosredine tokom hematopoeze. Značaj ove interakcije pokazan je u okviru hematoloških maligniteta kada MSC mogu reprogramirati makrofage u M2 tip koji ima funkciju tokom reparacije tkiva. Reprogramiranje makrofaga od strane MSC menja mikrosredinu koštane srži i inhibira razvoj leukemije (Xia C i sar., 2020).

Kako se SE razvija kao odgovor organizma usled narušene homeostaze, prilikom ovog procesa interakcije makrofaga i MSC imaju ključnu ulogu obezbeđujući adekvatnu mikrosredinu kako u koštanoj srži, tako i u slezini. Ipak, mnoga istraživanja nisu dovoljno razjasnila složene molekularne mehanizme koji su u osnovi njihovog intereagovanja.

## 1.4. AZOT - MONOKSID

NO je gas za koji je poznato da ima veoma važnu ulogu tokom mnogih fizioloških, a i patoloških procesa. Enzimski se sintetise iz aminokiseline L-arginin u velikom broju tkiva koristeći tri izoforme azot-oksida sintetaze (engl. nitric oxide synthetaze, NOS). Prva izoforma ovog enzima označava se kao NOS1 (nNOS-neuronska), druga je NOS2 (iNOS-inducibilna) i treća NOS3 (eNOS-endotelna) (*Marletta i sar., 1994*). Prilikom delovanja ovih enzima dolazi do oksidacije aminokiseline L-arginina pri čemu nastaje NO i L-citrulin. NOS1 i NOS3 su konstitutivno prisutni i aktiviraju se kalcijumom vezanim za kalcijum na odgovarajuće stimuluse (*Stuehr i sar., 1997*). S druge strane, ekspresija NOS2 se prvenstveno indukuje u makrofagima kao odgovor na inflamatorne stimuluse. Pored nastanka NO dejstvom enzima NOS, NO se može proizvoditi i delovanjem drugih enzima uključujući ksantin oksidazu, sulfat oksidazu i aldehid oksidazu čijim delovanjem NO nastaje iz nitrata (*Lundberg i sar., 2008*). U eritrocitima hemoglobin proizvodi NO kroz reduktivnu reciklažu nitrata (*Chen i sar., 2008*). Činjenica da miševi kojima nedostaju sva tri NOS enzima mogu da opstanu (*Tsutsui i sar., 2006*) sugerise da mehanizmima kompenzacije NO potiče iz drugih izvora. S druge strane, miševi koji su dugo bili uzgajani sa nedostatkom nitrata i nitrata u ishrani razvijaju metabolički sindrom, endotelnu disfunkciju i na kraju dolazi do smrti usled kardiovaskularne disfunkcije (*Kina-Tanada i sar., 2017*). Ova zapažanja sugerisu da su, zajedno sa NO proizvedenim reakcijama katalizovanim NOS, nitrit i nitrat takođe suštinski izvori za proizvodnju NO.

Delovanje NO može biti autokrino i parakrino. Svoje dejstvo ispoljava vezivanjem za solubilne gvanilat ciklaze i stvaranjem cikličnog guanozin monofosfata (cGMP) u kombinaciji sa reaktivnim vrstama kiseonika, modifikujući proteine i aktivirajući kratkoročne i dugoročne signalne kaskade (*Bogdan, 2001; Bruckdorfer, 2005*). Uglavnom deluje kao sekundarni glasnik u brojnim biološkim funkcijama kao što je regulacija krvnog pritiska kroz opuštanje glatkih mišića i inhibicija agregacije trombocita. NO deluje i kao modulator imunološkog odgovora, ali i kao neurotransmiter u centralnom nervnom sistemu (*Moncada i sar., 1991*). Pokazalo se da NO utiče i na ekspresiju gena koji regulišu opstanak i proliferaciju ćelija, pri čemu deluje na nivou transkripcije i translacije u različitim tipovima ćelija (*Tejedo i sar., 2010*). Pored toga, NO ima ulogu u patofiziologiji kancera ili endokrinih i neurodegenerativnih bolesti (*Krumenacker i sar., 2004*). Značaj NO pokazan je i tokom embrionalnog razvoja, pogotovo u razvoju i radu srca (*Bloch i sar., 1999; Tanioka i sar., 2011*). Delovanje NO pokazano je značajnim i u odgovoru na različite stresove (*Mancuso i sar., 2010*). Poznato je da NO parakrinim mehanizmima reguliše neuroendokrinoimunološke interakcije u uslovima stresa (*Rettori i sar., 2009*) i da psihološki stres moduliše aktivnost nuklearnog faktora kapa  $\beta$  (NF $\kappa$  $\beta$ ) i posledičnu produkciju NO u različitim tipovima ćelija (*Bierhaus i sar., 2003; Echeverry i sar., 2004*). Naime, patofiziološki mehanizmi u bolestima koje su povezane sa stresom uključuju hormone stresa kao što su kortizol i noradrenalin, ali takođe i aktivnost NO. Iako ima svoje potencijalno štetne aspekte, NO, takođe, poseduje snažne sposobnosti za ublažavanje negativnih efekata. Održavanje ravnoteže između ovih suprotnih svojstava NO igra ključnu ulogu u regulisanju odgovora organizma na stres. Iz svega navedenog proizilazi da NO ima kompleksan doprinos u nastanku bolesti povezanih sa stresom (**Slika 1.5**).



**Slika 1.5.** Delovanje NO u uslovima narušene homeostaze. Modifikovano prema: Guzik i sar. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54:469-87.

#### 1.4.1. Azot - monoksid i eritrocitopoeza

Pokazana je značajna uloga NO tokom procesa eritrocitopoeze (Čokić i Schechter, 2008), pri čemu je balans NO kritičan za njegovu ulogu tokom ovog procesa. Disregulacija u produkciji NO može dovesti do prekomerne ili nedovoljne proizvodnje eritrocita. Faktori koji utiču na proizvodnju NO, a samim tim na proces eritrocitopoeze, uključuju unos L-arginina ishranom, aktivnost NOS enzima i prisustvo inflamatornih medijatora.

Delovanje NO na eritrocitopoezu može biti inhibitory, ali i stimulatory. Dokazano je da NO reguliše hematopoezu u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Nogueira i sar., 2014). Rezultati novijih *in vitro* istraživanja su pokazali da NO utiče na migraciju HSC. Pod dejstvom NO dolazi do povećane ekspresije molekula CXCR4 na ovim ćelijama, koji inače predstavlja receptor za CXCL12 i na taj način reguliše migraciju HSC pri čemu je sličan efekat dobijen aktiviranjem cGMP koji je sastavni deo signalnog puta NO (Xu D i sar., 2020). S druge strane, pokazano je da je iNOS negativni regulator migracije HSC (Adamiak i sar., 2017). Kao jedna od glavnih uloga tokom eritrocitopoeze navodi se sposobnost NO da reguliše nivo i aktivnost HIF1α, molekula koji utiče na produkciju EPO. Neke studije sugerišu da NO može stabilizovati HIF1α, poboljšavajući njegovu transkripcionu aktivnost, posebno u situacijama umerene hipoksije (Agani i sar., 2002). Studije *in vitro* su pokazale da NO sintetisan od strane nNOS može regulisati eritrocitopoezu posredstvom EPO. Naime, NO povećava osetljivost eritroidnih progenitornih ćelija na EPO (Lee i sar., 2023). *In vitro* i *in vivo* istraživanja su pokazala da NO aktiviranjem cGMP stimuliše eritrocitopoezu kontrolišući ekspresiju višestrukih faktora transkripcije specifičnih za lozu (Ikuta i sar., 2016). U nekim slučajevima je pokazano da NO inhibira eritrocitopoezu. Prekomerna proizvodnja NO, koja se često primećuje kod hroničnih inflamatornih stanja, može dovesti do oksidativnog stresa i oštećenja eritroidnih progenitornih ćelija. Visoki nivoi NO mogu ometati ekspresiju ključnih gena povezanih sa eritrocitopoezom i poremetiti sazrevanje eritrocita. *In vitro* istraživanja su pokazala da NO može delovati inhibitory na eritroidne progenitore. Kultivisanjem CD34<sup>+</sup> ćelija iz periferne krvi čoveka

pokazao se inhibitorni efekat na proliferaciju CFU-E i BFU-E ćelija (*Shami i Weinberg, 1996*). Takođe, utvrđeno je da NO inhibira sintezu hemoglobina i na taj način suprimira diferencijaciju K562 ćelija (ćelijske linije humane eritroleukemije) (*Chénais i sar., 1999*). Naša ranija istraživanja su pokazala da NO deluje inhibitorno na rast CFU-E i BFU-E kolonija koštane srži miša tokom eritrocitopoeze u bazanim uslovima dok ovaj efekat tokom hroničnog psihološkog stresa izostaje (*Vignjević Petrinović i sar., 2020*).

#### **1.4.2. Azot - monoksid i makrofagi**

NO se smatra jednim od centralnih medijatora mitohondrijalnog metaboličkog reprogramiranja tokom aktivacije makrofaga. Činjenica da je podela makrofaga na podtipove izvršena na osnovu metabolizma L arginina i produkcije NO ukazuje na značaj ovog molekula na funkciju makrofaga. Makrofagi poseduju iNOS izoformu enzima. U uslovima inflamacije pod dejstvom LPS i TNF $\alpha$  dolazi do aktivacije iNOS enzima sa posledičnim aktiviranjem M1 podtipa makrofaga koji ujedno postaju i glavni izvori NO. S druge strane, u uslovima hroničnog psihološkog stresa zapažena je smanjena produkcija NO. Ovo ide u prilog saznanju da povišeni nivoi glukokortikoida, usled hroničnog psihološkog stresa, smanjuju proizvodnju NO makrofaga (*Lim i sar., 2007*). Odnos između makrofaga i NO je višestruk, a NO je svakako označen kao jedan od molekula posredstvom kojeg makrofagi regulišu imuski odgovor, popravku tkiva i komunikaciju između imunskih ćelija.

#### **1.4.3. Azot - monoksid i MSC**

NO je molekul pomoću kojeg MSC ispoljavaju svoju imunomodulatornu funkciju (*Gupta i sar., 2007*). Tako rezultati različitih istraživanja pokazuju da MSC ispoljavaju svoje dejstvo putem NO. NO produkovan od strane MSC suprimira T ćelije (*Sato i sar., 2006*). Takođe, pokazalo se da MSC posredstvom NO suprimira imunološki odgovor nakon transplantacije organa (*Ren i sar., 2008*). Značaj NO i njegovo posredovanje u dejstvu MSC pokazan je i na modelu ishemijskog miokarda gde je pokazano da eNOS promoviše migraciju MSC u ishemijskom miokardu (*Li N i sar., 2009*). S druge strane, pokazalo se da NO može suprimirati proliferaciju i migraciju MSC sugerišući na njegovu ulogu u zaustavljanju MSC na ciljnoj lokaciji (*Fuseler i sar., 2012*). NO takođe može delovati kao agens koji indukuje ranu diferencijaciju MSC i priprema ih za dalju fenotipsku diferencijaciju (*Fuseler i sar., 2016*). Postoje pak i istraživanja koja pokazuju da NO stvoren putem iNOS dovodi do apoptoze MSC (*Li X i sar., 2019*).

Iako su istraživanja *in vitro* pokazala da kondicionalni medijum MSC suprimira ekspresiju iNOS u makrofagima (*Jin i sar., 2022*), kao i da MSC posredstvom aktivnosti iNOS enzima dovode do ekspanzije i diferencijacije CD11b ćelija iz koštane srži, što dovodi do bržeg oporavka hematopoeznog sistema (*Trento i sar., 2017*), uloga ovog molekula u interakciji makrofaga i MSC tokom SE još uvek nije ispitana.

### **1.5. PURINERGIČKA SIGNALIZACIJA I VANĆELIJSKI NUKLEOTIDI**

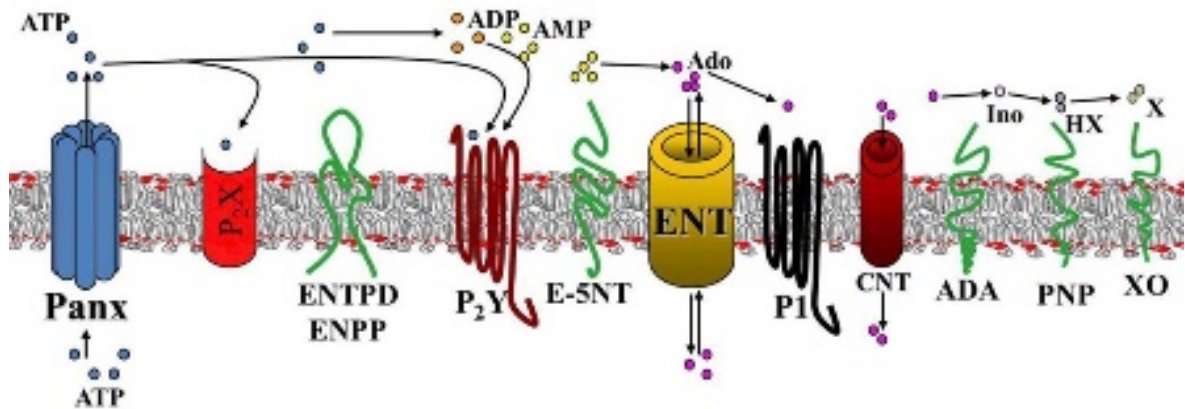
Purinergička signalizacija predstavlja izuzetno važan mehanizam komunikacije između ćelija. Ova signalizacija zavisi od prisustva vanćelijskih nukleotida kao što su adozin trifosfat (ATP) i njegovog metabolita adozina, koji igraju ključnu ulogu u regulaciji različitih fizioloških i patoloških procesa (*Giuliani i sar., 2019*). ATP je označen kao glavni izvor energije u ćelijama i ima ključnu ulogu u biosintezi, aktivnom transportu i procesima pokretljivosti ćelija. Nakon oslobađanja iz ćelije, ATP deluje autokrino i parakrino vezivanjem za purinske P2 receptore. Postoje dve grupe P2 receptora označenih kao P2X i P2Y. Ova podela je izvršena na osnovu strukture, funkcije i farmakoloških osobina receptora. Do sada je identifikovano sedam P2X receptora (P2XR1-7) i osam P2Y receptora (P2Y 1, 2, 4, 6, 11, 12, 13 i 14). P2X receptori su ligand-zavisni jonski kanali, dok su P2Y receptori vezani sa G-proteinom. Vezivanjem ATP-a za

ove receptore dolazi do aktivacije različitih signalnih puteva uključujući adenilat ciklazu, fosfolipazu C i aktivaciju jonskih kanala (*Burnstock, 2007*). U fiziološkim, a naročito u patofiziološkim procesima, značajnu ulogu igra P2X7R. Ovaj receptor predstavlja kanal za prolaz  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$  i  $\text{Na}^{+}$  (*North, 2016*) i aktivira se u trajanju od milisekunde, dok u uslovima narušene homeostaze može biti aktivan i nekoliko sekundi što dovodi do stvaranja neselektivne pore u ćelijskoj membrani (makropore) koja omogućava prolazak molekula veličine do 900 Da (*Harkat i sar., 2017*). Aktivacija P2X7R dovodi do mnoštva efekata, uključujući proliferaciju i diferencijaciju ćelija (*Monif i sar., 2010; Massicot i sar., 2013*), oslobađanja proinflammatory medijatora (*Rissiek i sar., 2015*) i aktivacije metaboličkih puteva kao što je PI3K/Akt/GSK-3 koji je povezan sa regulacijom onkogena (*Orioli i sar., 2017*) i progresijom tumora.

Nakon izlaska iz ćelije molekul ATP ima kratak životni vek zahvaljujući prisustvu enzima koji ga razgrađuju. Enzimi uključeni u metabolizam ATP-a su ekto-nukleotid 5'-trifosfat difosfohidrolaze 1 (ENTP-daza 1, CD39) i ekto-5'-nukleotidaza (E-5NT, CD73). Enzim CD39 hidrolizuje ATP stvarajući ADP zatim i AMP. Ovaj enzim je najpre opisan kao aktivator limfocita i, pored uloge u hidrolizi ATP-a, može imati i ulogu u ćelijskoj adheziji. Molekul CD73, koji je još označen kao površinski marker limfocita, prisutan je na membranama skoro svih ćelija, hidrolizuje AMP i dovodi do stvaranja adenozina.

Adenozin svoje dejstvo ispoljava kao vanćelijski nukleozid vezivanjem za receptore označenim kao P1. P1 receptori su podeljeni na ADORA1, ADORA2A, ADORA2B i ADORA3 (*Burnstock, 2007*). Tokom različitih patofizioloških procesa dolazi do nagomilavanja adenozina, što za posledicu ima aktivaciju ADORA2B receptora. Aktiviranje receptora posredstvom adenozina dovodi do razvoja antiinflammatory i imunosupresivnih odgovora (*Haskó i Cronstein, 2013*), čiji je cilj stimulacija obnavljanja homeostaze tkiva. Adenozin svoje imunosupresivno dejstvo ispoljava delovanjem na ćelije imunskog sistema poput NK ćelija, T i B limfocita, monocita, makrofaga i dedritičnih ćelija. Pored toga, aktivacijom adenozinskih receptora povećava se aktivnost antioksidativnih enzima, a smanjuje proizvodnja reaktivnih kiseoničnih vrsta (*Ramkumar i sar., 2001*). Adenozin se iz vanćelijskog prostora uklanja delovanjem enzima ekto-adenozin deaminaze (ADA) i purin fosforilaze (PNP) pri čemu nastaje inozin (Ino), koji se zatim konvertuje do hipoksantina i ksantina. Deo adenozina se uklanja pomoću transportera koji adenozin unose u ćeliju (ekvilibrativni nukleozidni transporteri (ENT) i koncentrativni nukleozidni transporteri (CNT) (*Parabucki, 2013*) (**Slika 1.6**).

## Vanćelijski prostor



## Unutarćelijski prostor

**Slika 1.6.** Šematski prikaz učesnika purinergičke signalizacije. Preuzeto iz: Doktorska disertacija Ana Parabucki. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu. 2013.

Aktivacija P2 receptora ATP-om dovodi do ćelijskog odgovora koji je često suprotan efekat od ćelijskog odgovora izazvanog aktivacijom P1 receptora adenozinom, zbog čega je aktivnost enzima koji učestvuju u metabolizmu ovih molekula veoma bitna prilikom kontrole fizioloških i patoloških procesa. Tokom hroničnog psihološkog stresa dolazi do povećanog oslobađanja ATP u nervnom sistemu, ali i u različitim tkivima/organima kao odgovor na opasnost. Kako ATP zajedno sa svojim metabolitom adenozinom ima mogućnost kontrole različitih procesa u organizmu, pretpostavka je da posreduje i u interakciji makrofaga sa MSC tokom SE.

### 1.5.1. Purinergička signalizacija i eritrocitopoeza

Purinergička signalizacija i vanćelijski nukleotidi utiču na hematopoezu počevši od regulacije homeostaze HSC, njihove diferencijacije, mobilizacije i proliferacije (Rossi i sar., 2012). Delovanjem ATP-a dolazi do povećane migracije HSC, pri čemu je pokazano da vanćelijski nukleotidi modulišu migraciju HSC u prisustvu CXCL12. Oni stimulišu migraciju HSC prema gradijentu CXCL12, dok istovremeno sprečavaju smanjenje ekspresije CXCR4 kod migrirajućih ćelija (Rossi i sar., 2007). Za razliku od ATP-a, adenzin pokazuje suprotan efekat i inhibira migraciju hematopoetskih progenitronih ćelija. Rezultati novijih istraživanja ukazuju na značaj enzima CD39 i CD73 u migraciji ovih ćelija. Tako je pokazana povećana mobilizacija HSC kod CD73 *knockout* miševa (Adamiak i sar., 2018).

Korišćenjem *in vitro* i *in vivo* pristupa, Barnosa i saradnici (2011) su pokazali da ATP utiče na diferencijaciju HSC, dovodeći do smanjenog broja nezrelijih HSC, CMP i GMP ćelija u koštanoj srži i povećanog broja zrelijih ćelija, promovišući na taj način mijeloidnu diferencijaciju. ATP se pokazao i značajnim tokom terminalne eritroidne diferencijacije i enukleacije u uslovima hipoksije (Goto i sar., 2019).

S obzirom da adenzinski signalni putevi igraju ključnu ulogu u homeostazi tkiva regulacijom aktivacije, diferencijacije ćelija, kao i ćelijskog ciklusa, rađena su i istraživanja koja



ukazuju na značaj ovog vanćelijskog nukleotida tokom procesa eritrocitopoeze. Pokazano je da je adenzin neophodan za optimalnu funkciju zrelih eritrocita i za diferencijaciju progenitora nakon njegovog unošenja u ćeliju putem ENT1 (*Mikdar i sar., 2021*). Vanćelijski nivo adenozina je veoma nizak u bazalnim uslovima zbog strogo regulisane ravnoteže između njegove proizvodnje iz ATP/AMP od strane ektonukleotidaza (CD39, CD73), brzog ulazaka u ćelije posredstvom nukleozidnih transportera i degradacije od strane adenozin deaminaza (*Schrier i sar., 2001; Fredholm, 2007*). Međutim, vanćelijski nivoi adenozina mogu biti brzo povišeni usled oslobađanja adenozina iz oštećenih ćelija ili u odgovoru na hipoksiju, upalu ili povredu tkiva (*Fredholm, 2007; Burnstock i Verkhatsky, 2012*). Povećani nivoi vanćelijskog adenozina aktiviraju membranski receptor ADORA2B u eritrocitima. Aktivacija ovih receptora dovodi do smanjene aktivnosti ENT1 eritrocita, što za posledicu ima smanjeni unos adenozina u ćelije i njegovu akumulaciju u plazmi, što uzrokuje dalju aktivaciju adenozinskih receptora (*Song i sar., 2017*). ADORA2B su povišeno ekspimirani na zajedničkim megakariocit-eritroidnim progenitorima i rezultati nekoliko istraživanja ukazuju na značaj ovih receptora tokom SE. Naime, aktivacijom ovog receptora dolazi do metaboličkog reprogramiranja koje je praćeno preuzimanjem glukoze i ekspanzijom eritroidnih progenitora u koštanoj srži i slezini miševa. Takođe, pokazano je da ovo metaboličko reprogramiranje, koje je nastalo aktivacijom ADORA2B receptora, zavisi od transkripcionog faktora HIF1 $\alpha$  (*Liu i sar., 2018*). Aktivnost ADORA2B određuje i sintezu 2,3 bisfosfoglicerata (2,3-BPG), koji pak određuje afinitet vezivanja kiseonika za hemoglobin. U uslovima stresa i povećane koncentracije adenozina dolazi do povećane sinteze 2,3 BPG i posledično većeg kapaciteta za oslobađanje O<sub>2</sub> u perifernim tkivima (*Liu, 2017*).

Adenzin reguliše eritrocitopoezu i kontrolisanjem nivoa EPO jer njegovim delovanjem na ćelije bubrega dolazi do povećane proizvodnje ovog hormona (*Paul i sar., 1988*). Najnovija istraživanja pokazuju da adenzin inhibira eritrocitopoezu. Aktivacija adenozinskih receptora ADORA2B i ADORA3 dovodi do aktivacije p53 gena, što pak dovodi do zaustavljanja ćelijskog ciklisa, čime se remeti terminalna eritroidna diferencijacija. Pored toga, adenzin promovise diferencijaciju eritro-mijeloidnih progenitora ka mijeloidnoj lozi (*Mikdar i sar., 2023*).

### 1.5.2. Purinergička signalizacija i makrofagi

U uslovima narušene homeostaze oštećene ćelije oslobađaju veću količinu ATP-a koji deluje kao signal „pronađi me” i dovodi do aktivacije makrofaga (*LazarowskiER, 2012*). Na makrofagima su identifikovani P2X7R koji imaju veliku provodljivost (*Surprenant i sar., 1996*). Aktivacijom ovih recetora stimuliše se migracija ćelija. Pri tome, sami makrofagi, usled aktivacije kaskade komplemenata, oslobađaju ATP, koji zatim deluje autokrino, dovodeći do aktivacije NLRP inflamazoma i sekrecije IL-1b i IL-18 (*Piccini i sar., 2008; Asgari i sar., 2013*). Rezultati pokazuju da je receptor P2X7 potreban za maksimalnu aktivaciju mitogenom aktiviranih proteina (MAP kinaza), kinaza ERK1 i ERK2, nuklearnog faktora (NF)- $\kappa$ B, kao i za povećanje ekspresije inducibilnog oblika sinteze azot-monoksida (iNOS) tokom stimulacije makrofaga lipopolisaharidima (LPS) (*Hu i sar., 1998*). Za razliku od ATP-a, adenzin šalje signal „smiri se” i na taj način koordiniše signale u zapaljenskom procesu sprečavajući regrutaciju i aktivaciju ćelija imunog sistema. Adenzin je pokazao sposobnost indukovanja polarizacije makrofaga prema M2 fenotipu (*Csoka i sar., 2012*).

Istraživanja su pokazala da LPS-om aktivirani monociti nakon delovanja adenozina prestaju da luče TNF- $\alpha$ , IL-6 i IL-8, pri čemu svoje antiinflamatorno dejstvo adenzin ispoljava delovanjem preko receptora ADORA3 (*Sajjadi i sar., 1996*). Slična uloga je zabeležena i za adenozinski receptor ADORA2A. Miševi bez adenozinskog receptora ADORA2A pokazuju obimna oštećenja tkiva i produženu zapaljensku reakciju na male doze inflamatornih stimulusa u različitim modelima bolesti (*Ohta i Sitkovsky, 2001*). Imajući u vidu saznanja o suprotnim efektima adenozina i ATP-a na aktivaciju makrofaga, može se pretpostaviti da su baš ovi vanćelijski nukleotidi odgovorni za

pružanje ključnih signala neophodnih za polarizaciju makrofaga. Sveopšte uzev, manipulacija nivoa ATP i adenzina u mikrookruženju tkiva bi mogla predstavljati moćan mehanizam za usmeravanje plasticiteta makrofaga, a samim tim i značajan potencijal za terapijske intervencije.

### 1.5.3. Purinergička signalizacija i MSC

MSC imaju kapacitet da regulišu homeostazu tkiva sekrecijom imunosupresivnih faktora, citokina i faktora rasta i diferencijacije čime doprinose u smirivanju upalnih procesa. Činjenica da MSC oslobađaju vanćelijske nukleotide i da poseduju njihove receptore ukazuje na značaj vanćelijskih nukleotida u održavanju funkcije ovih ćelija. MSC spontano oslobađaju ATP promovišući aktivaciju transkripcionih faktora koji su uključeni u diferencijaciju ćelija, pri čemu i same sadrže receptore P2X i P2Y i reaguju na vanćelijski ATP. Aktiviranjem ovih receptora inhibira se proliferacija mezenhimalnih matičnih ćelija iz koštane srži, a stimuliše se njihova migracija (*Coppi i sar., 2007; Ferrari i sar., 2011*).

Pored sposobnosti oslobađanja ATP-a i posedovanja receptora za ATP, MSC imaju sposobnost oslobađanja i adenzina, pri čemu profil receptora koji poseduju za adenzin zavisi od njihovog stadijuma diferencijacije. ADORA2A se dominantno nalaze na nediferenciranim ćelijama tokom osteogeneze (*Gharibi i sar., 2011*). Deo vanćelijskog adenzina potiče od hidrolize ATP-a pod dejstvom aktivnosti CD39 i CD73 koji su u izobilju prisutne u plazma membrani MSC (*Sattler i sar., 2011*). Aktivacija adenzinskih P1 receptora na MSC je veoma značajna tokom regeneracije tkiva i zarastanja rana, s obzirom da posreduje u stimulaciji lokalnih mehanizama popravke i akumulaciji endotelnih progenitornih ćelija (*Katebi i sar., 2009*). Oslobođeni adenzin preko svojih ADORA2A receptora inhibira proliferaciju T-limfocita ispoljavajući svoj antiinflamatorni efekat (*Hasko i Pacher, 2008*). Tako su rađena istraživanja u kojima se dokazao ovaj antiinflamatorni efekat adenzina dodavanjem antagonista ADORA2A receptora ili inhibitora CD39. Blokodom produkcije i dejstva adenzina na ovaj način značajno je suprimiran njegov antiinflamatorni efekat (*Sattler i sar., 2011*).

Vanćelijski nukleotidi su označeni kao faktori koji određuju sudbinu MSC, ali često je teško odvojiti efekte ATP od efekata adenzina, a čini se da na njihovu funkciju utiče i izvor/ poreklo ćelija. ATP se može smatrati i adipogenim i osteogenim faktorom, dok adenzin, isključuje adipogenu diferencijaciju i ima pretežno osteogeno dejstvo. Adenzin ispoljava osteogeno dejstvo uglavnom preko ADORA2B receptora, pri čemu se njegovi efekti poništavaju farmakološkom inhibicijom ovog podtipa receptora, dok se kod prekomerne ekspresije ADORA2B receptora indukuje sinteza gena povezanih sa osteoplastima (*Cavaliere i sar., 2015*) U skladu sa tim, istraživanja *in vivo* su pokazala da se kod miševa kojima nedostaje gen za enzim CD73 razvija osteopenija usled smanjene osteogene diferencijacije (*Takedachi i sar., 2012*).



## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Ispitivanje uticaja deplecije makrofaga na proces eritrocitopoeze tokom hroničnog stresa;
2. Ispitivanje uticaja deplecije makrofaga na karakteristike i potencijal diferencijacije MSC izolovanih iz koštane srži i slezine hronično stresiranih miševa;
3. Ispitivanje uloge NO u interakcijama makrofaga i MSC izolovanih iz koštane srži i slezine miša;
4. Ispitivanje uloge vanćelijskih nukleotida i purinergičnog signalnog sistema u interakcijama makrofaga sa MSC izolovanim iz koštane srži i slezine miša.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. MATERIJAL

##### 3.1.1. Eksperimentalne životinje

Za ispitivanje uloge MSC tokom SE i značaj interakcija između MSC i makrofaga u regulaciji eritrocitopoeze tokom hroničnog stresa korišćeni su miševi visokorodnih sojeva Balb/c starosti 6-8 nedelja. Eksperimentalne životinje su preuzete sa Odeljenja za uzgoj laboratorijskih i eksperimentalnih životinja Instituta za medicinska istraživanja Vojnomedicinske akademije u Beogradu. Čuvane su pod standardnim uslovima na temperaturi od 25°C, sa slobodnim pristupom vodi i hrani i svetlosnom režimu - 12h svetlosti i 12h tame. Istraživanja su odobrena od strane Etičke komisije za zaštitu dobrobiti oglednih životinja Instituta za medicinska istraživanja, Instituta od nacionalnog značaja Univerziteta u Beogradu (br. O 055-1/19) i Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede, Uprave za veterinu (br. 19-01-511412017-09).

##### 3.1.2. Čelijske linije

###### 3.1.2.1. RAW264.7 ćelijska linija

Kako bi ispitali mehanizme interakcije makrofaga sa MSC tokom SE *in vitro*, korišćena je ćelijske linije makrofaga RAW264.7. RAW264.7 je monocitno/makrofagna ćelijska linija izolovana 1978. godine iz ascita tumora miševa soja Balb/c indukovanoj infekcijom Abelsonovim virusom leukemije miševa (A-MuLV) i Molonijevim virusom leukemije miševa (Mo-MuLV) kao pomoćnim virusom (*Raschke i sar., 1978*). Proizvedena je u American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). Čelije su kultivisane na temperaturi od 37°C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> i 3% O<sub>2</sub>.

###### 3.1.2.2. Mišje MSC

Tokom ove doktorske disertacije korišćene su MSC izolovane iz slezine i koštane srži miša Balb/c soja, starosti 6-8 nedelja. Za ispitivanje interakcija makrofaga sa MSC *in vitro* korišćene su MSC izolovane iz koštane srži i slezine netretiranih životinja. Za ispitivanje uticaja deplecije makrofaga na karakteristike i potencijal diferencijacije MSC korišćene su MSC izolovane iz koštane srži i slezine tretiranih životinja. Čelije su kultivisane na temperaturi od 37°C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> i 3% O<sub>2</sub>.

##### 3.1.3. Medijumi

Za kultivaciju RAW264.7 ćelija korišćen je RPMI-1640 medijum (RPMI engl. Roswell Park Memorial Institute, Capricorn Scientific, Germany) obogaćen 10% fetalnim serumom govečeta (FBS, engl. Fetal Bovine Serum, Capricorn Scientific, Germany), sa dodatkom 100 jedinica/ml (U/ml) penicilina i streptomicina ((u finalnoj koncentraciji od 1% P/S) (Gibco, Life Technologies, USA). Standardni hranljivi medijum u ovom sastavu korišćen je za rast pomenutih ćelija i u različitim fazama eksperimenata.

MSC dobijene iz koštane srži miša kultivisane su u DMEM medijumu sa niskim procentom glukoze (1g/L) (DMEM engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium Low Glucose, Capricorn

Scientific, Germany) sa 15% fetalnog seruma govečeta (FBS, engl. Fetal Bovine Serum, Mesenchymal Stem Cell-Qualified, Gibco, USDA) sa dodatkom 100 jedinica/ml (U/ml) penicilina i streptomicina (finalno 1% P/S) (Gibco, Life Technologies, USA). DMEM sa visokim procentom glukoze (4,5g/l) (DMEM eng. Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose, Capricorn Scientific, Germany) sa 15% FBS sa dodatkom 100 jedinica/ml (U/ml) penicilina i streptomicina (finalno 1% P/S) (Gibco, Life Technologies, USA) korišćen je za kultivaciju MSC dobijenih iz slezine miša. Ovo je sastav standardnog, hranljivog medijuma koji je korišćen za rast pomenutih ćelija i pojedine eksperimente ili njihove faze.

Medijum za osteogenu diferencijaciju se sastojao od standardnog medijuma kojem je dodato 10nM deksametazona (Sigma-Aldrich, USA), 50  $\mu$ M askrobinske kiseline (Sigma-Aldrich) i 10 mM  $\beta$ -glicerofosfata (AppliChem).

Medijum za adipogenu diferencijaciju se sastojao od standardnog medijuma kojem je dodato 1  $\mu$ M deksametazona (Sigma-Aldrich), 10  $\mu$ g/ml insulina (Sigma-Aldrich) i 100  $\mu$ g/ml 3-izobutil-1-metilksantin (IBMX, Sigma-Aldrich).

## 3.2. EKSPERIMENTALNI DIZAJN

### 3.2.1. *In vivo*

Odrasli mužjaci Balb/c starosti 6-8 nedelja podvrgnuti su hroničnom psihološkim stresu po modelu *restraint* stresa. Ovaj model se koristi za indukovanje stresa kod laboratorijskih miševa i pokazao se kao pouzdan za indukovanje različitih neurobioloških i imunoloških promena povezanih sa stresom (*Frick i sar., 2009; Hwang i sar., 2020*.. Model *restraint* stesa izvođen je stavljanjem životinja u ventilirane tube od 50 ml kako bi se ograničila njihova pokretljivost. Efekat hroničnog psihološkog stresa dobijen je ponavljanjem *restraint* stresa sedam dana uzastopno u trajanju od 2h dnevno. Uklanjanje makrofaga vršeno je uz pomoć klodronat-lipozoma (Liposome Clodronate, Liposom BV, The Netherlands) u dozi od 1mg/1g telesne mase miša. Miševima je lipozom klodronat dat više puta u toku eksperimenta, intraperitonealno, najpre dva dana pre prvog izlaganja *restraint* stresu, a zatim na svaki treći dan radi uklanjanja novonastalih makrofaga.

Životinje su nasumično podeljene u pet homogenih grupa:

1. Kontrola, netretirane životinje;
2. Životinje podvrgnute *restraint* stresu sedam dana uzastopno;
3. Životinje koje su primile lipozom klodronat dva dana pre eutanazije;
4. Životinje koje su primile lipozom klodronat dva dana pre početka izlaganja *restraint* stresu, a zatim 30 minuta pre *restraint* stresa na svaki treći dan;
5. Životinje koje su primile kontrolni lipozom dva dana pre početka izlaganja *restraint* stresu, a zatim 30 minuta pre *restraint* stresa na svaki treći dan.

Miševima je neposredno pre eutanazije uzeta krv iz orbitalnog sinusa. Eutanazija je vršena metodom cervikalne dislokacije, nakon čega je uzeta slezina i koštana srž radi postavljanja ćelijske kulture i dalje analize izolovanog materijala. Ispitivani je efekat hroničnog stresa i deplecije makrofaga na rast i diferencijaciju CFU-E, BFU-E i eritroblasta u koštanoj srži i slezini kao i na karakteristike i potencijal diferencijacije MSC izolovanih iz koštane srži i slezine miša. U ukupnim ćelijama koštane srži određena je ekspresija različitih izoformi enzima azot monoksid sintaze (eNOS, iNOS, nNOS), zatim molekula CD73, kao i adenozijskih receptora (ADORA2A i ADORA2B), dok je u ćelijama slezine određena ekspresija BMP4, TLX1 i MCP-1. U ovim ćelijama odrađena je i koncentracija vanćelijskog ATP-a i specifična aktivnost CD39 i CD73 enzima.

### **3.2.2. In vitro**

Radi ispitivanja mehanizama interakcija MSC sa makrofagima tokom hroničnog stresa u *in vitro* uslovima rađena je postavka ko-kulture MSC izolovanih iz slezine i koštane srži miša, sa mišjom linijom makrofaga RAW264.7. Navedene ko-kulture su tretirane kortikosteronom (Sigma-Aldrich, USA Cat. No. 27840) u dozi od 400 ng/ml i EPO (Recombinant Mouse Erythropoietin, Biolegend, Cat. No. 587602) u dozi od 400 pg/ml u trajanju od 24h, kao najznačajnijim medijatorima SE. Za upoređivanje korišćene su monokulture ovih ćelija kultivisane pod istim uslovima.

#### **3.2.2.1. Ispitivanje uloge NO u interakcijama makrofaga i MSC**

U cilju ispitivanja uloge NO u interakcijama MSC i makrofaga određena je koncentracija NO<sub>x</sub> i ekspresija azot-monoksid sintetaze (nNOS, iNOS, eNOS) u ko-kulturama tretiranim kortikosteronom (400 ng/ml, 24h) i EPO (400 pg/ml, 24h). Rezultati su poređeni sa navedenim parametrima dobijenim u monokulturama ovih ćelija pod istim uslovima. Upotrebom neselektivnog inhibitora sinteze NO (L-NAME, Sigma-Aldrich, Cat. No. N5751-1G) u finalnoj koncentraciji od 1mM, 30 minuta pre tretmana EPO i kortikosteronom ispitan je uticaj blokade sinteze NO na produkciju ATP i adenozina, kao i na ekspresiju komponenti purinergičkog signalnog sistema (CD73, CD39, P2X7R i ADORA2B) u ko-kulturama u odnosu na monokulture.

#### **3.2.2.2. Ispitivanja uloge vanćelijskih nukleotida i purinergičkog signalnog sistema u interakcijama makrofaga sa MSC**

U cilju ispitivanja uloge vanćelijskih nukleotida i purinergičkog signalnog sistema u interakcijama makrofaga sa MSC, praćena je koncentracija ATP i adenozina, ekspresija enzima CD73 i CD39, receptora P2X7 i ADORA2B, u ko-kulturama tretiranim kortikosteronom (400 ng/ml, 24h) i EPO (400 pg/ml, 24h) i upoređene su sa navedenim parametrima dobijenim na monokulturama ovih ćelija pod istim uslovima. Upotrebom farmakološkog inhibitora ekto 5' nukleotidaze - CD73 (APCP, Tocris Bioscience, UK, Cat No. 3633) u finalnoj dozi 100μM, 30 minuta pre tretmana eritropoetinom i kortikosteronom ispitan je uticaj blokade molekula CD73 na produkciju NO<sub>x</sub> i ekspresiju NOS-a (nNOS, iNOS, eNOS) u ko-kulturama makrofaga i MSC i upoređen je sa navedenim parametrima dobijenim na monokulturama ovih ćelija pod istim uslovima.

### **3.3. METODE**

#### **3.3.1. Hematološki parametri**

Neposredno pre žrtvovanja miševa uzeta je krv iz orbitalnog sinusa svake životinje uz pomoć MiniCollect® mikro epruvete sa antikoagulasom. Broj eritrocita određen je u hemocitometru, dok je koncentracija hemoglobina (Hb) merena poređenjem intenziteta boje sa bojom standardnog rastvora poznate koncentracije pomoću metode po Drapkinu (0,1% natrijum bikarbonata, 0,005% kalijum cijanida i 0,02% kalijum fericijanida). Hemoglobin se uz prisustvo Drapkingovog reagensa prevodi u cijanmethemoglobin dajući različit intezitet boje u zavisnosti od koncentracije hemoglobina. Intenzitet boje je očitao na spektrofotometru pri talasnoj dužini od 540nm. Hematokrit (Hct) je određen nakon centrifugiranja uzoraka krvi u heparinizovanim mikrokapilarnim epruvetama. Srednja vrednost zapremine eritrocita -MCV (engl. mean cell volume), koncentracija hemoglobina u eritrocitu-MCHC (engl. mean corpuscular hemoglobin concentration), količina hemoglobina u eritrocitu- MCH (engl. mean corpuscular hemoglobin) i širina distribucije eritrocita- RDW (engl. red cell distribution width) izračunate su korišćenjem sledećih formula:

MCV= hematokrit/broj eritrocita

MCHC=koncentracija hemoglobina /hematokrit

MCH= koncetracija hemoglobina/broj eritrocita

RDW= SD/MCV x 100

### **3.3.2. Čelije i ćelijske kulture**

#### **3.3.2.1. Izolacija ćelijske suspenzije koštane srži i slezine**

Nakon žrtvovanja cervikalnom dislokacijom uzrokovana je slezina, oba femura i obe tibije. Čelijska suspenzija slezine dobijena je homogenizacijom tkiva kroz čeličnu mrežicu uz ispiranje sa 5ml odgovarajućeg medijuma (DMEM sa 5% FBS i 1%P/S), dok je ćelijska suspenzija koštane srži dobijena ispiranjem koštane srži uz pomoću igle i šprica sa 2ml odgovarajućeg medijuma (DMEM sa 5% FBS i 1%P/S). Broj ćelija određen je korišćenjem Türk-ovog reagensa i na osnovu njega je podešena odgovarajuća koncentracija ćelija za postavljanje kultura, protočnu citometriju i izolaciju RNK.

#### **3.3.2.2. Izolacija opredeljenih matičnih ćelija eritroidne loze BFU-E i CFU-E**

Detekcija opredeljenih matičnih ćelija eritroidne loze vrši se na osnovu njihovih funkcionalnih osobina. Naime svaka od ovih ćelija je sposobna da stvori koloniju tako da broj stvorenih kolonija odgovara broju ovih ćelija. U cilju detekcije opredeljenih ćelija za eritroidnu lozu, BFU-E i CFU-E, korišćena je čvrsta podloga od metilceluloze obogaćena odgovarajućim citokinima. Za kultivaciju BFU-E i CFU-E korišćen je Mouse Methylcellulose Complete Media (R&D Systems, HSC007) koji obezbeđuje optimalan rast, kako CFU-E kolonija tako, i BFU-E kolonija, a koji pored metilceluloze sadrži još i rekombinantni human Stem Cell Factor (SCF) (50 ng/ml), rekombinantni mišji IL6 (10 ng/ml), rekombinantni mišji IL3(10 ng/ml), rekombinantni humani EPO (5 IU/ml) i humani transferin (200 µg/ml).

U 1ml Mouse Methylcellulose Complete Mediumu napravljena je suspenzija od  $2 \times 10^5$  ćelija koštane srži i  $4 \times 10^5$  ćelija slezine. Za svaku eksperimentalnu grupu postavljene su kulture ćelija u duplikatu u plastičnim Petri posudama za kulturu tkiva prečnika 35 mm i inkubirane na temperaturi 37°C, u atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> i 100% vlažnosti. Nakon 4 dana inkubacije skorovane su CFU-E - formirane kolonije dok su BFU-E kolonije skorovane nakon 7 dana inkubacije. Skorovanje je rađeno pod inverznim mikroskopom.

#### **3.3.2.3. Izolacija MSC iz koštane srži i slezine**

Ukupne ćelije koštane srži i slezine dobijene po prethodno opisanom načinu postavljene su u medijum za ekspanziju MSC, DMM Low Glucose sa 15% MSC Qualified FBS i 1% P/S za ćelije koštane srži i DMEM Hight Glucose sa 15% MSC Qualified FBS i 1% P/S za ćelije slezine. Čelije su primarno postavljene u ploče sa 6 otvora površina 9,6cm<sup>2</sup> u duplikatu,  $10 \times 10^6$ /ml za ćelije koštane srži i  $40 \times 10^6$ /ml za ćelije slezine. Medijum je prvi put zamenjen nakon 4h, a zatim sledeća 72 sata na svakih 12h. Medijum je zatim menjan na svaka 2-3 dana. Čelije su kultivisane na temperaturi od 37°C, u atmosferi sa 5%CO<sub>2</sub> i 3% O<sub>2</sub> i relativnom vlažnošću 100%. Mišje MSC izdvojene su na osnovu sposobnosti adhezije za plastiku posude za tkivne kulture, dok su neadherentne hematopoetske ćelije odstranjene prilikom promene medijuma. Nakon 14 dana ćelije su postigle konfluentnost od 90%-100% i bile su pasažirane. Najpre su isprane PBS-om (eng.

Phosphate-buffered saline, Capricorn Scientific, Germany), a zatim upotrebom 0,25% tripsina sa 1mM EDTA (Gibco, Life Technologies, USA) inkubiranjem 2-5 minuta na sobnoj temperaturi ćelije su odlepljene. Aktivnost tripsina je neutralisana dodavanjem medijuma za kultivaciju nakon čega su ćelije centrifugirane 310g 8 minuta. Vijabilnost i broj ćelija određen je uz pomoć Tripa blue reagensa i ćelije su zasejane u flask od 25cm<sup>2</sup>, 0,3x10<sup>6</sup>/ml. Karakterizacija, diferencijacija i klonogeni potencijal ovih ćelija procenjeni su nakon treće pasaže ćelija koštane srži i četvrte pasaže ćelija slezine. Karakterizacija je određena na osnovu ekspresije gena vimentin, fibronektin,  $\alpha$ -SMA, CD29 i CD105 kao pozitivnih markera mišjih MSC i CD45 kao negativnog markera.

#### **3.3.2.4. Osteogena diferencijacija**

Ćelije koštane srži i slezine postavljane su u ploču sa 96 otvora i kultivisane u standardnom medijumu u uslovima hipoksije (temperaturi od 37°C, u vlažnoj atmosferi sa 5% CO<sub>2</sub> i 3% O<sub>2</sub>). Nakon postizanja subkonfluentnosti ćelije su dalje kultivisane u medijumu za osteogenu diferencijaciju (standardnog medijuma kojem je dodato 10nM deksametazona, 50 $\mu$ M askorbinske kiseline, 10mM  $\beta$ -glicerofosfata) u trajanju od 10 dana pri čemu je medijum menjan na svaka 2-3 dana. Kao dokaz osteogene diferencijacije, određivano je prisustvo alkalne fosfataze u ovim ćelijama. Ćelije su fiksirane 3,5% formaldehidom u etanolu u trajanju od 30 sekundi na sobnoj temperaturi, a potom im je dodavan hromogen za alkalnu fosfatazu, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)/nitro blue tetrazolium (NBT). Aktivnost alkalne fosfataze u ćelijama analizirana je svetlosnim invertnim mikroskopom (Olimpus, Japan). Kvantifikacija osteogene diferencijacije određena je na osnovu analize ekspresija gena koji su karakteristični za osteogenu diferencijaciju, osteopontina i RUNX2.

#### **3.3.2.5. Adipogena diferencijacije**

Ćelije koštane srži i slezine postavljane su u ploču sa 96 otvora i kultivisane u standardnom medijumu u uslovima hipoksije. Nakon postizanja subkonfluentnosti ćelije su dalje kultivisane u medijumu za adipogenu diferencijaciju (standardnog medijuma kojem je dodato 1 $\mu$ M deksametazon, 10 $\mu$ g/ml insulina i 100 $\mu$ g/ml 3-izobutil-1-metilksantin-IBMX) u trajanju od 21 dan. Medijum je menjan na svaka 2-3 dana. Ćelije su nakon 21 dana bojene Oil red bojom i posmatrane svetlosnim invertnim mikroskopom kako bi se dokazalo prisustvo unutraćelijskih lipidnih kapi kao dokaz adipogene diferencijacije. Kvantifikacija adipogene diferencijacije je odrađena na osnovu ekspresije gena za adipogenezu, PPAR $\gamma$  i C/EBP $\beta$ .

#### **3.3.2.6. CFU-F test**

CFU-F test je korišćen za određivanje klonogenog potencijala MSC dobijenih iz slezine i koštane srži miša. Ćelije koštane srži/slezine su zasejane u ploču sa šest otvora, površina otvora 9,6cm<sup>2</sup>. Zasejano je 2x10<sup>4</sup> ćelija po otvoru u standardnom medijumu za kultivaciju. Nakon 8 dana inkubacije ćelije su isprane PBSom i fiksirane metanolom u trajanju od 4 minuta i bijene Gimza bojom u trajanju od 10 minuta. Kriterijum za koloniju je podrazumevao grupisanje od minimum 50 ćelija. Analiza je rađena svetlosnim invertnim mikroskopom (Olimpus, Japan).

#### **3.3.2.7. Ko-kultura MSC i makrofaga**

U ploči sa 6 otvora, po otvoru površine 9,6cm<sup>2</sup> ploče u svakom otvoru postavljeno je 3,5x10<sup>4</sup> MSC dobijenih iz koštane srži miša ili MSC dobijenih iz slezine miša u duplikatu. Nakon 72h, koliko je bilo potrebno da se ćelije zalepe za podlogu, dodate su ćelije ćelijske linije RAW264.7 3x10<sup>4</sup> po bunariću. Nakon 24h ćelijske ko-kulture su tretirane eritropoetinom 400 pg/ml i kortikosteronom 400 ng/ml u trajanju od 24h. Kako bi se ispitala uloga NO, tokom ovog procesa ćelijske ko-kulture su 30 minuta pre tretmana kortikosteronom i eritropoetinom tretirane inhibitorom azotmonoksid sintetaze L-NAME u dozi 1mM. Uloga ekto 5' nukleotidaze ispitana je

blokadom CD73 molekula, korišćenjem APCP-a u dozi od 100  $\mu$ M 30 minuta pre tretmana EPO/kortikosteron. Kao kontrole su korišćene ćelije monokulture RAW264.7 i MSC tretirane na isti način.

### 3.3.3. Protočna citometrija

U cilju detekcije i kvantifikacije prekursorskih ćelija eritrocitopoeze i subpopulacije eritroidnih prekursora korišćena je metoda protočne citometrije. Od ukupnog broja ćelija koje su izolovane iz koštane srži i slezine po prethodno opisanom načinu, izdvojeno je po  $1 \times 10^6$  ćelija. Nakon ispiranja u odgovarajućem puferu (engl. phosphate-buffered saline, PBS, –sa 1mM EDTA i 0,2% bovine serum albumin) ćelije su inkubirane sa po 100 $\mu$ l pufera u kome je rastvorena odgovarajuća kombinacija primarnih i izotipskih kontrola antitela konjugovanih sa specifičnim fluorescentnim markerima (**Tabela 2.1**) u trajanju od 45 minuta na +4°C. Nevezana frakcija antitela uklonjena je ispiranjem PBS-om, a uzorci su razblaženi u 500 $\mu$ l PBS nakon čega su očitani na protočnom citometru CyFlow CL (Partec, Nemačka).

**Tabela 2.1.** Antitela primenjena za detekciju i kvantifikaciju prekursorskih ćelija eritrocitne loze protočnom citometrijom

Antitelo (AT)	Razblaženje AT	Proizvođač	Kataloški broj
PE*obeleženo anti-mišje–Ter119	1:100	BD Pharmingen	Cat. No. 553673
PE/Cy7**obeleženo anti-mišje CD71	1:100	BioLegend	Cat. No.113812
PE-obeležena IgG2b $\kappa$ izotipska kontrola	1:100	BD Biosciences	Cat. No. 553989
PE/Cy7-obeleşenIgG2a $\kappa$ izitipska kontrola	1:100	BioLegend	Cat. No. 400521

\*fikoeritrin, \*\*fikoeritrin/cijanin 7

### 3.3.4. Određivanje koncentracije NO

Koncentracije NO u supernatantima kultura i ko-kultura određivana je po Grisovoj (Griess) metodi. Grisov reagens je pripreman mešanjem 0,1% rastvora naftil-etilendiamin-dihidrohlorida u destilovanoj vodi i 1% rastvora sulfanilamida u 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> u odnosu 1:1. Supernatanti koji su pokupljeni 4h nakon postavke ukupnih ćelija koštane srži i slezine radi dobijanja MSC iz tretiranih miševa i supernatanti pokupljeni iz mono- i ko-kultura MSC slezine/koštane srži i RAW264.7 ćelija nakon opisanog tretmana čuvani su na - 20°C do analize. Najpre je odrađena deproteinizacija uzorka korišćenjem 0,3 M NaOH i 10% Zn<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Grisova reakcija rađena je u ploči sa 96 otvora gde je 50  $\mu$ l svakog uzorka supernatanta mešano sa jednakom zapreminom Grisovog reagensa. Nakon toga je usledila inkubacija od 10 minuta na sobnoj temperaturi i određivana je apsorpcija svetlosti talasne dužine 540 nm na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (Micro Plate Reader, RT 6100 Rayto). Koncentracija nitrita je određivana pomoću standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti

apsorpcija očitanih za seriju standardnih rastvora poznate koncentracije NaNO<sub>2</sub>. Koncentracija nitrata se određuje indirektno, tako što se najpre dejstvom VCl<sub>3</sub> nitrati redukuju do nitrita (Mojsilović, 2014).

### 3.3.5. Određivanje vanćelijskog ATP-a

Vanćelijski ATP određen je luminometrijski, korišćenjem komercijalnog kita (CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay). Koncentracija je određene u supernatantu koji je pokupljen 4 sata od postavke ćelijske suspenzije ćelija koštane srži i slezine miša (u pločama sa 6 bunarića, u duplikatu) i supernatantu pokupljenom iz ko-kultura i njihovih kontrola nakon tretmana (u duplikatu). Na 100 μl reagensa dodato je 100 μl supernatanta i nakon mešanja od 2 minuta usledila je inkubacija od 10 minuta. Luminiscencija je očitana korišćenjem Vallac Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin-Elmer Life Science, Val-tham, MA, USA) Naime, enzim luciferaza, u prisustvu Mg<sup>2+</sup> i ATP-a, oksiduje luciferin do oksiluciferina pri čemu dolazi do oslobađanja svetlosti koja je proporcionalna količini ATP-a.

### 3.3.6. Određivanje aktivnosti CD39 i CD73 enzima

Aktivnosti enzima CD39 i CD73 određene su kolorimetrijski (detekcijom neorganskog fosfata kao proizvoda enzimske reakcije) korišćenjem reagensa koji sadrži malahit-zeleno (Baykovi sar. 1988). Malahit-zeleno reagens za detekciju jona neorganskog fosfata dobija se mešanje rastvora A i B neposredno pre upotrebe u odnosu 100:1 (v/v). Rastvor A dobija se mešanjem 0.1% malahit-zeleno oksalata rastvorenog u 3.6 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> i 7.5% amonijum molibdata u H<sub>2</sub>O, u srazmeri 4:1 (v/v). Rastvor B je 11% Tween 20 (w/v). Svi regensi i rastvori u enzimskom eseju napravljeni su korišćenjem dejonizovane vode (miliQ H<sub>2</sub>O, dobijene korišćenjem Direct-Q 3 Water Purification System), kako bi se izbegao pozadinski signal jona fosfata koji se inače nalaze u destilovanoj H<sub>2</sub>O. Od ukupnih ćelija koštane srži izdvojeno je 5x10<sup>5</sup> ćelija, i od ukupnih ćelija slezine 2,5x10<sup>5</sup> ćelija, koje su najpre dva puta isprane u reakcionom medijumu bez fosfata (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 10 mM glukoza, 20 mM HEPES, pH 7.4). Ćelije su zatim inkubirane 5 min. na 37°C u 250 μl reakcionog medijuma, a enzimska reakcija je započela dodavanjem supstrata (ATP ili AMP) i nakon kratkog mešanja na vorteksu, reakciona smeša je inkubirana na 37°C. Nakon isteka vremena inkubacije (10 min za ATP, 30 min za AMP), reakcija je zaustavljena hlađenjem i centrifugiranjem na 1500g, 10 min na +4°C. Supernatant je odmah odvojen i korišćen za određivanje količine neorganskog fosfata (Pi) bojenom reakcijom sa malahit-zeleno reagensom, a talog (ćelije) je osušen i zamrznut za određivanje koncentracije proteina. Supernatanti su naneti na ploču sa 96 bunarića (po 80 μl, u duplikatu) i pomešani sa 20 μl reagensa malahit -zelenog. Ploča je inkubirana 30 minuta na sobnoj temperature uz mućkanje. Apsorbanca na 650nm je određena korišćenjem Vallac Victor 1420 Multilabel Counter (Perkin-Elmer Life Science, Val-tham, MA, USA). Neorganski fosfat (Pi) je kvantifikovan korišćenjem KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> kao standarda (opseg koncentracije: 4–40 mM). Da bi se ispravila neenzimska hidroliza ATP-a i AMPa, Pi je meren u reakcionom medijumu bez ćelija i oduzet od ukupnog Pi oslobođenog tokom inkubacije. Koncentracija proteina je određena po modifikovanoj Lowry-jevoj metodi koristeći BSA kao standard (Charles, 1990). Aktivnosti enzima su izražene kao specifična aktivnost (nmol Pi min/mg/protein).

### 3.3.7. Određivanje adenoizina

U cilju određivanja adenoizina iz ćelijskih supernatanta mono- i ko-kultura najpre je urađena ekstrakcija. Uzorcima je dodat metanol (80% metanol u dd H<sub>2</sub>O) u odnosu 1:3 (uzorak/metanol, v/v) uz vorteksovanje u trajanju od 30s. Uzorci su zatim zamrznuti na -80°C u trajanju od 10 minuta, pa odmrznuti na sobnoj temperaturi i nakon 10 minuta vorteksovani. Postupak je ponovljen 3 puta. Nakon toga uzorci su centrifugirani 10 minuta, 14000g na +4°C, supernatant je pokupljen, profiltriran kroz filter membranu (0,45 mikrona) i korišćen za određivanje adenoizina (Nybo i sar.,



2019). Kvantifikacija adenzina urađena na *Dionex Ultimate 3000 UHPLC* sistemu opremljenim sa UV diodnim detektorom (eng. *diode array detector, DAD*) koji je povezan na *TSQ Quantum Access Max* maseni spektrometar sa detektorom sa tri analizatora - trostruki kvadrupol, skraćena *QQQ*, engl. *triple quadrupol (UHPLC-DAD MS/MS)*. Eluiranje je izvedeno na 40°C na *Synchronis aqua C18* analitičkoj koloni (100 x 2.1 mm, 1.9 µm). Mobilna faza se sastojala od vode + 0.1% mravlja kiselina (A) i acetonitrila + 0.1% mravlja kiselina (B), koji su bili u sledećem gradientu koncentracije: 1% B, 2.0 min; 1-99% B, 2.0-10.0 min; 99% B, 10.0-12.0 min; 1% B do 15 min. Protok je bio podešen na 0,2 mL/min, a talasna dužina na 257 nm. Injekciona zapremina je bila 5 µL. *TSQ Quantum Access Max* maseni spektrometar bio je opremljen jonskim izvorom u obliku elektrosprej jonizacije. Maseni spektrometar je snimao mase u pozitivnom jonizacionom modu u opsegu od 100 to 1000 *m/z*. Za kvantifikaciju adenzina u metodi je podešen prelaz iz 268.104 *m/z* u 136.062 *m/z*. Napon konusa je bio 2 V, a koliziona energija 20 eV. *Xcalibur* softver (verzija 2.2) korišćen je za kontrolu instrumenta. Ukupan sadržaj izračunat je integracijom površina pikova i izražen je kao µg/kg.

### 3.3.8. Western blot analiza

#### 3.3.8.1. Izolacija proteina

Iz ćelija koštane srži i slezine urađena je izolacija ukupnih proteina. Slezine su homogenizovane u ohlađenom RIPA puferu (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM natrijum hlorid, 1% Triton X-100, 1% natrijum deoksiholat, 0,1% natrijum dodecil sulfat, 2 mM EDTA, 1 mM DTT, 50 mM natrijum fluorid) koristeći odnos - 100 mg tkiva na 1 ml pufera, a ćelije koštane srži su najpre isprane PBS-om i onda lizirane u ohlađenom RIPA puferu u zapremini 5 puta većoj od zapremine ćelijskog taloga dobijenog centrifugiranjem suspenzije ćelija u PBS-u. Puferu za lizu ćelija je neposredno pre upotrebe dodat inhibitor proteaze (10 µl/ml, Pierce Thermo Fisher Scientific, SAD) i natrijum-ortovanadat (5 µl/ml). Ćelijski lizati su inkubirani 25 min na +4°C, a zatim centrifugirani na 15000 g i temperaturi +4°C, u trajanju od 20 min. Upotrebom komercijalnog BCA testa (Pierce, Rockford, SAD) određena je koncentracija proteina u svakom uzorku, a zatim su uzorci čuvani na -70°C do analize (*Mojsilović, 2014*).

#### 3.3.8.2. Elektroforeza i transfer

Proteini u uzorcima denaturisani su u ključalom vodenom kupatilu (3 min) u prisutvu redukujućeg agensa, sadržanog u puferu za uzorke. (0,125 M Tris, pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol, 0,2 M DTT, 0,02% bromfenol plavo). Ovako pripremljeni uzorci su nanošeni na akrilamidni gel debljine 1 mm i razdvajani SDS-PAGE elektroforezom (SE 260, Mini Vertical Electrophoresis Unit, Hoefer Inc., San Francisco, CA, SAD) pri konstantnoj jačini struje od 20 mA. SE 260, a zatim preneti na nitroceluloznu membranu (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka) korišćenjem polu-suvog sistema za transfer (TE77X Semidry Blotting Systems, Hoefer Inc., San Francisco, CA, SAD) (*Vignjević, 2014*).

#### 3.3.8.3. Imunoblot i detekcija proteina

Nakon transfera membrana je inkubirana u 5% BSA u 0,1% Tween-20 u TBS-u (TBS-T) u trajanju od 1h u cilju blokade nespecifičnog vezivanja proteina. Membrana je onda inkubirana sa primarnim antitelima na F4/80 (#70076, Cell signaling, Danvers, MA, SAD) i antitelom specifičnim za aktin (MAB8929, R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD) preko noći na +4°C. Membrana je zatim isprana u TBS-T-u i inkubirana peroxidaza-konjugovanim antitelima, *goat anti-rabbit* (R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD.) i *goat anti-mouse* (Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Nemačka), koja su korišćena kao sekundarna antitela u trajanju od 2h. Aktin je korišćen kao kontrola. Western blotovi su razvijeni korišćenjem sistema za pojačanu hemiluminiscenciju (Serva

Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Nemačka) prema uputstvima proizvođača. Intenzitet hemiluminiscencije detektovan korišćenjem ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD). Prisustvo traka je određeno primenom ImageLab programa. (Bio-Rad Laboratories, Inc. Version 6.0.0.25).

### 3.3.9. Analiza ekspresije gena

#### 3.3.9.1. Izolacija RNK i reverzna transkripcija

Ukupana RNK izolovana je stavljanjem ćelija u Trizol (TRIzol™ Reagent, Invitrogen, Cat. No. 15596026) i inkubacijom u trajanju od 5 minuta na sobnoj temperaturi nakon čega je rađeno centrifugiranje od 10 minuta na 12000g na +4°C radi uklanjanja DNK. Supernatant je pažljivo pokupljen i na njega je dodat hloroform nakon čega je usledilo snažno mućkanje u trajanju od 15s, inkubacija 5 minuta na 30°C, i centrifugiranje 15 minuta, 12000g na +4°C. Homogenat se nakon centrifugiranja razdvajao u tri faze: donju, crvenu, fenol-hloroform fazu koja sadrži proteine, beli interfazni prsten u kojem se nalazi DNK i gornju, vodenu fazu koja sadrži RNK. Vodena faza je pažljivo prebačena u nove tubice, a postupak ekstrakcije je ponovljen još jednom. Taloženje RNK izvedeno je dodavanjem izopropanola vodenoj fazi uz ručno izvrtnje tubica 10-20 puta nakon čega je usledila inkubacija od 10 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugiranje 10 minuta, 12000g, +4°C. Supernatant je odbačen, a talog je tri puta ispran sa 75% etanolom rastvorenim u vodi iz koje su uklonjene nukleaze. Uzorak je kratko promućkan i centrifugiran 5 minuta, 7500g, na +4°C. Posle trećeg ispiranja talog je osušen na vazduh i rastvoren u 20 µl vode oslobođene nukleaza. Koncentracija RNK određena je na NanoFotometru (Nanophotometer P330, Implen, DE) i uzorci su čuvani na -80°C do dalje upotrebe.

Uzorci RNK prečišćeni su upotrebom enzima DNaze (ezDNaze, Invitrogen, Cat. No. 11766051) kojim je uklonjeno eventualno prisustvo zaostalih molekuli DNK nakon izolacije, a zatim uz pomoć kita za reverznu transkripciju (Hight Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems, Cat. No. 4374966 ) RNK je prevedena u komplementarnu DNK (cDNA). Naime, reakciona smesa od 2 µg RNK, nasumičnog prajmera, pufera za reverznu transkripciju, reverzne traskriptaze, RNaze inhibitora, nukleotida (dNTP miks) u ukupnoj zapremini od 20µl inkubirana je 10 minuta na 25°C, 120 minuta na 37°C , 5 minuta na 85°C, korišćenjem termoblok aparata MultiGene™ OptiMax (Labnet International Inc., Edison, USA).

#### 3.3.9.2. Reakcija lančanog umnožavanja i gel elektroforeza

Lančanom reakcijom umnožavanja 1µl komplementarnog DNK uzorka, odgovarajućeg prajmera, pufera za PCR koji sadrži sa 2 mM MgCl<sub>2</sub>, smeše deoksinukleotida (4x0,2 mM) i 25 U/ml Taq DNK polimeraze (PCR Master Mix, Thermo Scientific, Cat. No. K0171) uz dodatak vode prečišćene od nukleaza do ukupne zapremine od 25 µl dobijeni su produkti PCR-a. Nakon inicijalne denaturacije od 5 minuta na 94°C sledila su 30 ciklusa denaturacije (45s) na temperaturi od 94°C, vezivanja (30s) na temperaturi od 52°C i elongacije (90s) na temperaturi od 72°C; i na kraju 10 minuta završna elongacija na temperaturi od 72°C. Dobijeni produkti razdvajani su elektroforezom. Elektroforeza rađena je na 1,5% agaroznom gelu (Lonza, Rockland, ME, SAD) sa 0,01% etidijum-bromida (Sigma-Aldrich ) u Tris-acetatnom-EDTA (TAE; Serva) puferu na 100 V i 400 mA u trajanju od 40 minuta. Uzorci su mešani sa bojom koja se vezuje za DNK (10 mM Tris-HCl (pH 7,6), 0,03% bromfenol plavo, 0,03% ksilen cijanol FF, 60% glicerol i 60 mM EDTA). Na osnovu markera koji u sebi sadrži boju i fragmente u veličini od 50-1000 baznih parova (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), određivana je pozicija i broj baznih parova dobijenog produkta. Osvetljavanjem gela UV svetlošću korišćenjem ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) dobijene su trake čiji se intenzitet kvantifikovao denzitometrijski primenom ImageLab

programa. Relativna ekspresija iRNK određena je u odnosu na vrednosti gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) (**Tabela 2.2**).

### 3.3.9.2. Reakcija lančanog umnožavanja sa detekcijom produkata u realnom vremenu qRT-PCR

Reakcija lančanog umnožavanja ciljanih fragmenta cDNA u realnom vremenu (qRT-PCR) rađena je na aparatu Mic qPCR cycler (BioMolecular systems, Australija). Korišćenjem komercijalnog kita Fast Green (Applied Biosystems, Cat. No. 4385612 ), 1  $\mu$ l komplementarnog DNK uzorka i 0,3-0,5  $\mu$ M odgovarajućeg prajmera (**Tabela 2.2**). Detektovan je fluorescentni signal čije je intenzitet direktno proporcionalan količini PCR produkta u datom ciklusu.

Temperaturni profil reakcije:

20s na temperaturi od 95°C

40 ciklusa: 3s na temperaturi od 95°C

30s na temperaturi od 60°C

Nakon završenog procesa amplifikacije, analizirana je kriva topljenja produkata. Relativna ekspresija iRNK određivana je uporednom  $\Delta\Delta C_t$  metodom uz korišćenje  $\beta$  aktina kao referentnog gena.

**Tabela 2.2.** Prajmeri primenjeni u eksperimentima

Gen	Sekvenca (5'-3')	Veličina PCR produkta
$\beta$ aktin	F: TTCTCCATGTCGTCCCAGTT R: TTCTCCATGTCGTCCCAGTT	167bp
GAPDH	F: ACCACAGTCCATGCCATCAC F: TCCACCACCCTGTTGCTGTA	452bp
ADORA2A	F: GCCATCCCATTGCCATCA R: GCAATAGCCAAGAGGCTGAAGA	122bp
ADORA2B	F: TCTTCCTCGCCTGCTTCGT R: CCAGTGACCAAACCTTTATACCTGA	121bp
nNOS	F: CCAGCACCTTTGGCAATGGAGAC R: GACGCTGTTGAATCGGACCTTG TAG	128bp

iNOS	F: TGGAGCGAGTTGTGGATTGTCCT R: GCAGCCTCTGTCTTTGACCCAGTA	96bp
eNOS	F: CGCAAGAGGAAGGAGTCTAGCA R: TCGAGCAAAGGCACAGAAGTGG	114bp
P2X7R	F: TGCAGCTGGAACGATGTCTT R:GACGGTGCCATAATTCGTGC	75bp
CD39	F: TACCACCCCATCTGGTCATT R: GGACGTTTTGTTGGTTGGT	168bp
CD73	F: TCCTGCAAGTGGGTGGAATC R: AGATGGGCACTCGACACTTG	105bp
BMP4	F: AGGGATCTTACCGGCTCCA R: TCCAGATGTTCTTCGTGATGG	134bp
MCP-1	F: CCACAACCACCTCAAGCACT R: AGGCATCACAGTCCGAGTCA	75bp
Vimentin	F: GAACGGAAAGTGGAATCCTTGC R: GGTTGGCAGAGGCAGAGAAATC	591bp
Fibronectin	F: CCCAGACTTATGGTGGCAATT R: AATTTCGCCTCGAGTCTGA	201bp
$\alpha$ -SMA	F: CTGGAGAAGAGCTACGAACTGC R: CTGATCCACATCTGCTGGAAGG	368bp
CD29	F: GCTCCGGCCAGAAGACATTA R: CCCATTTCCCTCATGGCACA	1132bp
CD105	F:AGGTCTCGCAGAAAGAGTCG R:GATGCTTTGGGGGTCATCCA	442bp

CD45	F: AGTGGTTTGGTCTTAGGGGAGAC R: GGGGTCACTTTGAGGCAGAA	200bp
TLX1	F: GCTTGCCTACAGTACCCTCTG R: TAGGGGTGACCTGTGAACCT	121bp
PPAR $\gamma$	F: GTACTGTCGGTTTCAGAAGTGCC R: ATCTCCGCCAACAGCTTCTCCT	102bp
C/EBP $\beta$	F: CAACCTGGAGACGCAGCACAAG R: GCTTGAACAAGTTCCGCAGGGT	113bp
Osteopontin	F: TGCACCCAGATCCTATAGCC R: CTCCATCGTCATCATCATCG	186bp
RUNX2	F: CCCAGCCACCTTTACCTACA R: TATGGAGTGCTGCTGGTCTG	150bp

### 3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

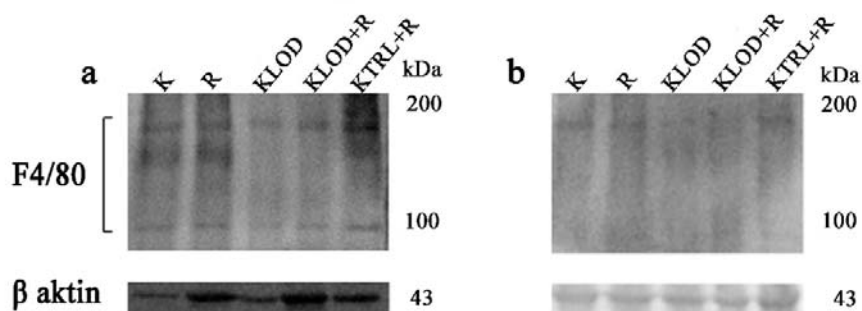
Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine  $\pm$  standardna greška aritmetičke sredine. Statistička značajnost izračunata je korišćenjem jednofaktorske analize varijanse (ANOVA), za procenu značajnosti međugrupnih razlika upotrebljeni su odgovarajući *post hoc* testovi. RT-PCR analiza je rađena korišćenjem softvera za relativnu ekspresiju (REST 2009). Dobijena vrednost  $p < 0,05$  se smatrala statistički značajnom razlikom.

## 4. REZULTATI

### 4.1. UTICAJ DEPLECIJE MAKROFAGA NA STRES ERITROCITOPEZU

#### 4.1.1. Uticaj deplecije makrofaga na ekspresiju F4/80 proteina u koštanoj srži i slezini

U cilju deplecije makrofaga korišćen je klodronat-lipozom. Kao dokaz o deplekciji makrofaga korišćenjem klodronat-lipozoma ispitali smo ekspresiju proteina F4/80, markera mišjih makrofaga, u ukupnim ćelijama koštane srži i slezine *Western blot* analizom (Slika 4.1). Rezultati su pokazali da klodronat-lipozom dovodi do smanjene ekspresije F4/80 proteina u grupama koje su tretirane klodronatom.



**Slika 4.1.** Ekspresija proteina F4/80 u slezini (a) i koštanoj srži (b) u različitim eksperimentalnim grupama. Reprezentativne western blot slike koje pokazuju značajno smanjenje ekspresije F4/80 u grupama tretiranim klodronatom. K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

#### 4.1.2. Uticaj deplecije makrofaga na hematološke paramete tokom SE

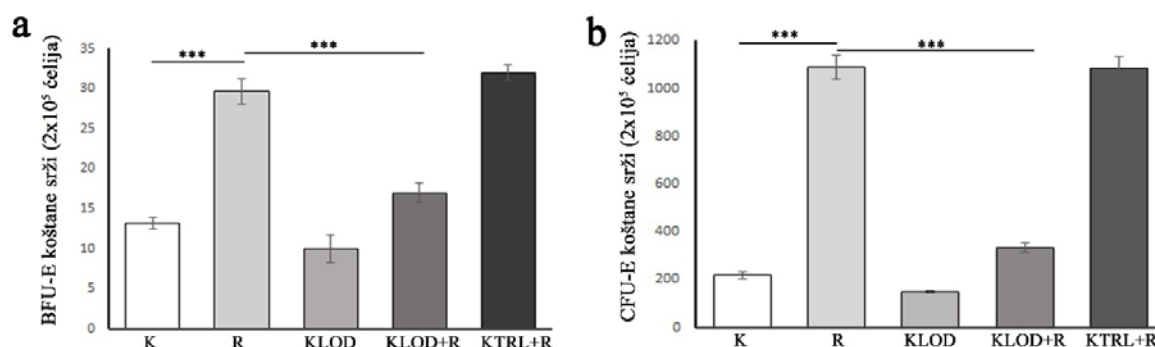
U cilju ispitivanja uloge makrofaga tokom SE rađena je deplecija makrofaga korišćenjem klodronat-lipozoma. Miševi su bili podvrgnuti *restraint* stresu radi izazivanja SE, i u trajanju od 7 dana dobijali su klodronat-lipozom na svaki drugi dan. Neposredno pre žrtvovanja životinjama je uzeta krv iz orbitalnog sinusa radi određivanja hematoloških parameta (Tabela 4.1). Ovi rezultati koji su publikovani u radu iz doktorata (Momčilović i sar., 2023) pokazali su da je deplecija makrofaga dovela do značajnog smanjenja RBC u krvi miševa koji nisu bili izloženi *restraint* stresu i miševa koji su bili izloženi *restraint* stresu. Takođe, postoji statistički značno smanjenje broja RBC i nivoa hemoglobina kod miševa koji su tokom *restraint* stresa bili tretirani klodronat-lipozomom, u odnosu na miševe koji su bili podvrgnuti samo *restraint* stresu.

**Tabela 4.1.** Hematološki parametri. RBC- broj eritrocita, Hb- hemoglobin, Htc-hematokrit, MCV- prosečna zapremina eritrocita. MCH- prosečna količina hemoglobina u eritrocitu. MCHC- prosečna koncentracija hemoglobina u eritrocitima. RDW- indeks anizocitoze. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . U poređenju sa kontrolnom grupom (a), u poređenju sa restraint stres grupom (b). K- kontrole, netretirane životinje; R- životinje izložene restraint stresu; KLOD- životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

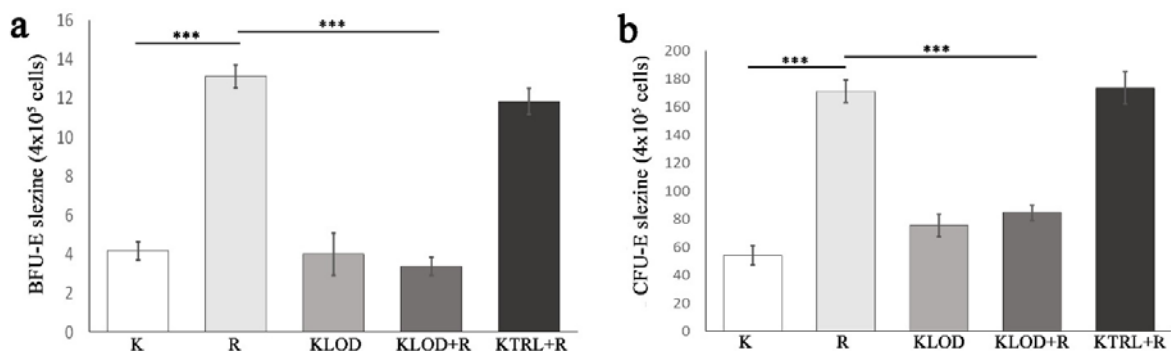
	K	R	KLOD	KLOD + R	KTRL + R
RBC ( $10^{12}/l$ )	$5,52 \pm 0,16$	$5,35 \pm 0,18$	$4,54 \pm 0,12$	$3,95 \pm 0,06$ <sup>*(a) ***(b)</sup>	$5,18 \pm 0,19$
Hb (g/l)	$165,34 \pm 1,95$	$130,57 \pm 2,68$ <sup>***(a)</sup>	$140,26 \pm 3,14$ <sup>***(a)</sup>	$100,68 \pm 1,68$ <sup>***(a) ***(b)</sup>	$132,94 \pm 2,48$
Hct (%)	$45,67 \pm 1,17$	$43,75 \pm 1,71$	$40,67 \pm 0,56$ <sup>** (a)</sup>	$39,12 \pm 0,64$ <sup>** (b)</sup>	$42,83 \pm 1,3$
MCV (fl)	$83,78 \pm 3,84$	$86,26 \pm 1,79$	$84,66 \pm 2,49$	$92,51 \pm 4,45$	$85,65 \pm 2,26$
MCH (pg)	$30,06 \pm 0,88$	$24,41 \pm 0,72$ <sup>** (a)</sup>	$27,26 \pm 0,9$	$24,72 \pm 0,73$ <sup>** (a)</sup>	$25,84 \pm 1,14$ <sup>*(a)</sup>
MCHC (g/l)	$363,18 \pm 9,54$	$301,56 \pm 13,03$ <sup>** (a)</sup>	$344,94 \pm 6,6$	$278,20 \pm 5,42$ <sup>*** (a)</sup>	$311,58 \pm 9,87$ <sup>*(a)</sup>
RDW (%)	$11,36 \pm 0,54$	$14,01 \pm 0,28$ <sup>*(a)</sup>	$11,97 \pm 0,38$	$13,46 \pm 0,87$	$13,78 \pm 0,6$

#### 4.1.3. Uticaj deplecije makrofaga na BFU-E i CFU-E kolonije tokom SE

Radi ispitivanja uloge makrofaga tokom SE praćeno je kako deplecija makrofaga utiče na rast i diferencijaciju opredeljenih matičnih ćelija eritroidne loze. Rezultati su pokazali da usled izlaganja miševa *restraint* stresu dolazi do statistički značajnog povećanja broja CFU-E i BFU-E ćelija u koštanoj srži i u slezini ( $p < 0.001$ ). Kod miševa koji su bili podvrgnuti *restraint* stresu, tretman klodronat-lipozomom poništava efekat koji je stres imao na CFU-E i BFU-E ćelije u koštanoj srži i slezini ( $p < 0.001$ ), dok deplecija makrofaga u bazalnim uslovima ne dovodi do statistički značajne promene u broju ovih ćelija u koštanoj srži i slezini (Slika 4.2, Slika 4.3).



**Slika 4.2.** Uticaj deplecije makrofaga na broj BFU-E (a) i CFU-E (b) ćelija koštane srži tokom SE. K- kontrole, netretirane životinje; R- životinje izložene restraint stresu; KLOD- životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu. \*\*\*  $p < 0.001$



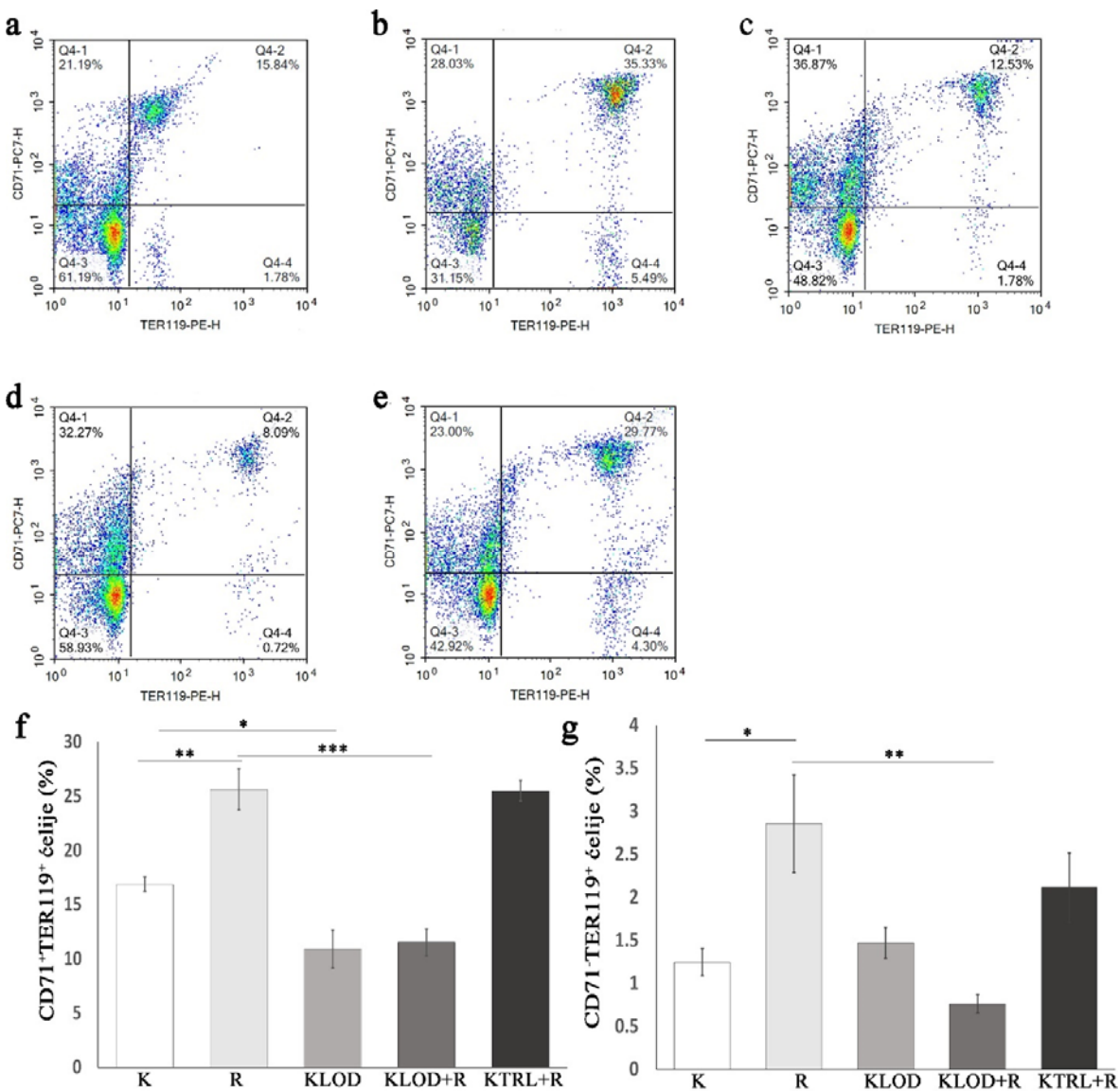
**Slika 4.3.** Uticaj deplecije makrofaga na broj BFU-E (a) i CFU-E (b) ćelija slezine tokom SE. K- kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- zivotinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu\*\*\*  $p < 0.001$

#### 4.1.4. Uticaj deplecije makrofaga na Ter119 pozitivne ćelije u koštanoj srži i slezini miša tokom SE

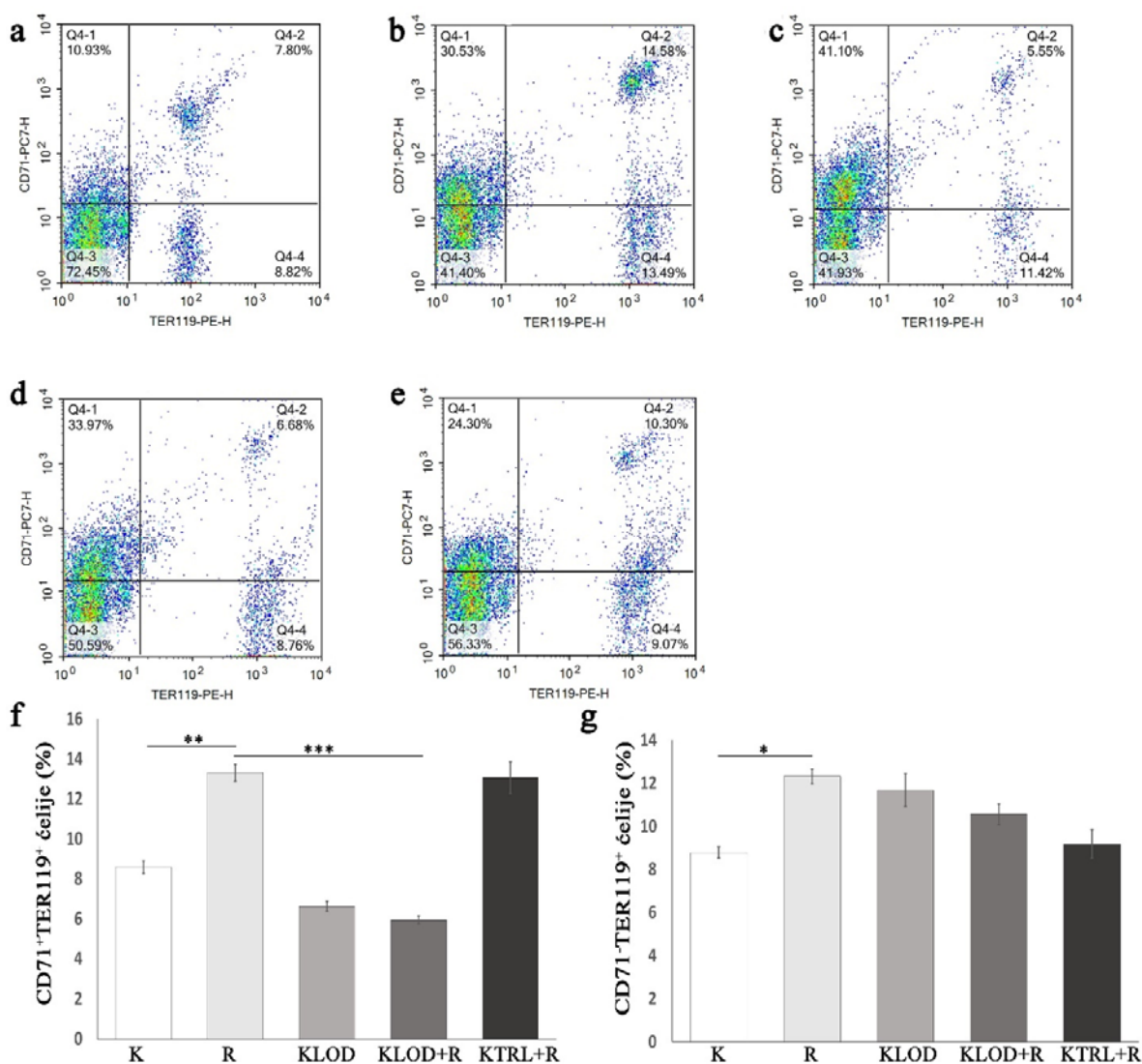
Analizu zrelijih formi ćelija eritroidne loze radili smo na osnovu ekspresije Ter119 antigena i CD71 (transferinskog receptora). Ekspresija Ter119 antigena se povećava od stadijuma proeritroblasta do zrelih eritrocita, dok se ekspresija CD71 transferinskog receptora smanjuje kako ćelije sazrevaju. Promena u ekspresiji ovih markera dala nam je mogućnost analize uticaja deplecije makrofaga na proces sazrevanja eritrocita tokom SE (Koulnis i sar., 2011).

Predhodno obeležene ukupne ćelije koštane srži i slezine markerima Ter119 i CD71, analizirane su metodom protočne citometrije. Ćelije su na osnovu ekspresije ovih markera izdvojene u tri populacije i to od nezrelijih ka zrelijim: CD71+/Ter119-, CD71+/Ter119+ i CD71-/Ter119+ ćelije. Kod miševa, koji su bili podvrgnuti *restraint* stresu, došlo je do statistički značajnog povećanja procenta CD71+/Ter119+ ćelija ( $p < 0.01$ ) u koštanoj srži (Slika 4.4) i slezini (Slika 4.5). Odsustvo makrofaga tokom stres eritrocitopoeze uzrokovalo je smanjenje procenta CD71+/Ter119+ ćelija u koštanoj srži i slezini ( $p < 0.001$ ), kao i smanjenje procenta CD71-/Ter119+ u koštanoj srži ( $p < 0.01$ ). Procenat CD71+/Ter119+ u slezini u bazalnim uslovima u odsustvu makrofaga ostao je nepromenjen, za razliku od procenta ovih ćelija u koštanoj srži, gde se procenat ovih ćelija smanjio ( $p < 0.05$ ). Tretman klodronat-lipozomom u odsustvu stresa nije uticao na procenat CD71-/Ter119+ ćelija u koštanoj srži.





**Slika 4.4.** Uticaj deplecije makrofaga tokom SE na populacije *Ter119* pozitivnih ćelija u koštanoj srži kontrolnih miševa (a) miševa podvrgnutih restraint stresu (b) miševa koji su primili klodronat-lipozom (c), miševa koji su primali klodronat-lipozom i bili podvrgnuti restraint stresu (d), miševa koji su primili kontrolni lipozom i bili podvrgnuti restraint stresu (e). Procenat CD71<sup>+</sup>/*Ter119*<sup>+</sup> ćelija (f) i procenat CD71<sup>-</sup>/*Ter119*<sup>+</sup> ćelija (g) u koštanoj srži. K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R-životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

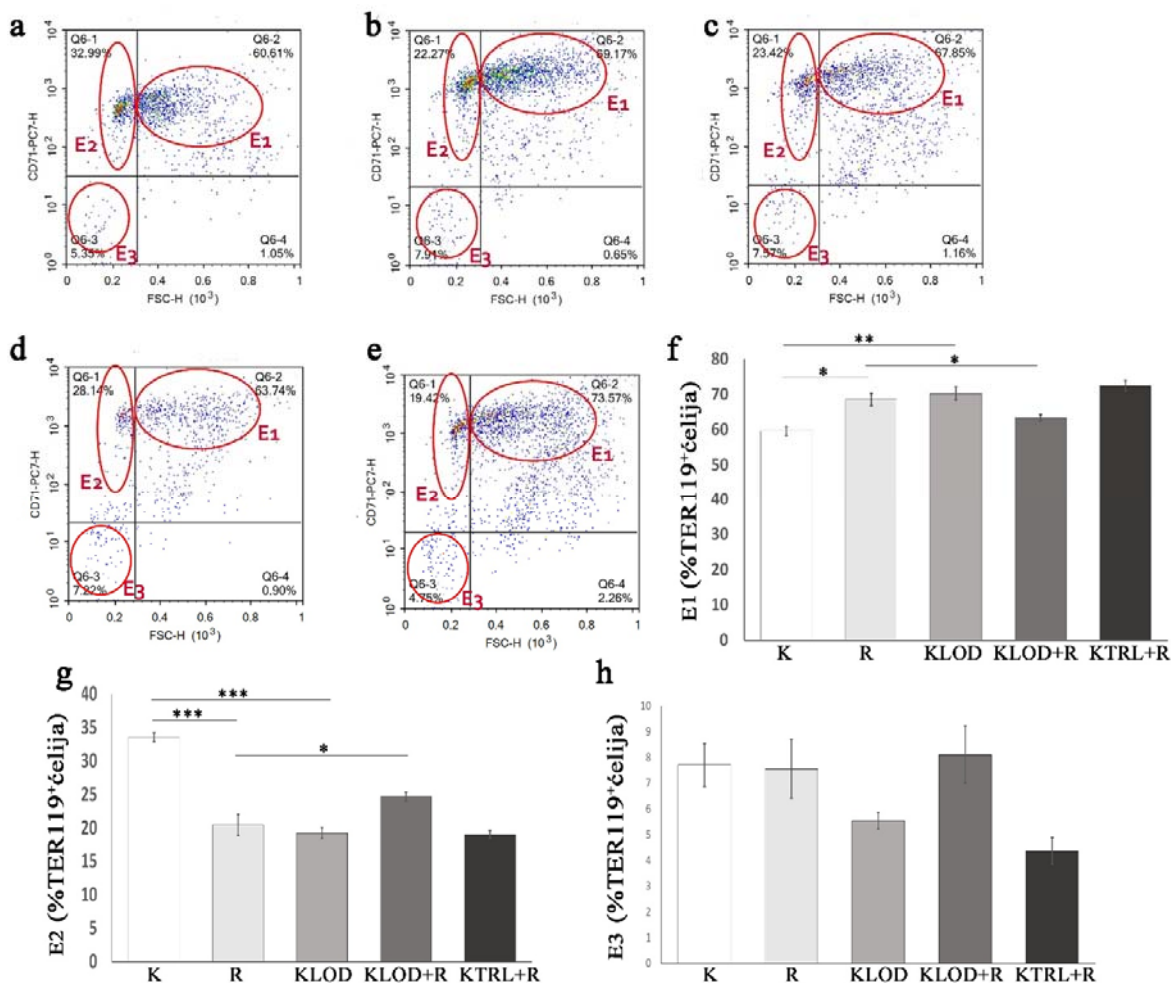


**Slika 4.5.** Uticaj deplecije makrofaga tokom SE na populacije Ter119 pozitivnih ćelija u slezini kontrolnih miševa (a), miševa podvrgnutih restraint stresu (b), miševa koji su primili klodronat-lipozom (c), miševa koji su primali klodronat-lipozom i bili podvrgnuti restraint stresu (d), miševa koji su primili kontrolni liposom i bili podvrgnuti restraint stresu (e). Procenat CD71<sup>+</sup>/Ter119<sup>+</sup> ćelija (f) i procenat CD71<sup>-</sup>/Ter119<sup>+</sup> ćelija (g) u slezini. K-kotrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni liposom i bile izložene restraint stresu. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

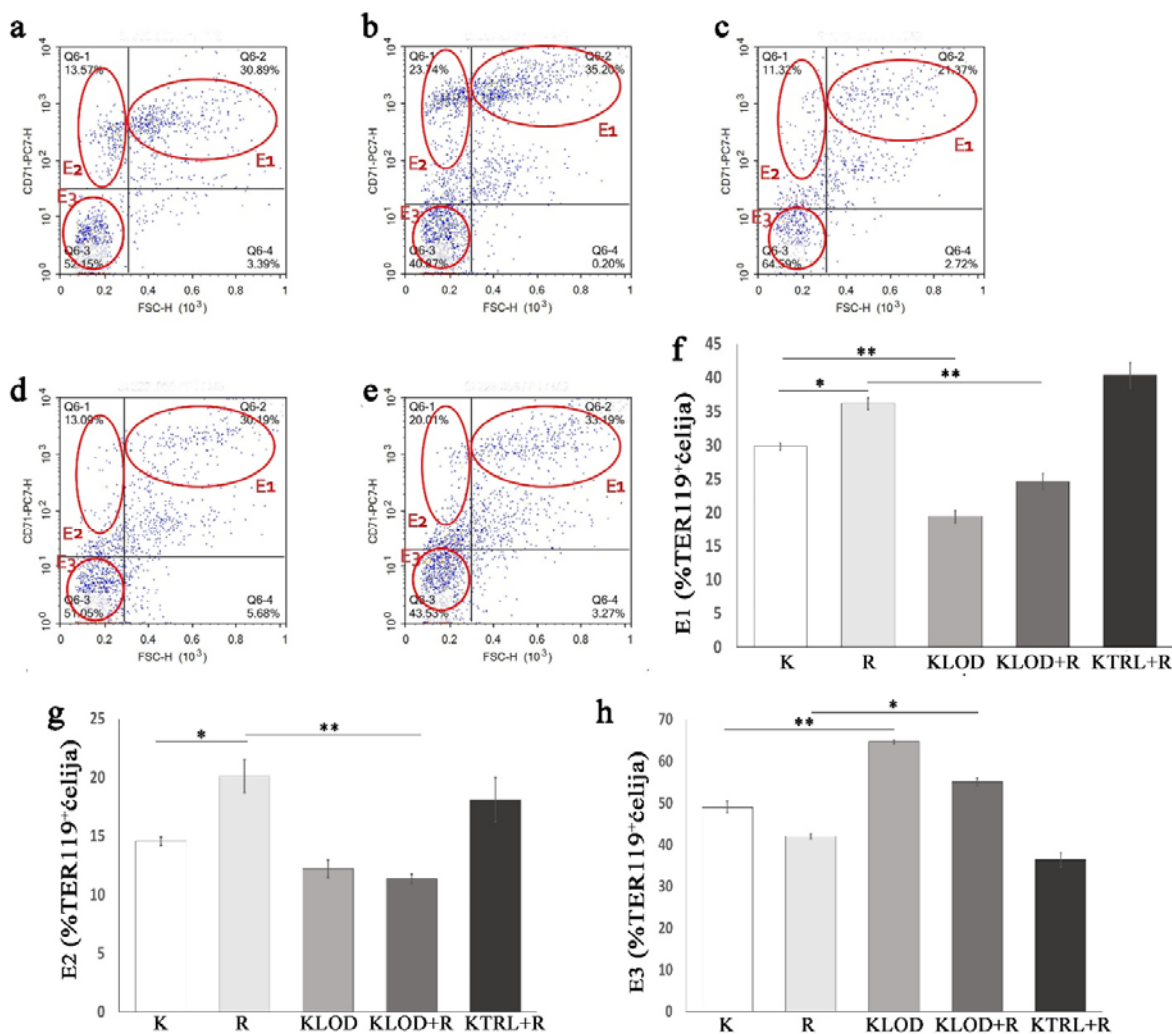
#### 4.1.5. Uticaj deplecije makrofaga na različite subpopulacije Ter119 pozitivnih ćelija u koštanoj srži i slezini miša tokom SE

Korišćenjem protočne citometrije analizirali smo Ter119 pozitivne ćelije na osnovu njihove veličine. Ter119 ćelije se prema stepenu zrelosti klasifikuju u subpopulacije E1, E2 i E3, počev od nezrelije ka zrelijim pri čemu se veličina ovih ćelija smanjuje ka zrelijim formama. Tretman klodronat-lipozomom u bazalnim uslovima značajno je povećao procenat subpopulacije E1 u koštanoj srži (Slika 4.6) ( $p < 0.01$ ), dok je ovaj tretman značajno smanjio njihov procenat u slezini (Slika 4.7) ( $p < 0.05$ ). Subpopulacija E1 ćelija se tokom hroničnog stresa značajno povećava u koštanoj srži i slezini ( $p < 0.05$ ), dok odsustvo makrofaga sprečava ovo povećanje ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ). Tokom hroničnog stresa procenat E2 Ter119<sup>+</sup> ćelija je značajno smanjen u koštanoj srži ( $p < 0.001$ ),

dok je u slezini miševa značajno povećan ( $p < 0.05$ ). Odsustvo makrofaga suprostavilo se ovim efektima stresa na E2 subpopulaciju Ter119<sup>+</sup> ćelija ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ). Tretman klodronat-lipozomom u uslovima stabilnog stanja značajno je smanjio procenat E2 Ter119<sup>+</sup> ćelija u koštanoj srži ( $p < 0.001$ ), dok je broj ovih ćelija u slezini ostao nepromenjen. Procenat najzrelije subpopulacije Ter119<sup>+</sup> ćelija (E3) u koštanoj srži nije značajno promenjen tokom hroničnog stresa ili u odsustvu makrofaga. Za razliku od koštane srži tretman klodronat-lipozomima značajno je povećao procenat E3 Ter119<sup>+</sup> ćelija u slezini u bazalnim uslovima, kao i u uslovima stresa ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ).



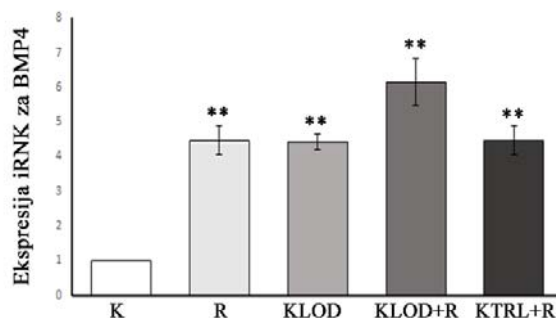
**Slika 4.6.** Uticaj deplecije makrofaga na subpopulacije Ter119 pozitivnih ćelija koštane srži kontrolnih miševa (a), miševa podvrgnutih restraint stresu (b), miševa koji su primili klodronat-lipozom (c), miševa koji su primali klodronat-lipozom i bili podvrgnuti restraint stresu (d), miševa koji su primili kontrolni lipozom i bili podvrgnuti restraint stresu (e). Procentualno učešće subpopulacija Ter-119 pozitivnih ćelija u koštanoj srži (f-h). K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R-životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$



**Slika 4.7.** Uticaj delecije makrofaga na subpopulacije *Ter119* pozitivnih ćelija slezine kontrolnih miševa (a), miševa podvrgnutih restraint stresu (b), miševa koji su primili klodronat-lipozom (c), miševa koji su primali klodronat-lipozom i bili podvrgnuti restraint stresu (d), miševa koji su primili kontrolni lipozom i bili podvrgnuti restraint stresu (e). Procentualno učešće subpopulacija *Ter-119* pozitivnih ćelija u koštanoj srži (f-h). K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- zivotinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

#### 4.1.6. Uticaj deplecije makrofaga na ekspresiju BMP4 molekula tokom SE

S obzirom na ključnu ulogu BMP4 molekula tokom SE, istraživali smo da li odsustvo makrofaga utiče na ekspresiju informacione RNK (iRNK) ovog molekula (**Slika 4.8**). Korišćenjem qRT-PCR metode kvantifikovali smo ekspresiju gena za BMP4 molekul u slezini ispitivanih životinja. Rezultati su pokazali povećanje nivoa iRNK kod stresiranih životinja, a odsustvo makrofaga u uslovima stresa dovelo je samo do dodatnog povećanja nivoa iRNK. Nedostatak makrofaga u odsustvu stresa sam po sebi je doveo do povećanog nivoa iRNK BMP4 molekula.

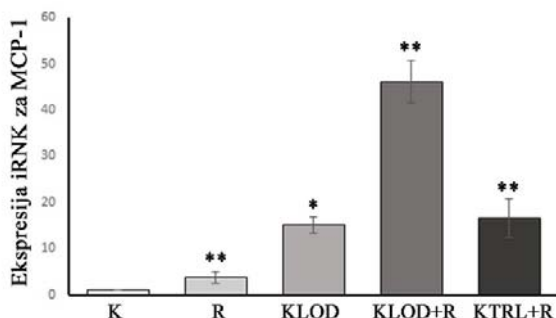


**Slika 4.8.** Ekspresija iRNK za BMP4 molekul u slezini ispitivanih životinja. Prikazane vrednosti predstavljaju relativnu ekspresiju iRNK normalizovani u odnosu na  $\beta$ -aktin i u poređenju sa kontrolom.  $**p < 0.01$ . K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.



#### 4.1.7. Uticaj hroničnog psihološkog stresa i deplecije makrofaga na ekspresiju MCP-1 molekula u slezini

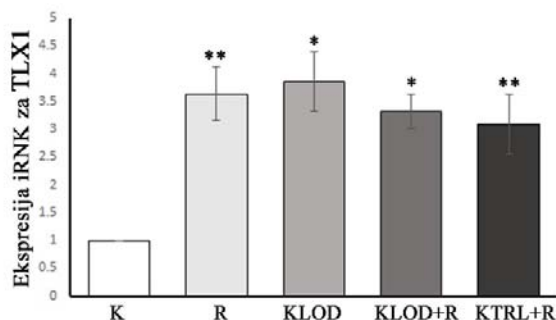
MCP-1 se smatra jednim od glavnih molekula koji reguliše migraciju monocita. S toga smo hteli da proverimo njegovu ekspresiju u ćelijama slezine u uslovima SE i da li deplecija makrofaga dovodi do promena u njegovoj ekspresiji. Naši rezultati su pokazali da hronični psihološki stres dovodi do povećane ekspresije MCP-1 u slezini ( $p < 0,01$ ), kao i deplecija makrofaga u bazalnim uslovima ( $p < 0,05$ ) i tokom hroničnog psihološkog stresa ( $p < 0,01$ ) (Slika 4.9).



**Slika 4.9.** Ekspresija iRNK za MCP-1 molekula u slezini ispitivanih životinja. Prikazane vrednosti predstavljaju relativnu ekspresiju iRNK normalizovani u odnosu na  $\beta$ -aktin i u poređenju sa kontrolom. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ . K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

#### 4.1.8. Uticaj hroničnog psihološkog stresa i deplecije makrofaga na ekspresiju transkripcionog faktora TLX1 u slezini

Kako su najnovija istraživanja pokazala značaj TLX1 tokom SE, mi smo proverili kako hronični psihološki stres i deplecija makrofaga utiče na ekspresiju TLX1 molekula. *Restraint* stres doveo je do povećane ekspresije TLX1 molekula ( $p < 0,01$ ), kao i deplecija makrofaga u bazalnim uslovima i uslovima stresa ( $p < 0,05$ ) (Slika 4.10).

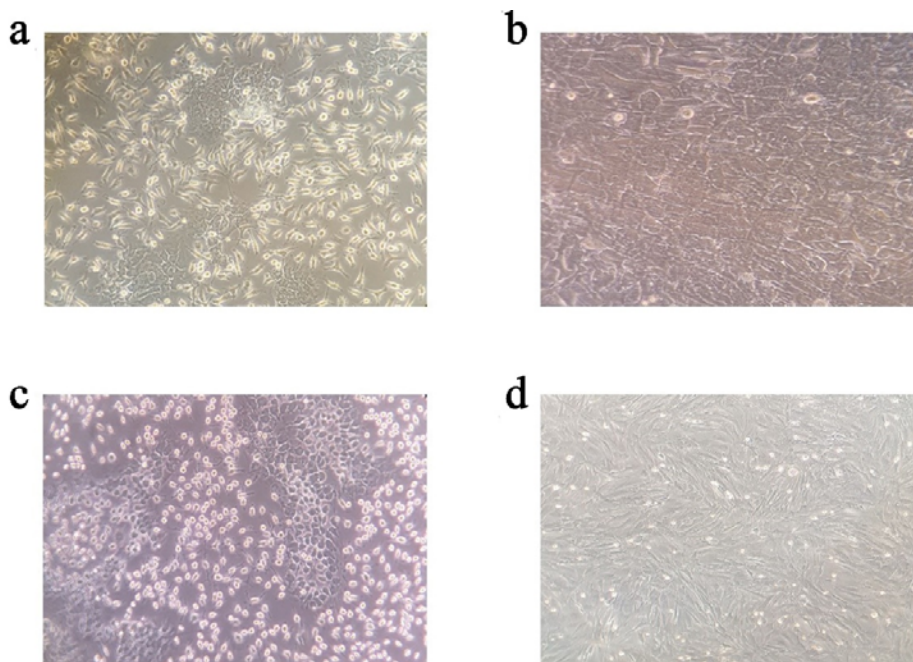


**Slika 4.10.** Ekspresija iRNK za transkripcioni faktor TLX1 u slezini ispitivanih životinja. Prikazane vrednosti predstavljaju relativnu ekspresiju iRNK normalizovani u odnosu na  $\beta$ -aktin i u poređenju sa kontrolom. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ . K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

## 4.2. ISPITIVANJE UTICAJA DEPLECIJE MAKROFAGA NA KARAKTERISTIKE I POTENCIJAL DIFERENCIJACIJE MSC IZOLOVANIH IZ KOŠTANE SRŽI I SLEZINE HRONIČNO STRESIRANIH MIŠEVA

### 4.2.1. Izolacija MSC

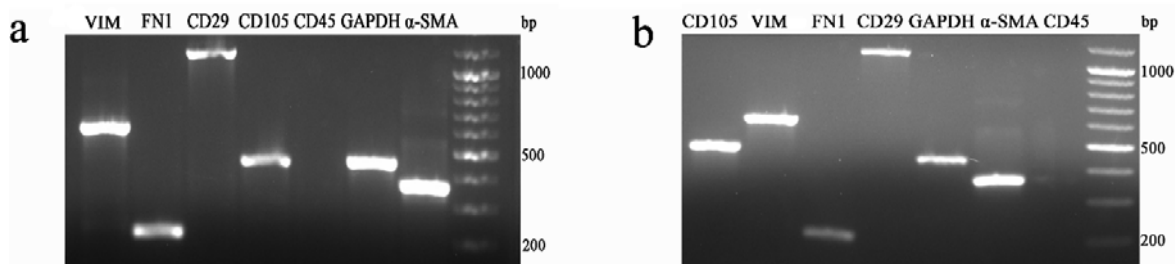
Izolaciju MSC radili smo na osnovu njihove sposobnosti adheriranja za plastiku. Ukupne ćelije koštane srži i slezine stavljene su u ploču sa 6 otvora, a intenzivnim menjanjem medijuma u roku od 72h uklonjen je najveći broj hematopoeznih ćelija. Prvih dana kultivacije pored retkih adherentnih ćelija koje su imale poligonalan i vretenast oblik bilo je i ćelija koja su bile svetle sa okruglim jedrom. Sedmog dana mogle su se uočiti kolonije fomirane od adherentnih ćelija (**Slika 4.11a, c**) dok je 14. dana kultivacije konfluentnost bila od 90% do 100% (**Slika 4.11b, d**). U naredim pasažama ćelije nisu formirale kolonije i bivale su sve homogenije.



**Slika 4.11.** Morfologija izolovanih MSC. Prikazane su MSC koštane srži (a) i slezine (c) sedmog dana kultivacije i MSC koštane srži (b) i slezine (d) 14. dana kultivacije. Razmera 100 $\mu$ m

### 4.2.2. Karakterizacija MSC

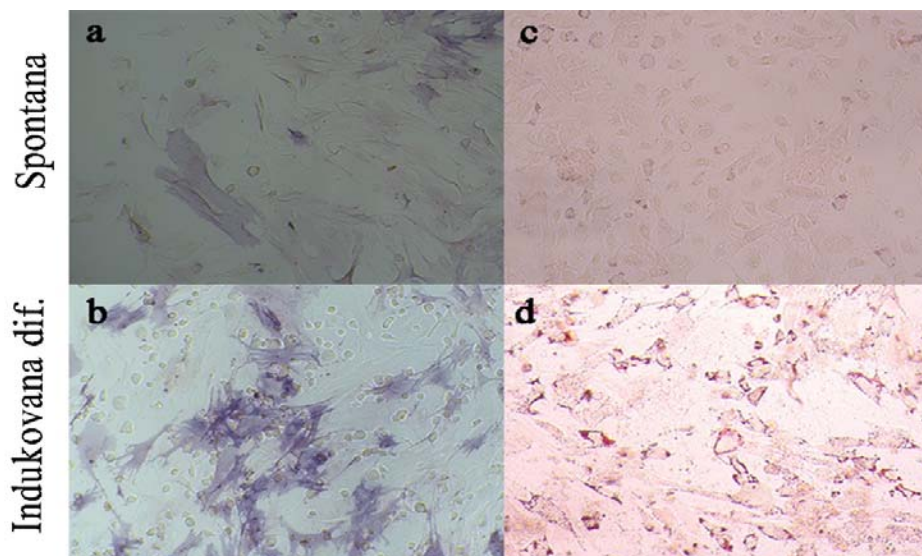
MSC miša se karakterišu eksprimiranjem vimentina (VIM), fibronektina (FN1), CD105, CD29 i  $\alpha$ -SMA, a odsustvom ekspresije CD45. Korišćenjem konvencionalnog RT-PCR ustanovljeno je da izolovane ćelije koštane srži i slezine sadrže iRNK ovih molekula kojim je potvrđeno njihovo mezenhimalno poreklo. MSC izolovane iz koštane srži/slezine ekprimirale su markere za VIM, FN1, CD105, CD29 i  $\alpha$ -SMA, dok je istovremeno ekspresija CD45 markera izostala. GAPDH je korišćen kao kontrola količine komplementarne DNK u uzorku (**Slika 4.12**).



*Slika 4.12. Ispoljavanje gena karakterističnih za MSC koštane srži (a) i slezine (b).*

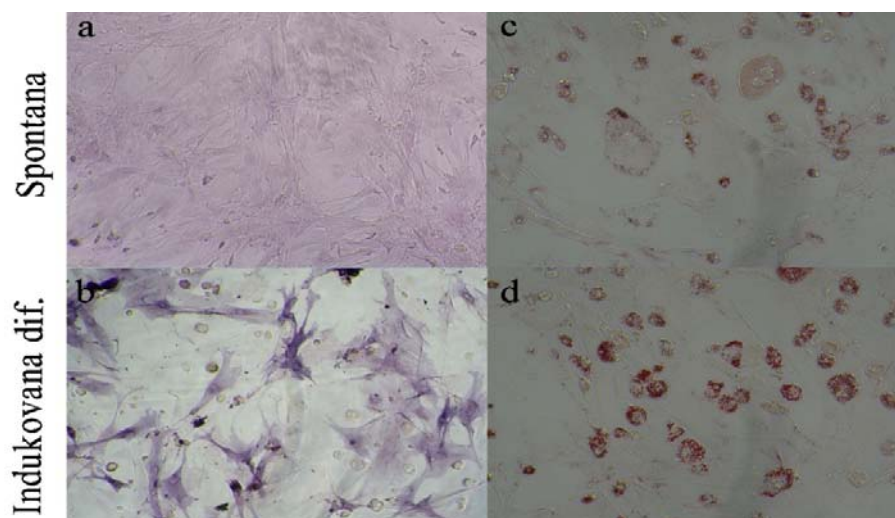
#### 4.2.3. Diferencijacija MSC

S obzirom da je jedan od kriterijuma za definisanje MSC njihov potencijal diferencijacije u više ćelijskih linija, odredili smo sposobnost diferencijacije MSC izolovanih iz koštane srži i slezine iz miša u osteoblaste i adipocite. Korišćeni su odgovarajući medijumi kako bi se podstakla diferencijacija ovih ćelija, a zatim su ćelije bojene odgovarajućim bojama radi vizualizacije aktivnosti alkalne fosfataze i deponovanih lipidnih kapi čime je ustanovljeno da ove ćelije poseduju sposobnost diferencijacije u ćelije kosti (Slika 4.13a, b; Slika 4.14a, b) i masnog tkiva (Slika 4.13 c, d; Slika 4.14 c, d).



*Slika 4.13. Potencijal diferencijacije MSC koštane srži. Osteogena diferencijacija, ćelije kultivisane u standardnom medijumu (a) ćelije kultivisane u medijumu za osteogenu diferencijaciju (b); adipogena diferencijacija, ćelije kultivisane u standardnom medijumu (c) ćelije kultivisane u medijumu za adipogenu diferencijaciju (d). Razmera 100µm*

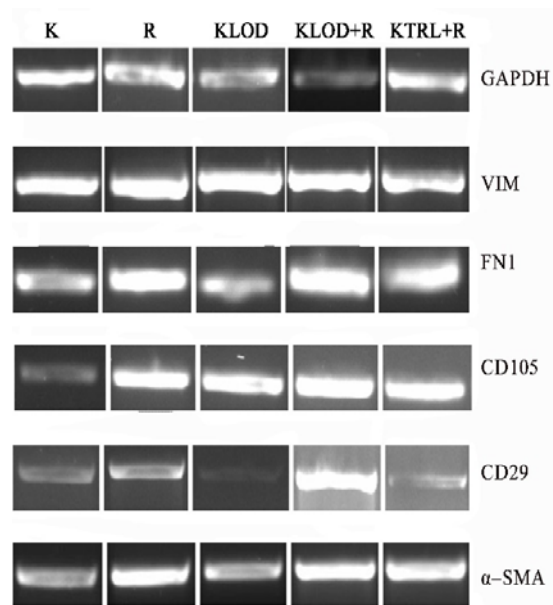




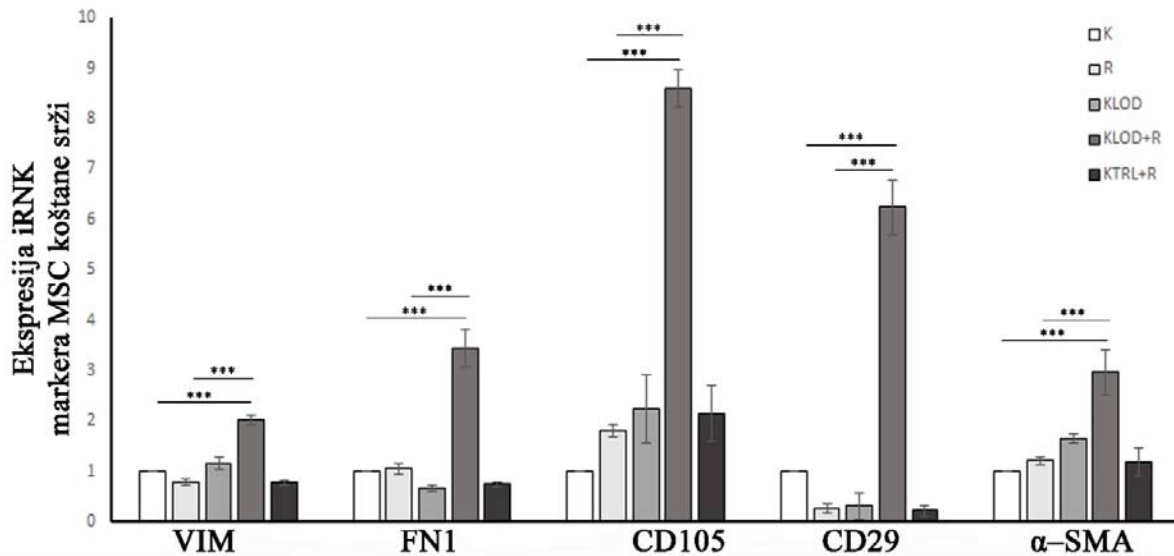
**Slika 4.14.** Potencijal diferencijacije MSC slezine. Osteogena diferencijacija, ćelije kultivisane u standardnom medijumu (a), ćelije kultivisane u medijumu za osteogenu diferencijaciju (b); adipogena diferencijacija, ćelije kultivisane u standardnom medijumu (c) ćelije kultivisane u medijumu za adipogenu diferencijaciju (d). Razmera 100 $\mu$ m

#### 4.2.4. Uticaj deplecije makrofaga na karakterizaciju MSC tokom hroničnog stresa

Radi ispitivanja uticaja deplecije makrofaga na karakterizaciju MSC, nakon izolacije ovih ćelija iz kontrolnih i tretiranih životinja, odredili smo ekspresiju iRNA za fibronektin, vimentin, CD29, CD105 i  $\alpha$ -SMA korišćenjem konvencionalnog RT-PCR. Ekspresija GAPDH je korišćena kao kontrola količine komplementarne DNK u uzorku. Denzitometrijskom analizom dobijenih rezultata pokazano je da makrofagi utiču na ekspresiju markera koji karakterišu MSC koštane srži i slezine u uslovima hroničnog stresa (**Slika 4.15**, **Slika 4.17**). Ekspresija iRNK za fibronektin, vimentin, CD29, CD105 i  $\alpha$ -SMA MSC ćelija koštane srži je značajno povećana kod životinja koje su bile tretirane klodronat-lipozom i bile izložene *restraint* stresu u odnosu na kontrolne životinje i životinje koje su bile izložene samo *restraint* stresu ( $p < 0.001$ ) (**Slika 4.16**).



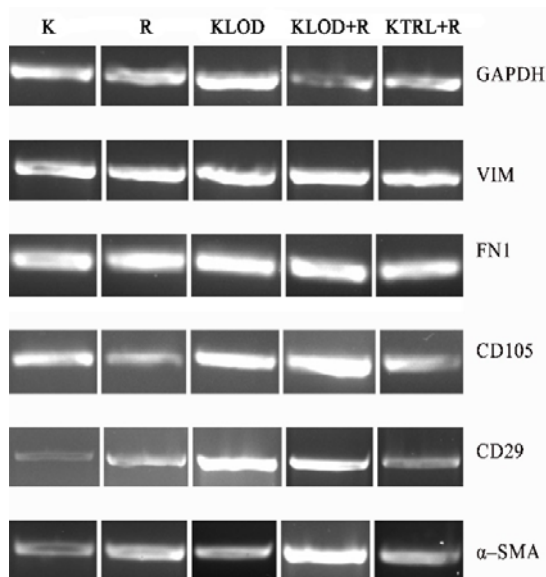
**Slika 4.15.** Konstitutivna i tretmanom idukovana ekspresija gena koji karakterišu MSC koštane srži. Ekspresija GAPDH je korišćena kao kontrola količine komplementarne DNK u uzorku. K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.



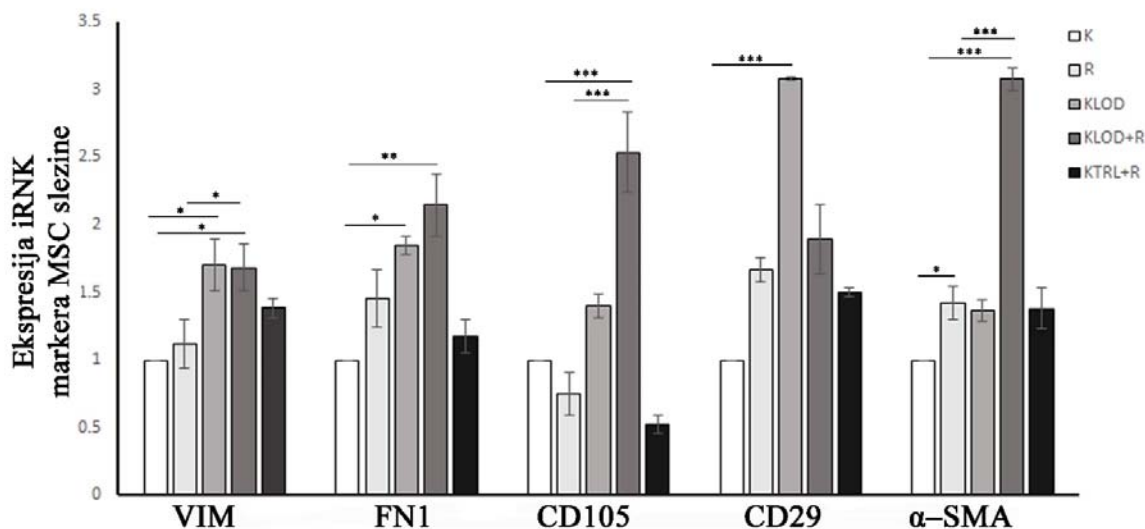
**Slika 4.16.** Ekspresija iRNK za vimentin, fibronektin, CD105, CD29 i α-SMA MSC koštane srži. \*\*\* $p < 0.001$ . K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

Tretman klodronat-lipozomom u bazalnim uslovima doveo je do statistički značajnog povećanja ekspresije iRNK CD29 molekula ( $p < 0.001$ ), fibronektina ( $p < 0.05$ ) i vimentina ( $p < 0.05$ ) u MSC ćelijama slezine. MSC slezine životinja koje su izložene *restraint* stresu pokazuju povećanu ekspresiju iRNK za αSMA ( $p < 0.05$ ), dok MSC slezine životinja, koje su pre izlaganja *restraint* stresu primile klodronat-lipozom, imaju povećanu ekspresiju iRNK za vimentin, α-SMA i CD105, u odnosu na mišve koji su bili izloženi samo *restraint* stresu i kontrolne životinje ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ),

dok je ekspresija iRNK za fibronektin povećana samo u odnosu na kontrolne životinje ( $p < 0.01$ ) (Slika 4.18).



**Slika 4.17.** Konstitutivna i tretmanom idukovana ekspresija gena koji karakterišu MSC slezine. Ekspresija GAPDH je korišćena kao kontrola količine komplementarne DNK u uzorku. K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

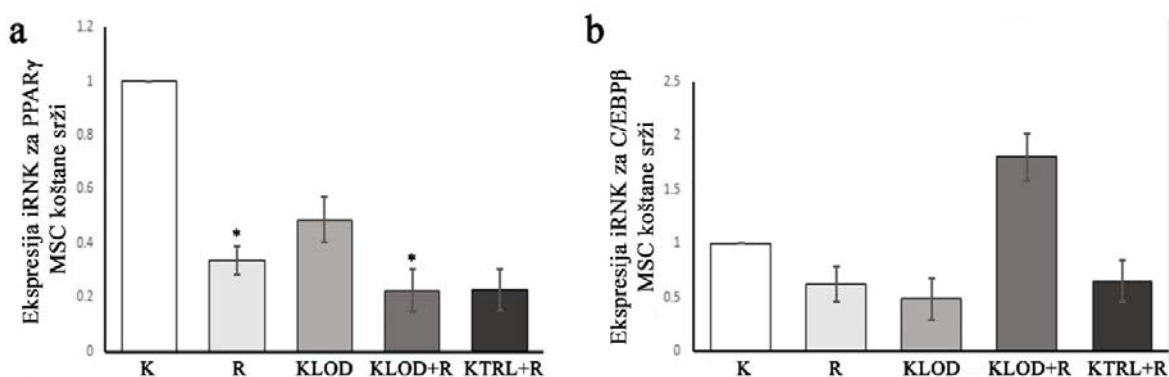


**Slika 4.18.** Ekspresija iRNK za vimentin, fibronektin, CD105, CD29 i α-SMA MSC slezine. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$ . K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

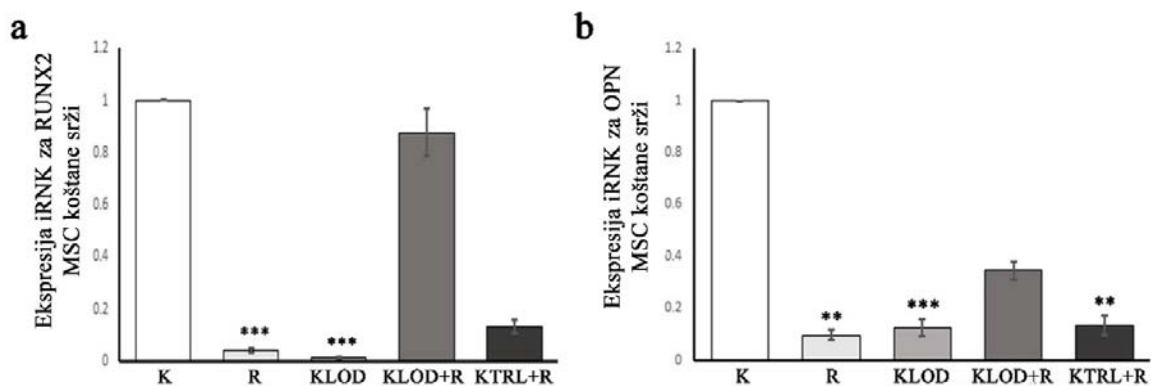
#### 4.2.5. Uticaj makrofaga na potencijal diferencijacije MSC tokom hroničnog stresa

U nastavku istaživanja hteli smo da ispitamo da li u uslovima ponavljalog psihološkog stresa makrofagi utiču na potencijal diferencijacije MSC koštane srži i slezine. Nakon izolovanja MSC iz kontrolnih i tretiranih životinja, ove ćelije smo postavili u osteogeni, odnosno, adipogeni medijum. Nakon inkubacije u medijumu za diferencijaciju ćelije su pokupljene radi određivanja ekspresije ogovarajućih gena, korišćenjem qRT-PCR. Sposobnost adipogene diferencijacije odredili smo na osnovu ekspresije iRNK za PPAR $\gamma$  i C/EBP $\beta$ , dok smo sposobnost osteogene diferencijacije odredili na osnovu ekspresije iRNK za RUNX2 i osteopontin.

Naši rezultati su pokazali da se tokom ponavljalog stresa kao i tokom hroničnog stresa koji se odvija u odsustvu makrofaga dolazi do statistički značajnog smanjenja ekspresije iRNK za PPAR $\gamma$  ( $p < 0.05$ ), dok sama deplecija makrofaga u bazalnim uslovima ne menja ekspresiju ovog gena u koštanoj srži (Slika 4.20a). Ekspresija C/EBP $\beta$  gena ostaje nepromenjena u MSC kontrolnih i tretiranih životinja u koštanoj srži (Slika 4.20b). Ponavljani stres i odsutvo makrofaga u bazalnim uslovima doveo je do smanjenje ekspresije iRNK za RUNX2 i osteopontin u MSC koštane srži ( $p < 0.001$ ), dok je ekspresija ovih gena ostala nepromenjena u ovim ćelijama u uslovima istovremenog stresa i deplecije makrofaga (Slika 4.21)

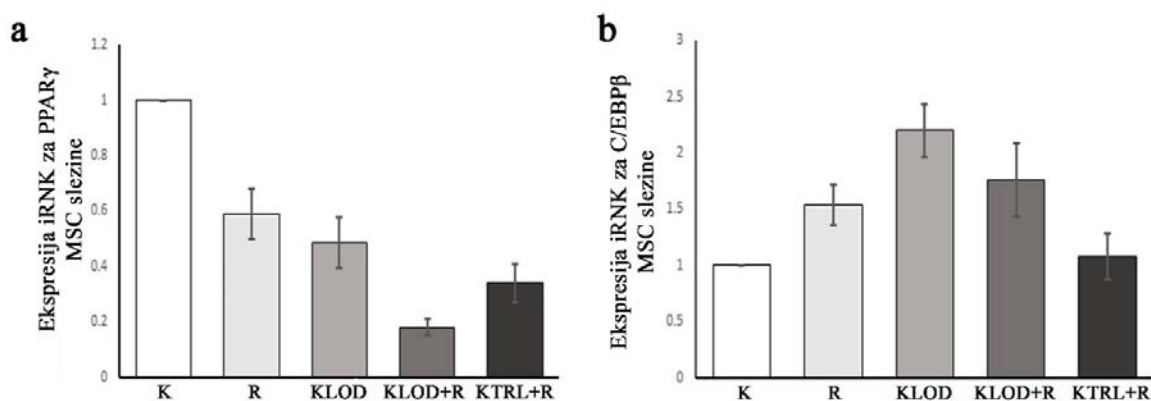


Slika 4.19. Ekspresija iRNK za PPAR $\gamma$  (a) i C/EBP $\beta$  (b) MSC koštane srži ispitivanih životinja, koje su kultivisane u medijumu za adipogenu diferencijaciju. Prikazane vredosti predstavljaju relativnu ekspresiju iRNK normalizovanu u odnosu na  $\beta$ -aktin i u poređenju sa kontrolom. \* $p < 0.05$ . K- kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

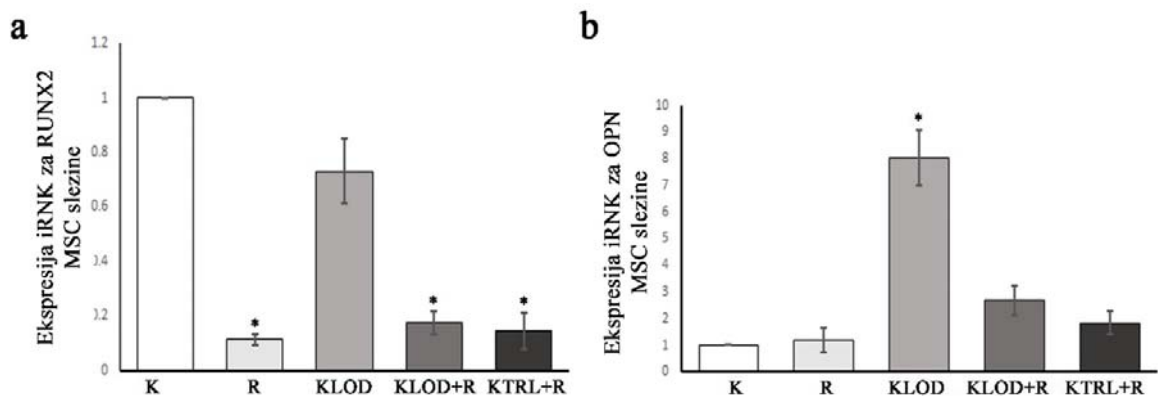


**Slika 4.20.** Ekspresija iRNK za *RUNX2* (a) i *OPN* (b) MSC koštane srži ispitivanih životinja, koje su kultivisane u medijumu za osteogenu diferencijaciju. Prikazane vredosti predstavljaju relativnu ekspresiju iRNK normalizovanu u odnosu na  $\beta$ -aktin i u poređenju sa kontrolom. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ . K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

Ekspresija gena za adipogenu diferencijaciju u MSC slezine ostaje nepromenjena u svim grupama (**Slika 4.21**), dok je iRNK za *RUNX* manje ekspimirana kod životinja koje su bile izložene *restraint* stresu kao i kod životinja koje su bile tretirane klodronat-lipozomom i bile izložene *restraint* stresu ( $p < 0.05$ ) (**Slika 4.22a**). Ekspresija iRNK za ostopontin u MSC slezine bila je povećana samo kod životinja koje su bile tretirane klodronat-lipozomom ( $p < 0.05$ ) (**Slika 4.22b**).



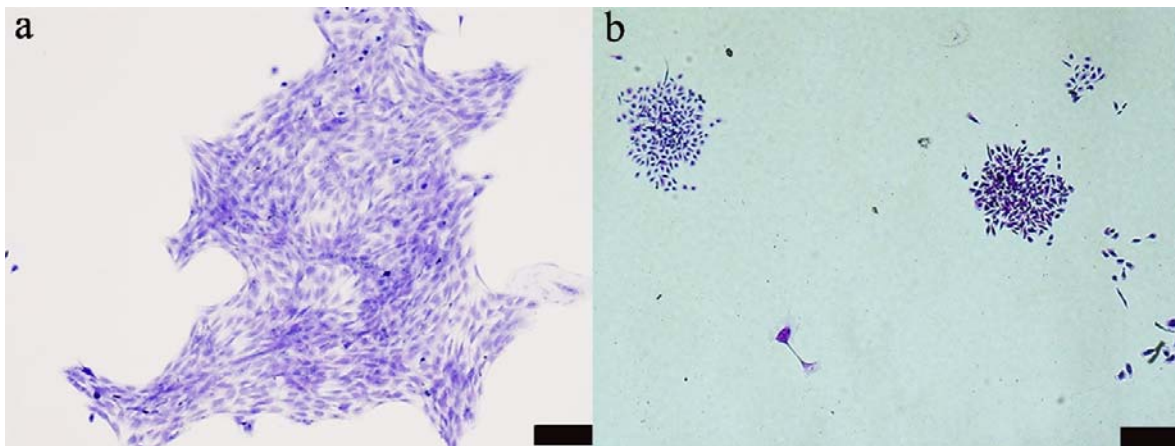
**Slika 4.21.** Ekspresija iRNK za *PPAR $\gamma$*  (a) i *C/EBP $\beta$*  (b) MSC slezine ispitivanih životinja, koje su kultivisane u medijumu za adipogenu diferencijaciju. Prikazane vredosti predstavljaju relativnu ekspresiju iRNK normalizovanu u odnosu na  $\beta$ -aktin i u poređenju sa kontrolom. K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.



**Slika 4.22.** Ekspresija iRNA za RUNX2 (a) i OPN (b) MSC slezine ispitivanih životinja, koje su kultivisane u medijumu za osteogenu diferencijaciju \* $p < 0.05$ . Prikazane vredosti predstavljaju relativnu ekspresiju iRNA normalizovanu u odnosu na  $\beta$ -aktin i u poređenju sa kontrolom. K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

#### 4.2.6. Uticaj makrofaga na klonogeni potencijal MSC tokom hroničnog stresa

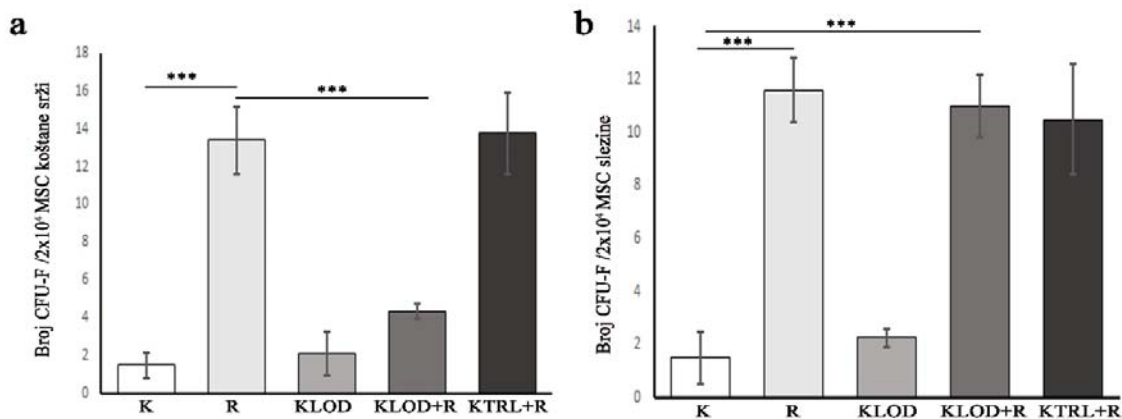
Ispitivanje klonogenog potencijala MSC izolovanih iz koštane srži i slezine tretiranih i kontrolnih životinja vršili smo korišćenjem CFU-F testa, odnosno, sposobnosti ovih ćelija da formiraju kolonije (Slika 4.23).



**Slika 4.23.** Reprezentativna slika izgleda kolonije koje formiraju MSC slezine (a) i koštane srži (b). Razmera 100 $\mu$ m (a) 200 $\mu$ m (b).

Naši rezultati su pokazali da MSC koštane srži i slezine imaju povećani klonogeni potencijal u uslovima ponovljanog izlaganja psihološkom stresu, pri čemu odsustvo makrofaga u koštanoj srži suprimira efekat stresa, dok u slezini odsustvo makrofaga ne menja klonogeni potencijal MSC tokom stresa (Slika 4.24).



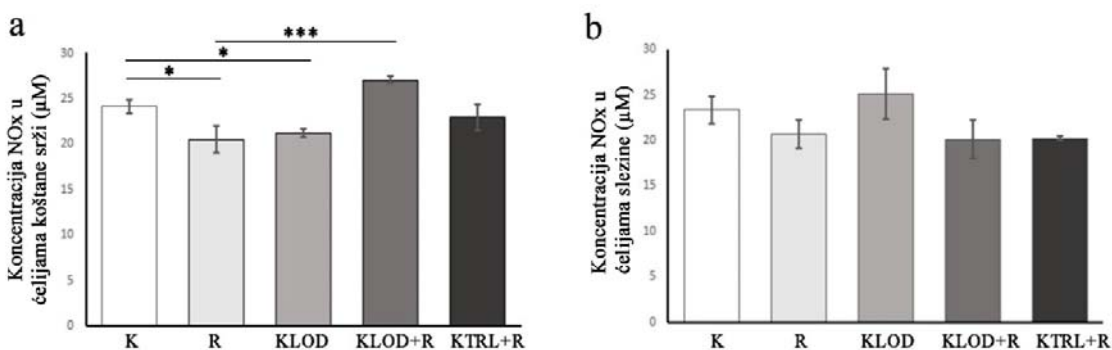


**Slika 4.24.** Uticaj deplecije makrofaga i stres eritrocitopoeze na klonogeni potencijal MSC koštane srži (a) i slezine (b). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost izbrojanih kolonija \*\*\* $p < 0.001$ . K- kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

### 4.3. ULOGA MAKROFAGA U REGULACIJI NO I ATP-a TOKOM SE

#### 4.3.1. Uticaj deplecije makrofaga na produkciju nitrata i nitrita tokom SE

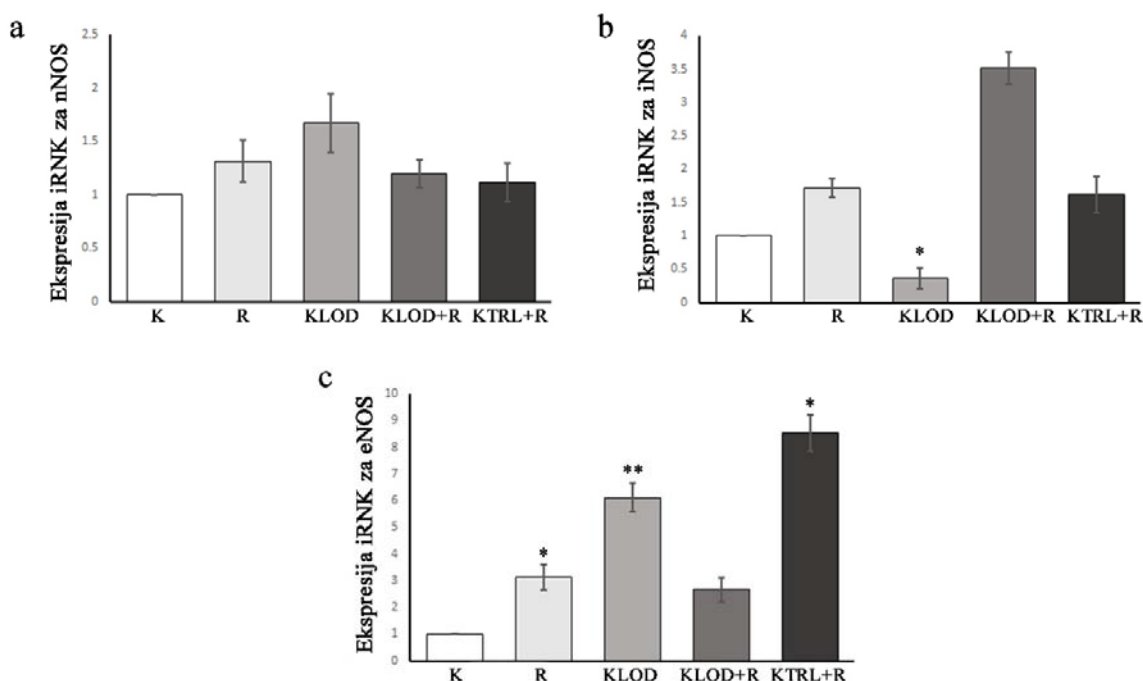
U cilju ispitivanja uloge NO u interakciji makrofaga sa MSC u ukupnim ćelijama koštane srži i slezine tretiranih i kontrolnih životinja određivali smo ukupnu produkciju nitrata i nitrita (NO<sub>x</sub>). Naša istraživanja su pokazala da tokom SE izazvane hroničnim psihološkim stresom dolazi do smanjene produkcije NO<sub>x</sub> u koštanoj srži ( $p < 0.05$ ), a da tretman klodronat-lipozomom poništava ovaj efekat stresa ( $p < 0.001$ ) (Slika 4.25a). Tretman klodronat-lipozomom u bazalnim uslovima dovodi do smanjene produkcije NO<sub>x</sub> u koštanoj srži ( $p < 0.05$ ). Za razliku od koštane srži, *restraint* stres u slezini, iako smanjenjuje produkciju NO<sub>x</sub>, ne postoji statistička značajnost i ovde deplecija makrofaga kako u bazalnim uslovima tako i tokom hroničnog stresa ne utiče značajno da produkciju NO<sub>x</sub> (Slika 4.25b).



**Slika 4.25.** Uticaj deplecije makrofaga na ukupnu produkciju nitrata i nitrita određeni Grisovom reakcijom u ukupnim ćelijama koštane srži (a) i slezine (b) \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ . K- kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

### 4.3.2. Uticaj deplecije makrofaga na ekspresiju NOS enzima u ćelijama koštane srži

Kako je jedan od glavnih izvora NO upravo njegova sinteza iz L-arginina, delovanjem enzima NOS-a odredili smo ekspresiju iRNK za nNOS, iNOS i eNOS u ukupnim ćelijama koštane srži kontrolnih i tretiranih životinja. Rezultati su pokazali da hronični psihološki stres izaziva povećanje ekspresije iRNK za eNOS ( $p < 0.05$ ) (Slika 4.26c). Tretman klodronat-lipozomima u bazalnim uslovima doveo je do smanjene ekspresije gena za iNOS ( $p < 0.05$ ) (Slika 4.26b) i povećane ekspresije za eNOS ( $p < 0.01$ ) (Slika 4.26c). Tretirane životinje nisu pokazale promenu u ekspresiji gena za nNOS u odnosu na kontrole (Slika 4.26a).

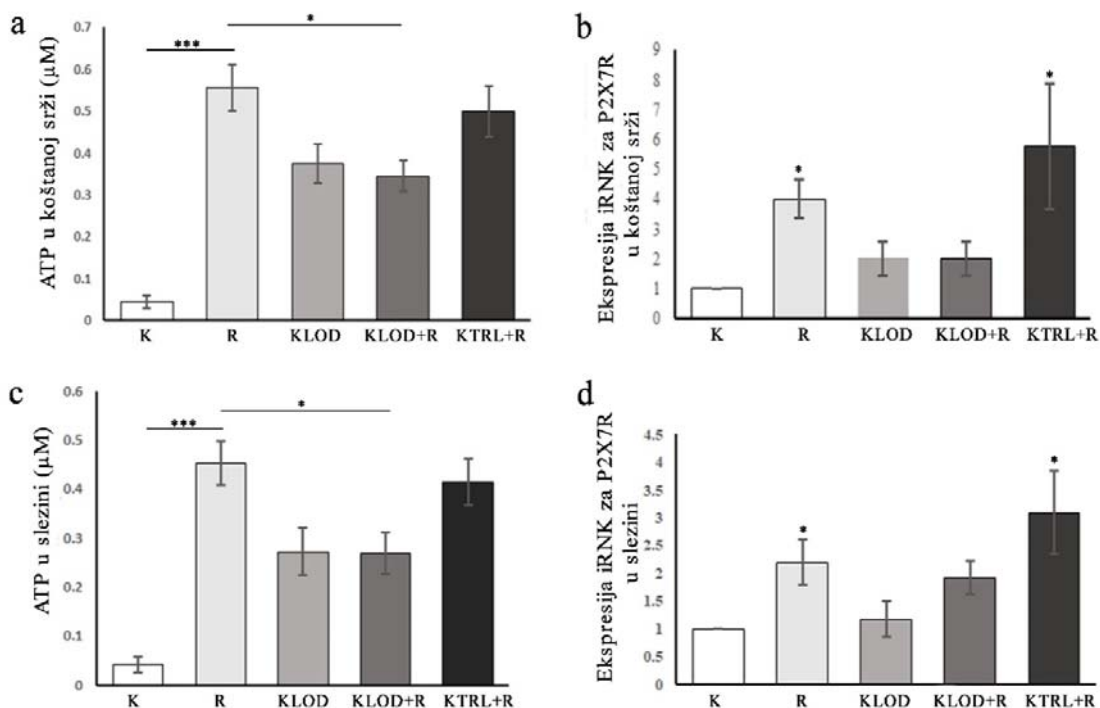


**Slika 4.26.** Normalizovana ekspresija enzima nNOS-a (a), iNOS-a (b) i eNOS-a (c) u ukupnim ćelijama koštane srži dobijena qRT-PCR. Prikazane vredosti predstavljaju relativnu ekspresiju iRNK normalizovanu u odnosu na  $\beta$ -aktin i u poređenju sa kontrolom \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . K- kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

### 4.3.3 Uticaj deplecije makrofaga na produkciju ATP i ekspresiju P2X7R tokom SE u koštanoj srži i slezini

Vanćelijski ATP, koji se oslobađa iz ćelija putem egzocitoze, vezuje se za receptor jonskih kanala P2X7, koji je široko ekspimiran u hematopoetskim matičnim/progenitorskim ćelijama i njihovim linijama, uključujući i makrofage. U okviru naših istraživanja ispitali smo kako *restraint* stres utiče na nivoe ATP-a i ekspresiju P2X7R u koštanoj srži i slezini. *Restraint* stres povećava nivo ekstracelularnog ATP-a u koštanoj srži (Slika 4.27a) i slezini (Slika 4.27c) ( $p < 0.001$ ). Deplecija makrofaga smanjila je ovo stresom-indukovano povećanje koncentracije vanćelijskog ATP-a u koštanoj srži i slezini i ( $p < 0.05$ ). Nakon izazivanja SE izlaganjem hroničnom psihološkim stresu, nivoi ekspresije gena P2X7R su značajno povećani u koštanoj srži (Slika 4.27b) i slezini (Slika 4.27d) ( $p < 0.05$ ). Tretman klodronatom nije promenio ekspresiju gena P2X7R u bazalnim uslovima, dok je sprečio povećanje ekspresije gena P2X7R izazvano stresom.

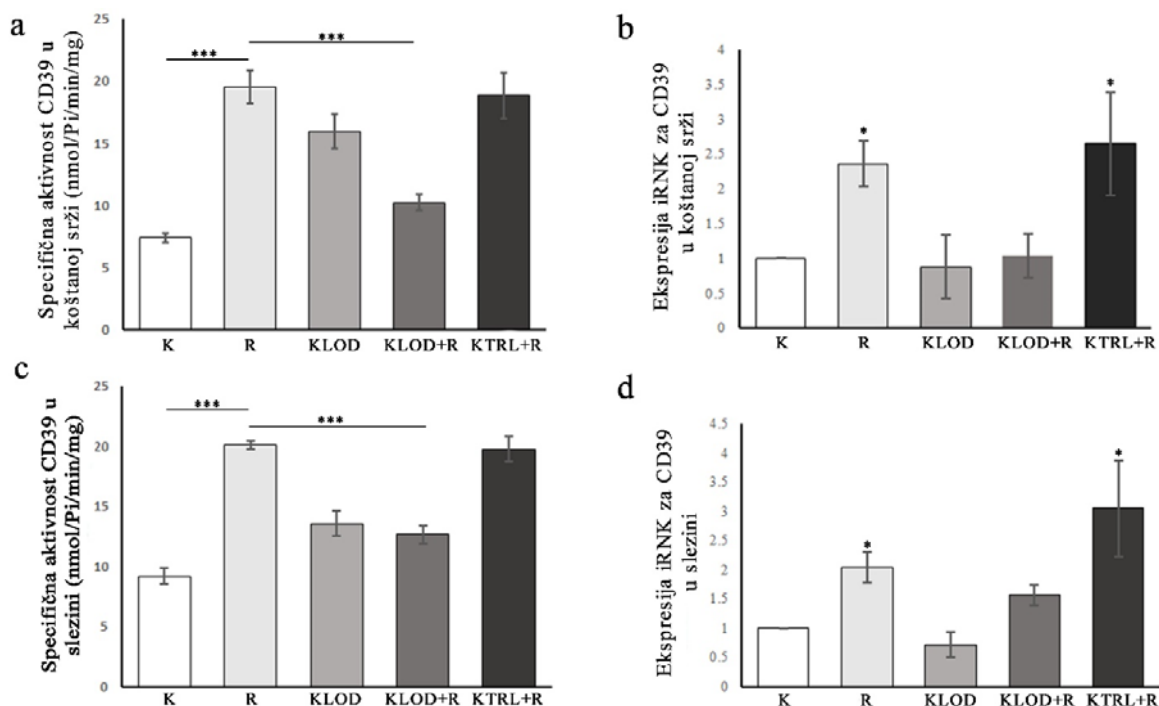




**Slika 4.27.** Uticaj hroničnog psihološkog stresa i deplecije makrofaga na produkciju ATP u ukupnim ćelijama koštane srži (a) i slezine (c) i ekspresiju iRNA za P2X7R u ukupnim ćelijama koštane srži (b) i slezine (d). Rezultati ekspresije gena predstavljaju relativnu ekspresiju iRNA normalizovani u odnosu na  $\beta$ -aktin i u poređenju sa kontrolom \*\*\* $p < 0.001$ , \* $p < 0.05$ . K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

#### 4.3.4. Uticaj deplecije makrofaga na aktivnost i ekspresiju CD39 enzima tokom SE u koštanoj srži i slezini

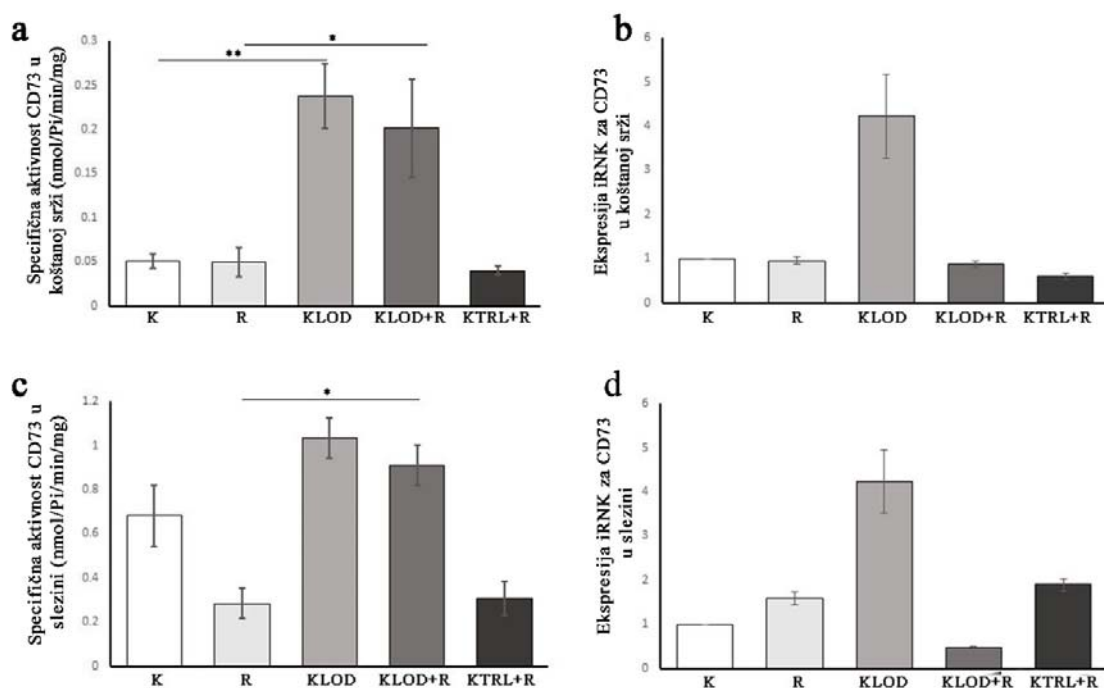
Kada se jednom oslobodi u vanćelijskom prostoru, ATP se brzo hidrolizuje enzimskom aktivnošću molekula CD39, da bi se održali fiziološki nivoi i sprečili patološki efekti izazvani vanćelijskim ATP-om. Stoga smo, takođe, analizirali efekte stresa na specifičnu aktivnost i ekspresiju CD39 u koštanoj srži i slezini. Povećana aktivnost CD39 detektovana je i u koštanoj srži (Slika 4.28a) i slezini (Slika 4.28c) miševa koji su bili izloženi *restraint* stresu ( $p < 0.001$ ), dok je deplecija makrofaga uklonila ovaj efekat stresa ( $p < 0.001$ ). Ekspresija CD39 je značajno povećana u koštanoj srži (Slika 4.28b) i slezini (Slika 4.28c) miševa koji su bili izloženi *restraint* stresu ( $p < 0.05$ ). Tretman klodronat-lipozomima nije promenio nivo ekspresije CD39 u bazalnim uslovima, ali je sprečio stresom-izazvano povećanje ekspresije CD39 u koštanoj srži i slezini.



**Slika 4.28.** Uticaj deplecije makrofaga na ekspresiju i aktivnost CD39 enzima. Specifična aktivnost enzima izražena u nmol/Pi/min/mg u koštanoj srži (a) i slezini (c)  $***p < 0,001$ . Relativna ekspresija iRNA za CD39 je normalizovani u odnosu na  $\beta$ -aktin i u poređenju sa kontrolom u ukupnim ćelijama koštane srži (b) i slezine (d)  $*p < 0,05$ . K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

#### 4.3.5. Uticaj deplecije makrofaga na aktivnost i ekspresiju CD73 enzima tokom SE u koštanoj srži i slezini

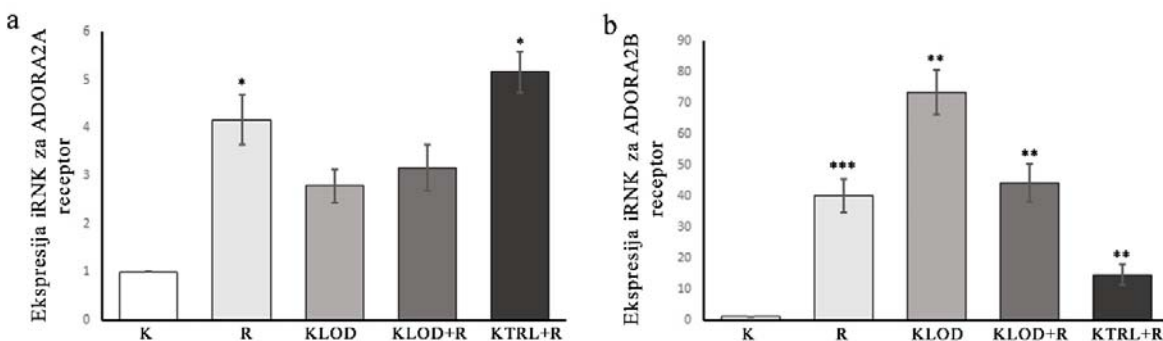
Nakon delovanja enzima CD39 nastaje ADP, a zatim AMP koji se hidrolizuje pod dejstvom enzima CD73 i na taj način nastaje adenozin. Naši rezultati su pokazali da hronični psihološki stres ne dovodi do promena specifične aktivnosti CD73 enzima u koštanoj srži (Slika 4.29a) i slezini (Slika 4.29c), dok je odsustvo makrofaga u uslovima stresa povećalo aktivnost CD73 enzima u koštanoj srži i slezini ( $p < 0.05$ ). Tretman klodronat-lipozomom u bazalnim uslovima dovelo je do povećane aktivnosti CD73 enzima u koštanoj srži ( $p < 0.01$ ). Ekspresija CD73 gena ostala je nepromenjena u svim grupama u odnosu na kotrolu u koštanoj srži (Slika 4.29b) i slezini (Slika 4.29d).



**Slika 4.29.** Uticaj deplecije makrofaga na ekspresiju i aktivnost CD73 enzima. Specifična aktivnost enzima izražena u nmol/Pi/min/mg u koštanoj srži (a) i slezini (c)  $**p<0.01$ ,  $*p<0.05$ . Relativna ekspresija iRNAK za CD73 je normalizovana u odnosu na  $\beta$ -aktin u ukupnim ćelijama koštane srži (b) i slezine (d). K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

#### 4.3.6. Uticaj deplecije makrofaga na ekspresiju ADORA2A i ADORA2B receptora tokom SE u koštanoj srži

Adenozin svoje dejstvo ispoljava vezivanjem za ADORA2A i ADORA2B receptore koji su se već pokazali kao značajni u regulaciji sazrevanja eritrocita i funkciji makrofaga. Stoga smo odredili ekspresiju ovih receptora u ćelijama koštane srži kontrolnih i tretiranih životinja. Hronični psihološki stres doveo je povećane ekspresije ADORA2A ( $p<0.05$ ) (Slika 4.30a) i ADORA2B ( $p<0.001$ ) (Slika 4.30b) receptora. Deplecija makrofaga smanjila je ovu povećanu ekspresiju ADORA2A receptora izazvanu stresom, ali ne i ADORA2B ( $p<0.01$ ). S druge strane, odsustvo makrofaga u bazalnim uslovima nije promenilo ekspresiju ADORA2A, ali je uzrokovalo povećanu ekspresiju ADORA2B receptora ( $p<0.01$ ).

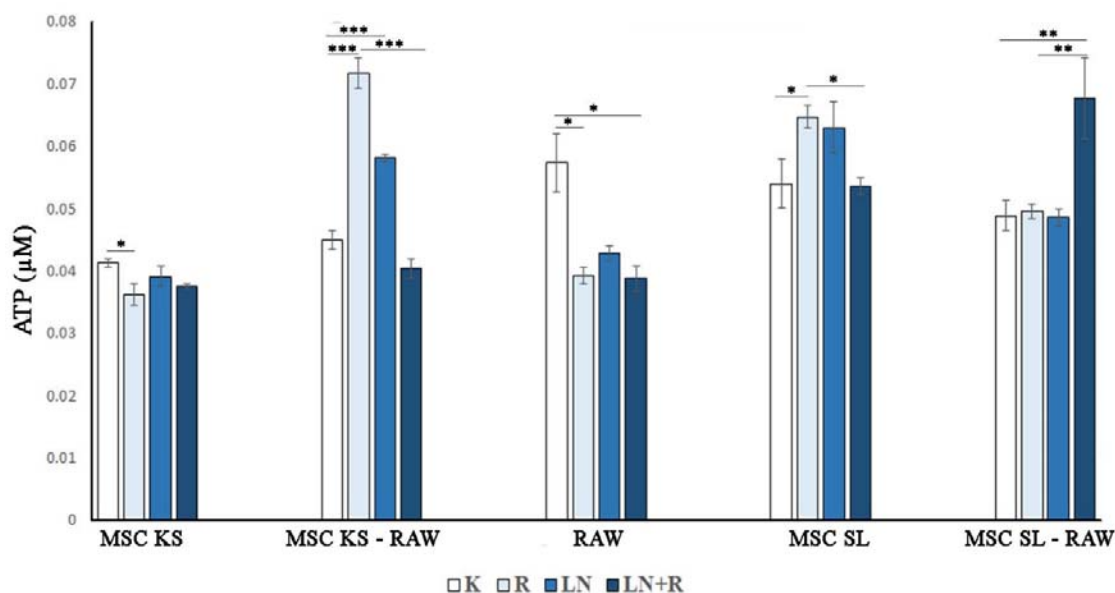


**Slika 4.30.** Ekspresija iRNK za ADORA2A (a) i ADORA2B (b) receptora u koštanoj srži ispitivanih životinja. Prikazane vredosti predstavljaju relativnu ekspresiju iRNK normalizovanu u odnosu na  $\beta$ -aktin \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ . K-kontrole, netretirane životinje; R-životinje izložene restraint stresu; KLOD-životinje kojima je dat klodronat-lipozom; KLOD+R- životinje kojima je dat klodronat-lipozom i koje su bile izložene restraint stresu; KTRL+R- životinje koje su primile kontrolni lipozom i bile izložene restraint stresu.

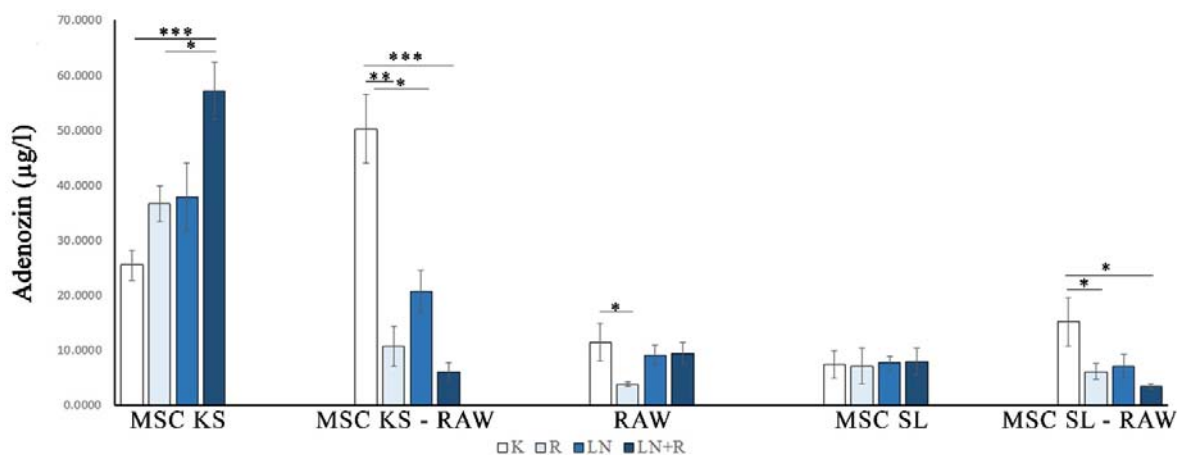
#### 4.4. ISPITIVANJE ULOGE NO, VANĀELIJSKIH NUKLEOTIDA I PURINERGIĀNOG SIGNALNOG SISTEMA U INTERAKCIJAMA MAKROFAGA SA MSC IZOLOVANIM IZ KOŠTANE SRŽI I SLEZINE MIŠA

##### 4.4.1. Uticaj blokade NOS-a na produkciju ATP-a i adenzina

U cilju ispitivanja povezanosti NO i purinergičke signalizacije u interakciji makrofaga i MSC, monokulture i ko-kulture MSC i RAW264.7 ćelija, tretirali smo blokatorom enzima azot-monoksid sintetaze (L-NAME). Uslove SE imitirali smo dodavanjem glavnih medijatora koritikosterona i EPO u koncentracijama dobijenim u našem *in vivo* modelu. Medijatori SE u ko-kulturi MSC koštane srži i RAW264.7 ćelija doveli su do povećane produkcije ATP-a ( $p < 0.001$ ), a blokada NOS-a poništila je efekat stresa ( $p < 0.001$ ). Tretman ovih ko-kultura samo blokatorom NOS-a izazvao je povećano oslobađanje ATP-a ( $p < 0.001$ ). U monokulturi MSC koštane srži medijatori SE su doveli do smanjenog oslobađanja ATP-a ( $p < 0.05$ ), isti efekat imao je i na monokulturu RAW264.7 ćelija ( $p < 0.05$ ). Za razliku od monokulture MSC koštane srži, u monokulturi MSC slezine medijatori SE su doveli do povećane produkcije ATP-a ( $p < 0.05$ ), a blokada NOS-a poništila je navedeni efekat ( $p < 0.05$ ). U ko-kulturi MSC slezine i RAW264.7 ćelija medijatori SE su uz blokadu NOS-a doveli do povećanog oslobađanja ATP-a ( $p < 0.01$ ) (Slika 4.31). Tretman medijatorima SE izazvao je smanjenu koncentraciju adenzina u ko-kulturi MSC koštane srži/slezine i RAW264.7 ćelija ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ ), a blokada NOS-a nije uticala na ovo smanjenje. Koncentracije adenzina bile su smanjene i u monokulturi MSC koštane srži koje su tretirane medijatorima SE i blokatorom NOS-a ( $p < 0.001$ ), dok su medijatori SE doveli do smanjenja koncentracije adenzina u monokulturi RAW264.7 ćelija ( $p < 0.05$ ) (Slika 4.32).



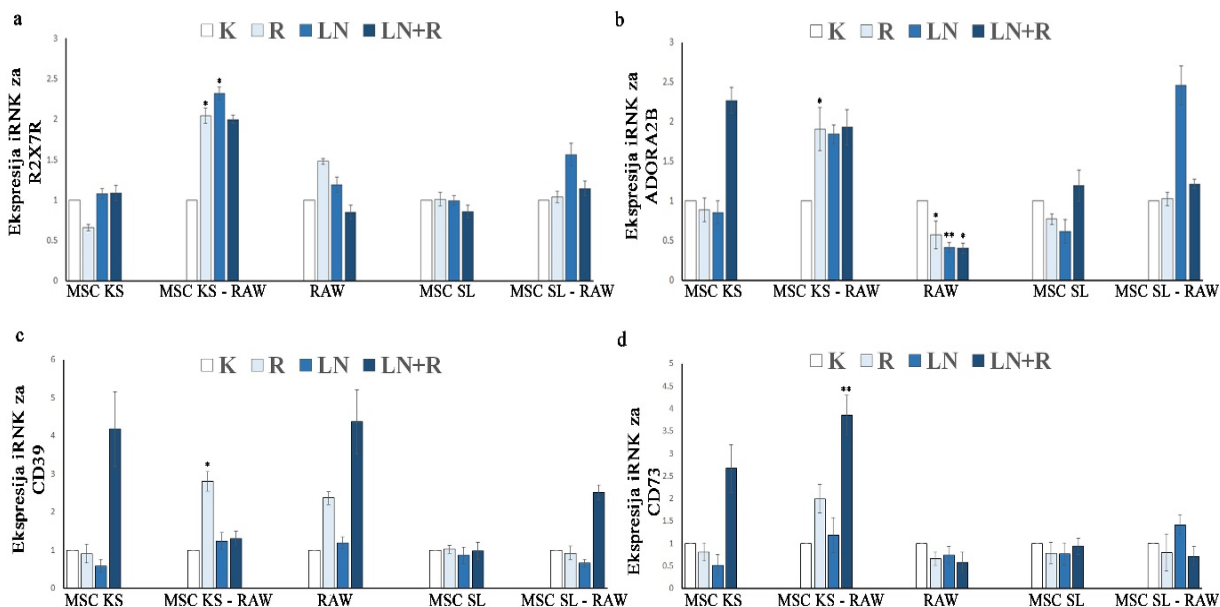
**Slika 4.31.** Koncentracija ATP ( $\mu\text{M}$ ) u monokulturama i ko-kulturama MSC koštane srži/slezine i RAW264.7 ćelija tretirane kortikosteronom, EPO i L-NAME \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . MSC KS - monokultura MSC koštane srži, MSC SL - monokultura MSC slezine, RAW - monokultura RAW264.7 ćelija. MSC KS-RAW- ko-kultura MSC koštane srži i RAW264.7 ćelija, MSC SL-RAW - ko-kultura MSC slezine i RAW264.7 ćelija. K-kontrola (netretirane), R - tretirane kortikosteronom i EPO, LN - tretirane L-NAME, LN+R- tretirane L-NAME, kortikosteron i EPO.



**Slika 4.32.** Koncentracija adenoizina ( $\mu\text{g/l}$ ) u monokulturama i ko-kulturama MSC koštane srži/slezine i RAW264.7 ćelija nakon tretmana kortikosteronom, EPO i L-NAME. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . MSC KS - monokultura MSC koštane srži, MSC SL - monokultura MSC slezine, RAW - monokultura RAW264.7 ćelija. MSC KS-RAW- ko-kultura MSC koštane srži i RAW264.7 ćelija, MSC SL-RAW - ko-kultura MSC slezine i RAW264.7 ćelija. K-kontrola (netretirane), R - tretirane kortikosteronom i eritropoetinom, LN - tretirane L-NAME, LN+R- tretirane L-NAME, kortikosteron i EPO.

#### 4.4.2. Uticaj blokade NOS-a na ekspresiju P2X7R, ADORA2B, CD39 i CD73

Kako smo pokazali da blokada enzima NOS-a utiče na produkciju ATP, hteli smo da ispitamo da li utiče i na ekspresiju ključnih enzima i receptora purinergičke signalizacije. Ko-kultura MSC koštane srži i RAW264.7 ćelija tretirane medijatorima SE pokazala je povećanu ekspresiju gena za P2X7R, ADORA2B i CD39 ( $p < 0,01$ ). Blokada NOS-a u ovim ko-kulturama u uslovima SE izazvala je samo povećanu ekspresiju CD73 gena ( $p < 0,01$ ), dok je samo tretman L-NAME izazvao povećanu iRNK za P2X7R ( $p < 0,01$ ). Ko-kultura MSC slezine i RAW264.7 ćelija i monokulture MSC koštane srži i slezine nisu pokazale promenu u ekspresiji ovih gena prilikom tretmana medijatorima SE i/ili blokatorom NOS enzima. ADORA2B receptor imao je smanjenu ekspresiju u monokulturi RAW264.7 ćelija koje su bile tretirane kortikosteronom, EPO-om i/ili blokatorom NOS-a ( $p < 0,05$ ) (Slika 4.33).



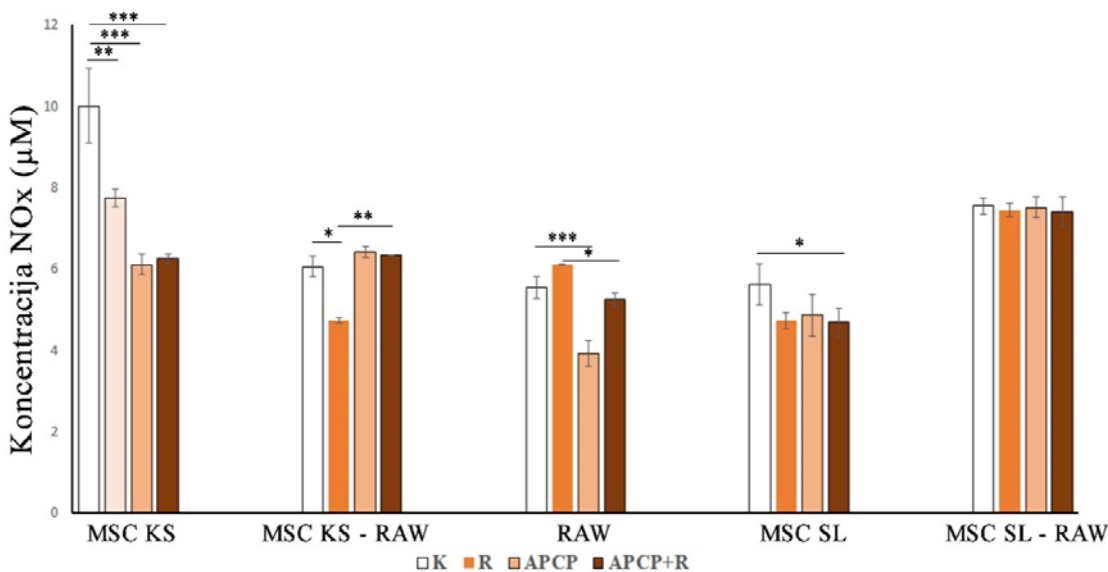
**Slika 4.33.** Normalizovana ekspresija iRNKA za P2X7R, ADORA2B, CD39 i CD73 u monokulturama i ko-kulturama MSC koštane srži/slezine i RAW264.7 ćelija tretirane kortikosteronom, EPO i L-NAME. Prikazane vredosti predstavljaju relativnu ekspresiju iRNK normalizovanu u odnosu na  $\beta$ -aktin i u poređenju sa kontrolom \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ . MSC KS - monokultura MSC koštane srži, MSC SL - monokultura MSC slezine, RAW - monokultura RAW264.7 ćelija. MSC KS-RAW- ko-kultura MSC koštane srži i RAW264.7 ćelija, MSC SL-RAW - ko-kultura MSC slezine i RAW264.7 ćelija. K-kontrola (netretirane), R - tretirane kortikosteronom i EPO, LN - tretirane L-NAME, LN+R- tretirane L-NAME, kortikosteron EPO.

#### 4.4.3. Uticaj blokade CD73 enzima na produkciju nitrata i nitrita

Kako bismo dodatno ispitali značaj purinergičke signalizacije i NO u intrakcijama makrofaga i MSC u uslovima SE, tretirali smo monokulture i ko-kulture inhibitorom CD73 enzima, a uslove SE imitirali smo dodavanjem kortikosterona i EPO. Uticaj blokade CD73 enzima u uslovima SE na NO ispitali smo određivanjem ukupne produkcije nitrata i nitrita u mono i ko-kulturama.

U ko-kulturi MSC koštane srži i RAW264.7 ćelija SE smanjila je oslobađanje NOx ( $p < 0,05$ ), dok je blokada CD73 enzima poništila ovaj efekat ( $p < 0,01$ ). Tretman medijatorima SE i/ili APCP u ko-kulturi MSC slezine i RAW264.7 ćelija nije izazvao promene u produkciji NOx.

MSC koštane srži pokazale su smanjenu produkciju NO<sub>x</sub> prilikom tretmana medijatorima SE i/ili APCP-om ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ ), dok je u monokulturi MSC slezine smanjenu produkciju NO<sub>x</sub> izazvala SE tek uz blokadu CD73 enzima ( $p < 0.05$ ). RAW264.7 ćelije nisu pokazale promenu u produkciji NO<sub>x</sub> u uslovima SE, ali je tretman APCP-om izazvao smanjenje NO<sub>x</sub> ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.05$ ) (Slika 4.34)

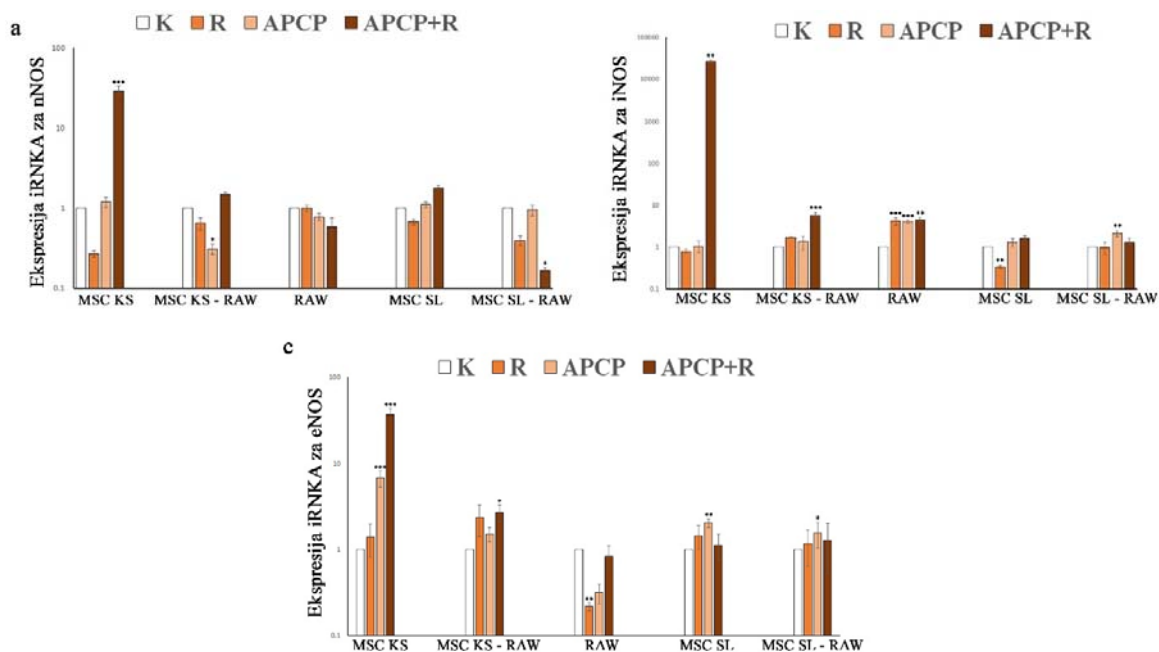


**Slika 4.34.** Uticaj stresa i blokade CD73 enzima na ukupnu produkciju nitrata i nitrita, određeni Grisovom reakcijom, u monokulturama i ko-kulturama \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ . MSC KS-monokultura MSC koštane srži, MSC SL-monokultura MSC slezine, RAW-monokultura RAW264.7 ćelija. MSC KS-RAW - ko-kultura MSC koštane srži i RAW264.7 ćelija, MSC SL-RAW - ko-kultura MSC slezine i RAW264.7 ćelija. K - kontrola (netretirane), R - tretirane kortikosteronom i EPO, APCP- tretirane APCPom, APCP+R- tretirane APCPom, kortikosteronom i EPO

#### 4.4.4. Uticaj blokade CD73 enzima na ekspresiju NOS-a

Uticaj CD73 enzima u regulaciji metabolizma NO tokom interakcije MSC sa makrofagima ispitali smo i na osnovu ekspresije nNOS-a (Slika 4.35a), iNOS-a (Slika 4.35b) i eNOS-a (Slika 4.35c) u mono i ko-kulturama tretiranim medijatorima SE i blokatorom CD73 enzima. Naši rezultati su pokazali da medijatori SE ne menjaju ekspresiju NOS-a u ko-kulturi, a dovodi do povećane ekspresije iNOSa ( $p < 0.001$ ) i smanjene ekspresije nNOSa ( $p < 0.01$ ) u monokulturi ćelijske linije makrofaga. Medijatori SE i APCP u ko-kulturi MSC koštane srži i RAW264.7 ćelija izazvali su povećanu ekspresiju iNOS-a ( $p < 0.001$ ) i eNOS-a ( $p < 0.05$ ), dok su u monokulturi MSC koštane srži izazvali povećanu ekspresiju sva tri NOS enzima ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ). U ko-kulturi MSC slezine i RAW264.7 ćelija SE i APCP doveli su do smanjene ekspresije nNOS-a ( $p < 0.05$ ).





**Slika 4.35.** Normalizovana ekspresija nNOS-a (a), iNOS-a (b) i eNOS-a (c) u mono i ko-kulturama MSC koštane srži/slezine i RAW264.7 ćelija tretirane kortikosteronom, EPO-om i APCP-om. Prikazane vredosti predstavljaju relativnu ekspresiju iRNK normalizovani u odnosu na  $\beta$ -aktin i u poređenju sa kontrolom. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ . MSC KS-monokultura MSC koštane srži, MSC SL-monokultura MSC slezine, RAW-monokultura RAW264.7 ćelija. MSC KS-RAW - ko-kultura MSC koštane srži i RAW264.7 ćelija, MSC SL-RAW - ko-kultura MSC slezine i RAW264.7 ćelija. K - kontrola (netretirane), R - tretirane kortikosteronom i EPO, APCP- tretirane APCPom, APCP+R- tretirane APCPom, kortikosteronom i EPO.



## 5. DISKUSIJA

Izloženost psihološkom stresu danas je postala svakodnevnica a izdvaja se i kao faktor rizika za razvoj mnogih hroničnih bolesti, uključujući kardiovaskularne bolesti, dijabetes i karcinom (*Lagraauw i sar., 2015; Merabet i sar., 2022; Vignjević Petrinović i sar., 2022*). Psihološki stres pokreće složenu interakciju između osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubreg, autonomnog i centralnog nervnog sistema, kao i njihovog uticaja na ciljne organe i tkiva. Za razliku od akutnog izlaganja stresoru, u okviru kojeg povećani nivoi glukokortikoidnih hormona potiskuju stresom-indukovano oslobađanje hipotalamusnih i hipofiznih hormona, omogućavajući da se se okonča odgovor na stres i ponovo uspostavi homeostaza, hronična izloženost psihološkom stresoru dovodi do supresije ili prekomerne stimulacije osovine hipotalamus-hipofiza-nadbubreg (*Herman i sar., 2016*). Ova osovina, bilo usled nedovoljne ili prekomerne stimulacije, nije u mogućnosti da optimalno reaguje na perzistentni stimulus i njena disregulacija u hroničnom stresu ima negativan uticaj na brojne organske sisteme i tkiva. Tako, jedno od osnovnih dejstava glukokortikoida, kao glavnih medijatora stresa, predstavlja njihov uticaj na hematopoezni sistem. Glukokortikoidi mogu ograničiti migraciju leukocita produkcijom različitih hemokina, regulisati protok krvi i indukovati apoptozu leukocita, utičući na taj način na njihov broj i distribuciju (*Penz i sar., 2018*). Saglasno sa tim, u eksperimentalnom modelu psihološkog stresa je pokazana izmenjena distribucija neutrofila i monocita u koštanoj srži, perifernoj krvi i slezini, koja je bila izraženija pri ponavljanom izlaganju stresoru (*Avitsur i sar., 2001*). Ukupan broj leukocita i njihovih subpopulacija u perifernoj krvi predstavlja jedan od osnovnih parametara za praćenje aktivacije imunskog sistema i pojave upalnog procesa (*Penz i sar., 2018*).

Hronični stres utiče na imunski sistem i smatra se jednim od glavnih pokretača upalnog procesa (*Dhabhar, 2014; Munshi i sar., 2020*). Makrofagi imaju ulogu u različitim fazama upalnog procesa, a poznato je da glukokortikoidi mogu regulisati brojne aspekte biologije makrofaga, uključujući diferencijaciju, aktivaciju, migraciju i polarizaciju (*Diaz-Jimenez i sar., 2021*). Pored uticaja stresa na distribuciju i funkciju leukocita, postoje dokazi koji pokazuju da hronični stres utiče i na eritrocitopoezu (*Voorhees i sar., 2013; Alamo i sar., 2017*). Pokazano je da ograničena pokretljivost miševa dovodi do razvoja psihološkog stresa (*McLaughlin i sar., 2007; Buynitsky and Mostofsky, 2009*), koji pak dovodi do anemije i stimuliše eritrocitopoezu u koštanoj srži i slezini (*Vignjević i sar., 2014; Vignjević Petrinović i sar., 2016*). Voorhees i sar. (2013) su dokazali da su efekti psihološkog stresa na eritrocitopoezu posredovani prevashodno glukokortikoidnim hormonima. Kako glukokortikoidi regulišu funkciju makrofaga, a makrofagi predstavljaju ćelije koje učestvuju u procesu eritrocitopoeze, hteli smo da ispitamo kako deplecija makrofaga utiče na eritrocitopoezu u uslovima hroničnog psihološkog stresa.

Analizom hematoloških parametra pokazali smo da smanjenje broja makrofaga klodronat-lipozomom dovodi do smanjenog broja cirkulišućih eritrocita, hematokrita i smanjenog nivoa hemoglobina u krvi, kako u bazalnim, tako i u uslovima hroničnog stresa. U skladu sa našim rezultatima, Bader i sar. (2019) su pokazali da tretman klodronatom dovodi do anemije smanjenjem apsolutnog nivoa hemoglobina i hematokrita kod miševa. Štaviše, smanjene koncentracije hemoglobina i eritrocita su demonstrirani kod miševa tretiranih klodronatom 7 dana nakon anemije izazvane flebotomijom (*Ramos i sar., 2013*). Naši rezultati su takođe pokazali značajno niži broj eritrocita i nivoa hemoglobina kod miševa koji su tretirani klodronat-liposomom i podvrgnuti *restraint* stresu u poređenju sa miševima koji su bili izloženi samo *restraint* stresu, što sugerise da nedostatak makrofaga značajno pogoršava anemiju u uslovima hroničnog stresa. Takođe, i psihološki stres i odsustvo makrofaga povećavaju proizvodnju hepcidina (*Theurl i sar., 2008; Zhao i sar., 2008*), što dovodi do značajnog smanjenja nivoa gvožđa u plazmi. Povećanje proizvodnje hepcidina izazvano klodronatom može dodatno inhibirati apsorpciju gvožđa iz ishrane, što dodatno pogoršava niske nivoa gvožđa u plazmi tokom hroničnog stresa (*Zhao i sar., 2008; Vignjević i sar., 2014*). Značajno smanjene koncentracije hemoglobina kod miševa tretiranih klodronatom i *restraint*

stresom, u poređenju sa miševima koji su bili podvrgnuti samo tretmanu klodronatom, pružaju dodatnu podršku ovoj hipotezi. Međutim, potrebna su dalja istraživanja u cilju razotkrivanja mehanizama regulacije međusobnog odnosa depoa gvožđa i eritrocitopoeze u uslovima stalnog stresa.

U koštanoj srži i slezini, eritrocitopoeza se javlja unutar eritroblastnih ostrva, karakterističnih niša u okviru kojih se odvija proliferacija, diferenciraja i enukleacija nezrelih eritroidnih ćelija (*Chasis i Mohandas, 2008*). Eritroidni progenitori, BFU-E i CFU-E, koje karakteriše sposobnost da se samoobnavljaju i diferenciraju, igraju ključnu ulogu u eritrocitopoezi (*Dulmovits i sar., 2017*). Stoga je regulacija njihove proliferacije složen proces vođen kooperativnim delovanjem različitih signala, uključujući SCF i EPO (*Munugalavadla i Kapur, 2005*). U uslovima povećane potrebe za eritrocitima, dodatni signali, kao što su BMP4, glukokortikoidi i GDF15, deluju sinergistički sa SCF i EPO da bi obezbedili ekstenzivnu ekspanziju eritroidnih progenitora (*Vignjevic i sar., 2015; Hao i sar., 2019; Paulson i sar., 2020*). Bauer i sar. (1999) su ustanovili da je aktivacija glukokortikoidnog receptora neophodan preduslov za povećanu produkciju eritrocita u stanju anemije i da glukokortikoidi stimulišu eritrocitopoezu delujući direktno na nezrele ćelije eritroidne loze. Ćelijski odgovor na stres je posredovan aktivacijom glukokortikoidnih receptora, tako da se ovi receptori nalaze u skoro svim ćelijama organizma, uključujući i nezrele eritroidne ćelije. Direktno dejstvo glukokortikoida na proliferaciju nezrelih ćelija eritroidne loze pokazala je studija Flygare i sar. (2011), istovremeno ukazujući na značaj sinergičkog delovanja glukokortikoidnih hormona sa ostalim sredinskim faktorima u cilju postizanja ubrzane i ekstenzivne proliferacije BFU-E ćelija (*Lee i sar., 2015*). Uzimajući u obzir da muskarinski acetilholinski receptor tip-4 negativno reguliše samoobnavljanje BFU-E (*Trivedi i sar., 2019*), kao i da psihološki stres smanjuje i ekspresiju u mesta vezivanja muskarinskih receptora na periferiji (*Mysliveček i sar., 2004; Myslivecek i sar., 2008*), ekstenzivna ekspanzija BFU-E ćelije u koštanoj srži i slezini miševa, koji su pod hroničnim stresom, mogu takođe biti rezultat smanjene signalizacije acetilholina. Makrofagi čine centralnu komponentu eritropoetske niše, a njihovo odsustvo u bazalnim uslovima nije promenilo broj ćelija BFU-E i CFU-E ni u koštanoj srži ni u slezini. Međutim, tretman klodronat-lipozomima je u potpunosti sprečio povećanje broja BFU-E i CFU-E ćelija izazvano stresom u koštanoj srži i slezini, što sugeriše da makrofagi predstavljaju ključne regulatore i glavni izvor lokalno proizvedenih signala za pojačanu proliferaciju eritroidnih progenitora tokom ponovljenog psihološkog stresa. Slično tome, hemijska ablacija makrofaga je u potpunosti prevenirala povećanu proliferaciju BFU-E ćelija slezine u modelu stres eritrocitopoeze kod policitemije vere (*Chow i sar., 2013*), kao i u stres eritrocitopoezi izazvanoj tumorom (*Liu i sar., 2015*).

Terminalnu diferencijaciju eritroidnih ćelija karakteriše progresivno smanjenje veličine ćelije, a analiza subpopulacija Ter119+ ćelija u koštanoj srži i slezini je otkrila da hronični stres povećava procenat većine nezrelih ćelija Ter119+ (E1) i u koštanoj srži i u slezini, dok je smanjio procenat zrelijih ćelija Ter119+ (E2) u koštanoj srži, kao i najzrelijih ćelija Ter119+ (E3) u slezini. Proliferacija i diferencijacija eritroidnih ćelija su visoko koordinisani procesi koji pokazuju inverzni odnos, a neki od ključnih signala za SE, kao što su SCF i glukokortikoidi, osim što izazivaju ekstenzivnu ekspanziju eritroidnih progenitora, mogu takođe da naruše terminalnu diferencijaciju eritrocita (*Stellacci i sar., 2009; Haas i sar., 2015*), što je rezultiralo smanjenim procentom zrelijih eritroidnih ćelija. Dakle, Stellacci i sar. (2009) su pokazali da glukokortikoidi inhibiraju sazrevanje eritroidnih ćelija membranskim mehanizmom koji ometa signalizaciju EpoR. Slično tome, u našim prethodnim istraživanjima pokazano je da dolazi do aktivacije glukokortikoidnih receptora i EpoR u slezini miševa izloženih hroničnom stresu (*Vignjević i sar., 2014*) ukazujući na fizičku interakciju između glukokortikoidnih receptora i EpoR tokom njihove aktivacije, što dodatno podržava hipotezu o mehanizmu kojim glukokortikoidni hormoni inhibiraju sazrevanje eritroidnih prekursora. U istraživanjima koja su predmet ove disertacije, odsustvo makrofaga je potpuno poništilo stresom izazvan povećan procenta najnezrelijih eritroidnih prekursora u okviru E1 subpopulacije, dok je

preokrenulo stresom izazvano smanjenje u procentu zrelijih E2 ćelija koštane srži, kao i stresom smanjen procenat najzrelijih E3 ćelija slezine, što ukazuje na značajan doprinos makrofaga u dobijenim promenama u sazrevanju eritroidnih prekursora tokom stresa. Shodno tome, Ramos i sar. (2013) su pokazali da makrofagi direktno stimulišu proliferaciju i ograničavaju enukleaciju ljudskih primarnih eritroblasta izolovanih iz krvi od pacijenata sa patološkom SE u  $\beta$ -talasemiji.

S obzirom na identifikaciju molekula BMP-4, kao ključnog signala za inicijaciju SE, indukovanu hroničnim psihološkim stresom (*Vignjević i sar., 2014*), ispitali smo kako odsustvo makrofaga, tokom hroničnog stresa, utiče na njegovu ekspresiju. Deplecija makrofaga, bilo u bazalnim uslovima ili u uslovima hroničnog psihološkog stresa, dovela je do povećane ekspresije ovog molekula u slezini. S obzirom da odsustvo makrofaga narušava proces sazrevanja eritrocita i dovodi do anemije, a anemija pokreće aktivaciju BMP4 molekula u slezini, deplecija makrofaga tokom hroničnog stresa može dodatno pogoršati stresom-indukovanu anemiju uzrokujući *circulus vitiosus*. Takođe, važno je napomenuti da BMP4 molekul podstiče polarizaciju makrofaga prema M2 tipu (*Martínez i sar., 2017*). S obzirom da hronični psihološki stres dovodi do nakupljanja M2 makrofaga u slezini (*Zheng i sar., 2023*), a da klodronat-lipozomi smanjuju broj ovih makrofaga, povećanje ekspresije BMP4 molekula može predstavljati kompenzatorni odgovor na depleciju makrofaga u hroničnom stresu. Pored toga, pokazano je da makrofagi, putem EPO, proizvode BMP4 molekul (*Millot i sar., 2010*), pa bi zaostali makrofagi u našem eksperimentalnom modelu mogli doprineti povećanju ekspresije ovog molekula.

MCP-1 je već prepoznat kao važan hemokin koji igra ključnu ulogu u brojnim patološkim stanjima kao što su kardiovaskularne bolesti, patologije mozga, poremećaji kostiju i zglobova, respiratorne infekcije, kancera i disfunkcija endotela. Uloga ovog hemokina je ključna u inflamaciji; MCP-1 se veže za svoj receptor CCR2 i time aktivira signalne puteve koji regulišu migraciju ćelija. Podsticanjem regrutacije leukocita, MCP-1 učestvuje u zaštitnim imunskim odgovorima tokom infekcija. MCP-1 utiče na aktivnost NF- $\kappa$ B, Akt signalnog puta, ERK puta i nekoliko drugih koji utiču na razvoj i progresiju bolesti, posebno tokom maligniteta (*Singh i sar., 2021*). Kako su skorija istraživanja Liao i sar. 2018 pokazala i njegovu ulogu u regrutaciji cirkulišućih monocita koji zatim učestvuju u formiranju novih EBI u slezini u uslovima narušene homeostaze jedan od ciljeva naših istraživanja bio je upravo ispitati ekspresiju ovog molekula u slezini usled hroničnog psihološkog stresa. Rezultati su po prvi put pokazali da hronični psihološki stres dovodi do povećane ekspresije ovog molekula u slezini. Uočeno povećanje ekspresije MCP-1 molekula u odsustvu makrofaga u bazalnim uslovima, kao i tokom hroničnog psihološkog stresa, može predstavljati sastavni deo mehanizama koji se aktiviraju u cilju nadoknade izgubljenih makrofaga, neophodnih za proces eritrocitopoeze. Iako BMP4 i MCP-1 imaju različite primarne funkcije, moguće je da postoji povezanost između njih u uslovima SE. BMP4 koji je ključan tokom SE i učestvuje i kao deo regenerativnog odgovora tkiva (*Pan i sar., 2023*), podstiče migraciju i diferencijaciju ćelija, uključujući monocite i makrofage, čiju mobilizaciju olakšava MCP-1. S druge strane, MCP-1 može privući ćelije imunog sistema (*Deshmane i sar., 2009*) koje su sposobne da luče faktore rasta poput BMP4 što može dodatno uticati na regulaciju SE. Razumevanje dinamike između BMP4, MCP-1, i drugih molekula u ovom procesu može pružiti uvid u mehanizme bolesti i potencijalne terapijske pristupe.

Pored MCP-1, u uslovima narušene homeostaze i procesu ekstramedularne hematopoeze značajnu ulogu ima i transkripcioni faktor TLX1, kojeg sintetišu i oslobađaju MSC slezine (*Oda i sar., 2018*). TLX1 je poznat i po svojoj ulozi u razvoju hematopoetskih ćelija a povezan je i sa nekim hematološkim bolestima. Na primer, visoka ekspresija TLX1 je karakteristična za određene tipove T-ćelijske leukemije, što ukazuje na njegovu ulogu u nekontrolisanoj proliferaciji i diferencijaciji hematopoetskih prekursora (*Bernard i sar., 2001*). Rezultati naših istraživanja su pokazali da dolazi do povećane ekspresije TLX1 u slezini hronično stresiranih životinja, ukazujući prvi put na značaj ovog transkripcionog faktora tokom SE koja je indukovana hroničnim

delovanjem psihološkog stresora. Nedostatak makrofaga u bazalnim uslovima i u uslovima stresa uzrokovao je povećanu ekspresiju ovog transkripcionog faktora, sugerišući na ulogu makrofaga u kontroli ekspresije TLX1 od strane MSC slezine. Pored toga, pokazano je da prekomerna ekspresija TLX1 dovodi do povećane ekspresije BMP4 molekula (*Oda i sar., 2018*) tako da bi ovo povećanje ekspresije TLX1 usled nedostatka makrofaga moglo predstavljati deo kompezatornog odgovora MSC slezine.

MSC se mogu izolovati iz različitih tkiva, kao što su koštana srž, tkivo pupčane vrpce, masno tkivo i tkivo placente. Odlikuju se morfologijom sličnom fibroblastima i potencijalom diferencijacije u hrskavicu, osteoblaste i adipocite (*Pittenger i sar., 1999; Zuk i sar., 2001; Parolini i sar., 2008*). Na osnovu navedenih karakteristika izolovali smo MSC iz koštane srži i slezine miša, pri čemu je poseban izazov predstavljala izolacija MSC iz slezine. Kako se MSC miša razlikuju u odnosu na humane, nakon treće pasaže odredili smo ekspresiju markera karakterističnih za MSC miša. Čelije izolovane iz slezine i koštane srži eksprimirale su markere karakteristične za MSC miša (*Sung i sar., 2008; Mojsilović, 2014*), dok istovremeno nisu pokazivale ekspresiju markera hematopoeznih ćelija. Izolovane ćelije su pokazale i sposobnost diferencijacije u osteoblaste i adipocite.

MSC imaju sposobnost modulacije imunskog odgovora i antiinflamatorne efekte u specifičnoj mikrosredini posredstvom interakcije sa drugim ćelijama i aktivacije brojnih signalnih puteva (*Meirelles i sar., 2009*). Učešće MSC u imunskom odgovoru odvija se prevashodno putem interakcija sa različitim ćelijama imunskog sistema (*Aggarwal i Pittenger, 2005; Müller i sar., 2021*) uključujući monocite i makrofage. S druge strane, makrofagi imaju sposobnost regulacije MSC. Kako MSC i makrofagi međusobno interreaguju kontrolišući različite procese u organizmu, naš cilj je bio da ispitamo njihovu povezanost u koštanoj srži i slezini tokom hroničnog izlaganja psihološkom stresoru.

Povećanje ekspresije markera za MSC u koštanoj srži u uslovima hroničnog psihološkog stresa i deplecije makrofaga ukazuju na činjenicu da makrofagi imaju sposobnost kontrole matičnosti ovih ćelija. Za razliku od MSC ćelija koštane srži, kod MSC slezine izostaje povećanje ekspresije markera CD29 u uslovima hroničnog psihološkog stresa uz smanjeno prisustvo makrofaga, sugerišući da i ostali faktori mikrosredine značajno utiču na karakteristike MSC u slezini. Kako je pokazano da CD29 ima ulogu u regulaciji migracije MSC (*Ode i sar., 2011*), odsustvo značajne promene u ekspresiji ovog markera može doprineti inhibiciji migracije MSC iz slezine u toku hroničnog stresa. Ovo je u skladu i sa rezultatima koji pokazuju da je migracija MSC inhibirana u uslovima stresa usled delovanja kortikosterona (*Zhang i sar., 2015*). Značaj mikrosredine na karakterizaciju MSC pokazan je i u našem eksperimentalnom modelu psihološkog stresa, imajući u vidu da tokom hroničnog psihološkog stresa nisu detektovane značajne promene u ekspresiji markera za karakterizaciju MSC u koštanoj srži, dok u slezini dolazi do povećanja ekspresije  $\alpha$ -SMA molekula. Izostanak povećane ekspresije markera za MSC u koštanoj srži tokom hroničnog stresa može biti posledica njihove mobilizacije iz koštane srži u uslovima narušene homeostaze (*Koning i sar., 2013; Girousse i sar., 2021*), dok je stresom-indukovano povećanje ekspresije gena za  $\alpha$ -SMA u slezini u skladu sa rezultatima prethodnih istraživanja koji su pokazali da BMP4 povećava ekspresiju ovog molekula (*Boyd i sar., 2007; Perera i sar., 2020*). Povećanje ekspresije iRNK za vimentin, fibronektin i CD29 u MSC slezine, koje je izazvano deplecijom makrofaga u bazalnim uslovima, ukazuje na aktivaciju kompezatornog odgovora, imajući u vidu da ovi molekuli učestvuju u sazrevanju, migraciji, adheziji i diferencijaciji makrofaga (*Beneš i sar., 2006*).

Dalja istraživanja su bila usmerena na ispitivanje uticaja hroničnog stresa na klonogeni potencijal MSC, samostalno i u kombinaciji sa deplecijom makrofaga. Literaturni podaci o uticaju hroničnog psihološkog stresa na klonogeni potencijal MSC su veoma oskudni. U okviru našeg

istraživanja pokazali smo da hronični psihološki stres povećava klonogeni potencijal MSC izolovanih iz koštane srži i slezine. Povećan klonogeni potencijal MSC uz nepromenenu ekspresiju markera karakterističnih za MSC, može predstavljati dodatnu potvrdu hipoteze o mobilizaciji MSC iz koštane srži tokom hroničnog stresa (*Gao i sar., 2021*). S obzirom da je IL-6 jedan od medijatora stresa (*Cheng i sar., 2015*) citokina koji sintetišu M2 makrofagi (*Casella i sar., 2016*) i da ima pozitivan uticaj na klonogeni potencijal MSC (*Pricola i sar., 2009*), mogao bi biti jedan od mehanizama delovanja hroničnog psihološkog stresa na klonogeni potencijal MSC. Naši rezultati su pokazali da u uslovima deplecije makrofaga efekat hroničnog psihološkog stresa na klonogeni potencijal MSC koštane srži izostaje, što svakako ukazuje da makrofagi kontrolišu klonogeni potencijal MSC koštane srži u hroničnom stresu. U slezini hronični psihološki stres održava povećani klonogeni potencijal MSC i u nedostatku makrofaga, sugerišući na ključni značaj tkivne mikrosredine. Budući da BMP4 stimuliše proliferaciju i samoodrživost MSC (*Mazaheri i sar., 2011; Chen i sar., 2021;*), povećana ekspresija BMP4 bi se mogla pozitivno odraziti na njihov klonogeni potencijal. MCP-1 bi mogao biti jedan od faktora koji utiču na klonogeni potencijal MSC, pre svega moduliranjem mikrokruženja unutar tkiva tako što privlači monocite i makrofage koji mogu sekretovati faktore rasta i citokine, a onda sekretovani faktori mogu stvarati povoljnije okruženje za rast i širenje MSC, indirektno podstičući njihov klonogeni potencijal (*Chen i sar., 2015*). Ovakva pretpostavka je u saglasnosti sa našim istraživanjima da u uslovima SE izazvanim hroničnim psihološkim stresom postoji povećana ekspresija MCP-1 u slezini koja je istovremeno praćena i povećanim klonogenim potencijalom MSC. Poznavanje kako MCP-1 utiče na klonogeni potencijal MSC može pomoći u razvoju efikasnijih terapija za regeneraciju tkiva i lečenje različitih bolesti. Na primer, modulacija nivoa MCP-1 u mikrokruženju transplantiranih MSC može optimizovati njihovu proliferaciju i funkciju u ciljnom tkivu, poboljšavajući ishode terapije.

Povećani klonogeni potencijal MSC ćelija kako u uslovima SE tako i u uslovima SE sa deplecijom makrofaga mogla bi biti povezana i sa delovanjem TLX1 transkripcionog faktora. Uprkos značajnom interesovanju za TLX1 u kontekstu leukemije, relativno malo je poznato o njegovom uticaju na MSC. Ono što se zna je da TLX1 utiče na pojedine MSC tokom embrionalnog razvoja (*Pineault i sar., 2019*). Kako TLX1 funkcioniše kao transkripcioni faktor koji može aktivirati ili suprimirati izražavanje ciljnih gena. U kontekstu MSC TLX1 bi mogao regulisati gene koji su ključni za održavanje stemnosti, proliferaciju ili diferencijaciju, što direktno utiče na njihov klonogeni potencijal. TLX1 utiče i na rast i razvoj ćelija kontrolisanjem faze ćeliskog ciklusa tj. može promovisati ili inhibirati prelazak ćelija kroz G1/S fazu ćelijskog ciklusa (*Riz i sar., 2005*). što ukazuje da može uticati i na regulaciju ćelijskog ciklusa MSC.

Ključni faktori adipogene transkripcije, PPAR $\gamma$  i C/EBP $\beta$ , saraduju u aktivaciji programa gena adipogene diferencijacije (*Tang i sar., 1999*) tako da promena u ekspresiji bilo kog gena može narušiti proces diferencijacije. S obzirom da su naši rezultati pokazali smanjenu sposobnost adipogene diferencijacije u *restraint* stresu kao i *restraint* stresu uz depleciju makrofaga, može se zaključiti da makrofagi ne daju značajan doprinos kontroli ekspresije gena za adipogenu diferencijaciju u koštanoj srži. Smanjen potencijal adipogene diferencijacije može biti posledica povećane matičnosti MSC u uslovima stresa, kao i delovanja EPO, čije su koncentracije povećane u hroničnom stresu (*Vignjević i sar., 2014*), a koji inhibira adipogenu diferencijaciju (*Suresh i sar., 2020*). Iako glukokortikoidni hormon, kao glavni medijator stresa, stimuliše adipogenu diferencijaciju, u okviru naših istraživanja smo pokazali da u uslovima stresa izostaje efekat glukokortikoida na adipogenu diferencijaciju MSC, očigledno kao posledica delovanja mnogih drugih faktora mikrosredine. U skladu sa tim, rezultati prethodnih istraživanja su ukazali na ulogu TGF- $\beta$ , kao markera hronične inflamacije i stresa u suprimiranju adipogene diferencijacije, dovodeći do smanjenja ekspresije ranih markera PPAR $\gamma$  i C/EBP (*Choy i sar., 2003; Das i sar., 2022*). Pored toga Zhang i sar. (2008) su pokazali da glukokortikoidni indukovani leucin zipper protein inhibira adipogenu diferencijaciju. Za razliku od MSC ćelija koštane srži, MSC izolovane iz slezine miševa nisu pokazale promene u ekspresiji gena za adipogenu diferencijaciju, dodatno

potvrđujući značaj mikrosredine i potencijalnu ulogu BMP4 molekula, koji, za razliku od EPO, stimuliše adipogenu diferencijaciju (*Modica i Wolfrum, 2017*). Odsustvo u promeni ekspresije gena adipogene diferencijacije MSC slezine ustvari predstavlja rezultat delovanja većeg broja faktora u mikrosredini slezine. S obzirom da istraživanja u okviru ove disertacije pokazuju da u slezini postoji povećana ekspresija MCP-1 molekula i TLX1 transkripcionog faktora tokom SE, moguće je da su i oni odgovorni za održivu adipogenu diferencijaciju. Iako direktni dokazi o ulozi TLX1 u adipogenoj diferencijaciji MSC nisu široko dokumentovani, TLX1 bi mogao uticati na transkripciju gena koji su ključni za adipogenu diferencijaciju. Na primer, promovisanje ili inhibicija faktora koji su direktno uključeni u adipogenezu, kao što su PPAR $\gamma$  ili C/EBP $\alpha$ , može uticati na sposobnost MSC da se diferenciraju u adipocite (*Rosen & MacDougald, 2006*). S druge strane, za MCP-1 je poznato da deluje putem svog receptora CCR2, koji može aktivirati različite signalne puteve uključene u proliferaciju, migraciju i diferencijaciju MSC. Studije su pokazale da aktivacija CCR2 može imati efekte na adipogenu diferencijaciju, stimulisanjem puteva koji favorizuju akumulaciju lipida i formiranje adipocita (*Sartipy i sar., 2003*).

Negativan uticaj medijatora SE, EPO i glukokortikoida na potencijal diferencijacije MSC (*Rauch i sar., 2010; Suresh i sar., 2019*) u saglasnosti je i sa našim rezultatima da stres suprimira ekspresiju gena osteogene diferencijacije. Pokazali smo da potencijal osteogene diferencijacije u koštanoj srži zavisi od prisustva makrofaga, pri čemu makrofagi predstavljaju negativne regulatore gena osteogene diferencijacije tokom stresa. U skladu sa tim, istraživanja Dresner-Pollak i sar. (2004) navode da nedostatak IL-10, kao glavnog medijatora M2 makrofaga, dovodi do osteopenije. MSC slezine izolovane iz miševa podvrgnutih *restraint* stresu i *restraint* stresu uz depleciju makrofaga, koje su bile kultivisane u medijumu za osteogenu diferencijaciju, pokazale su smanjenu ekspresiju RUNX2 gena ukazujući da makrofagi slezine nemaju ključnu ulogu u kontroli diferencijacije MSC. Povećana ekspresija OPN kod MSC izolovanih iz slezine miša kojima nedostaju makrofagi može biti posledica uloge osteopontina u migraciji monocita (*Shi i sar., 2018*). Uzimajući u obzir rezultate naših istraživanja koji ukazuju na povećanu ekspresiju molekula BMP4, MCP-1 i TLX1 u SE, i podatke iz literature o uticaju ovih faktora na potencijal diferencijacije MSC, može se doći do zaključka da su upravo ovi faktori odgovorni za formiranje specijalnih uslova mikrosredine koji modulišu osteogeni potencijal ovih ćelija. BMP4 je poznat kao ključan faktor koji promovise osteogenu diferencijaciju MSC, ali postoje i dokazi koji ukazuju na njegovu ulogu kao negativnog regulatora u određenim kontekstima. Iako je opšteprihvaćeno da BMP4 uglavnom stimuliše formiranje kosti, kompleksnost bioloških puteva i interakcija unutar ćelija može dovesti do inhibitornih efekata BMP4 na osteogenu diferencijaciju. BMP4 može aktivirati različite signalne puteve, uključujući one koji indukuju aktivaciju konkurentne signalizacije ili negativnu povratnu spregu, koja može inhibirati osteogenezu. Na primer, BMP4 može indukovati ekspresiju određenih inhibitora signalnih puteva, kao što su Smad6 i Smad7, koji su poznati kao inhibitori BMP signalizacije. Ovi proteini se mogu vezati za BMP receptore ili Smad proteine, sprečavajući ih da efikasno prenesu signal potreban za osteogenu diferencijaciju (*Ishidou i sar., 1995*). Takođe, BMP4 može uticati na delovanje drugih faktora rasta koji su ključni za osteogenezu. Na primer, visoki nivoi BMP4 mogu antagonizirati delovanje faktora poput FGF2, koji je takođe važan za promociju osteogene diferencijacije. Ova vrsta antagonizma može dovesti do smanjene osteogene diferencijacije pod određenim uslovima (*Marie, 2003*). MCP-1 može interferirati sa signalnim putevima koji su ključni za osteogenu diferencijaciju. Pa tako tokom inflamcije delovanjem NF- $\kappa$ B suprimira se osteogeni potencijal MSC inhibiranjem ključnih transkripcionih faktora potrebnih za razvoj osteoblasta (*Lin i sar., 2016*) MCP-1 može uticati na mikrookruženje MSC tako što favorizuje upalno stanje koje nije pogodno za osteogenezu. Prekomerna ili produžena inflamcija može rezultirati fibrozom ili drugim promenama u tkivu, koje negativno utiču na sposobnost MSC da se diferenciraju u osteoblaste (*Gu i sar., 2022*). O ulozi TLX1 transkripcionog faktora tokom osteogene diferencijacije se malo zna. Uzimajući u obzir saznanje o važnosti TLX1 u razvoju embrionalnog skeleta kao i da adultne MSC ekspresiraju TLX1 i da njegovo odsustvo inhibira

ostegenu diferencijaciju (*Pineault i sar., 2019*) može se zaključiti da ovaj transkripcioni faktor utiče na osteogeni potencijal MSC.

Imajući u vidu da psihološki stres menja produkciju NO u različitim tkivima (*Eskiocak i sar., 2006; Gądek-Michalska i sar., 2012*), kao i činjenicu da NO utiče na eritrocitopoezu (*Krstić i sar., 2010; Ikuta i sar., 2016*), u sklopu ove doktorske disertacije ispitivana je ukupna produkcija NOx i genska ekspresija NOS enzima u koštanoj srži tretiranih i kontrolnih životinja. Naša istraživanja su pokazala da hronični psihološki stres dovodi do smanjene produkcije NOx u koštanoj srži, što može biti posledica delovanja glukokortikoidnih hormona na različite ćelije u mikrosredini koštane srži (*Wang i sar., 2017*). Naime, studija Wang i sar. (2017) je ukazala na inhibitorno dejstvo glukokortikoida na produkciju NO u makrofagima tokom infekcije. Takođe, rezultati prethodnih studija su pokazali da glukokortikoidi inhibiraju produkciju NO u endotelnim ćelijama (*Ong i Whitworth, 2012*), neutrofilima (*McCall i sar., 1991*), monocitima (*Ehrchen i sar., 2019*), glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova (*Katsuyama i sar., 1999*) itd. S obzirom da NO deluje inhibitorno na rast eritroidnih progenitora, smanjena produkcija ovog molekula može biti jedan od mehanizama kojim glukokortikoidi povećavaju broj BFU-E i CFU-E ćelija u hroničnom stresu. U okviru naših istraživanja, deplecija makrofaga je poništila efekat hroničnog stresa na produkciju NOx u koštanoj srži ukazujući na značajnu ulogu makrofaga u regulaciji produkcije NOx tokom hroničnog stresa. Takođe, pokazali smo da stres ne menja ekspresiju nNOS-a i iNOS-a, ali povećava ekspresiju eNOS-a u koštanoj srži. Povećana ekspresija eNOS-a u koštanoj srži hronično stresiranih miševa može biti rezultat delovanja EPO, kao jednog od ključnih medijatora SE (*Santhanam i sar., 2006*), čije su koncentracije značajno povišene u našem eksperimentalnom modelu (*Vignjević i sar., 2014*). Iako je u brojnim studijama pokazano da u uslovima stresa, naročito akutnog, dolazi do povećane ekspresije iNOS-a (*Madrigal i sar., 2001; Kumar i Chanana, 2017*), rezultati najnovijih istraživanja pokazuju da se u procesu SE aktivira i nuklearni faktor 2 sličan eritroidu (eng. nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) koji dovodi do nishodne regulacije iNOS-a i time inhibira produkciju NO (*Ruan i sar., 2023*). Smanjena ekspresija iNOS-a u koštanoj srži usled deplecije makrofaga ukazuje na značajnu ulogu makrofaga u produkciji NO putem iNOSa u bazalnim uslovima, dok nepromenjena ekspresija ovog enzima u uslovima hroničnog stresa i deplecije makrofaga sugerise da u uslovima narušene homeostaze, pored makrofaga, i druge ćelije unutar mikrosredine koštane srži indukuju sintezu ovog proteina. Tako je pokazano da tokom SE koja nastaje u odgovoru na anemiju uzrokovanu inflamacijom, SEP imaju značajno povećanu ekspresiju iNOS-a (*Ruan i sar., 2023*).

Purinergička signalizacija predstavlja izuzetno važan mehanizam komunikacije između ćelija. Ova signalizacija zavisi od prisustva vanćelijskih nukleotida kao što su adozin trifosfat (ATP) i njegovog metabolita adozina, koji igraju ključnu ulogu u regulaciji različitih fizioloških i patoloških procesa (*Giuliani i sar., 2019*). ATP je označen kao glavni izvor energije u ćelijama i ima ključnu ulogu u biosintezi, aktivnom transportu i procesima pokretljivosti ćelija. Nakon oslobađanja iz ćelije, ATP deluje autokrino i parakrino vezivanjem za purinske P2 receptore. Nakon izlaska iz ćelije molekul ATP ima kratak životni vek zahvaljujući prisustvu enzima koji ga razgrađuju. Aktiviranje receptora posredstvom adozina dovodi do razvoja antiinflamatornih i imunosupresivnih odgovora (*Haskó i Cronstein, 2013*), čiji je cilj stimulacija obnavljanja homeostaze tkiva. Postoje istraživanja koja ukazuju na povezanost hroničnog stresa i delovanja purinergičke signalizacije. Oslobađanje ATP-a može biti konstitutivno (*Schiebert i sar., 2002*) ili nakon ćelijske stimulacije depolarizacijom, ali i usled stresa ili hipoksije (*Rich i sar., 2003; Abbracchio i sar., 2006*). Osim toga, vanćelijsko oslobađanje ATP-a može se desiti nakon oštećenja tkiva i nekroze, a ovaj molekul može pokrenuti inflamatorne odgovore i aktivirati ćelije imunog sistema. Ding je sa svojim saradnicima (2010) pokazao da deksametazon dovodi do neočekivanog povećanja proizvodnje inflamatornih medijatora endotelnih ćelija indukovanih vanćelijskim ATP-om, ukazujući na pozitivnu povratnu spregu glukokortikoida i ATP-a. Vanćelijski ATP je nedavno prepoznat i kao jedan od vodećih signala koji pokreću izlazak HSPC iz koštane srži (*Ratajczak i*

sar., 2018), pa je u sklopu ove disertacije postavljen cilj da se ispituju uloge vanćelijskih nukleotida i purinergičnog signalnog sistema tokom SE, u okviru interakcija makrofaga sa MSC izolovanim iz koštane srži i slezine miša.

Uzimajući u obzir da eritroidne progenitorne ćelije eksprimiraju P2X7R (*Tung i sar., 2021*), značajno povećani vanćelijski nivoi ATP-a i ekspresija P2X7R u koštanoj srži miševa koji su bili podvrgnuti hroničnom psihološkom stresu mogu odražavati mikrosredinu izazvano stresom, koje podržava migraciju nezrelih eritroidnih ćelija iz koštane srži u slezinu. Sličnost između promena u broju eritroidnih progenitornih ćelija i nivoa vanćelijskog ATP-a među različitim eksperimentalnim grupama dodatno podržava ovu hipotezu. Deplecija makrofaga sprečila je povećanje koncentracije ATP-a izazvanog stresom, što ukazuje na značajan doprinos makrofaga u povećanom oslobađanju ATP-a tokom stresa. Tokom procesa SE monociti se regrutuju u slezinu gde stvaraju makrofage koji učestvuju u formiranju eritroblastnih ostrva (*Liao i sar., 2018*). S obzirom da monociti/makrofagi eksprimiraju P2X7R i migriraju ka rastućim koncentracijama ATP-a (*Wang i sar., 2021*), povećani nivoi vanćelijskog ATP-a i ekspresije P2X7R gena u slezini mogu biti rezultat mikrosredine izazvanog stresom koje podstiče diferencijaciju makrofaga iz monocita u uslovima povećanih potreba organizma za eritrocitima. Tretman klodronatom je otkrio važan doprinos rezidentnih makrofaga slezine povišenim nivoima vanćelijskog ATP-a u uslovima *restraint* stresa. Međutim, upotreba klodronat-lipozoma dovodi do apoptoze makrofaga, pa je deplecija makrofaga kod kontrolnih miševa takođe povećala nivo vanćelijskog ATP-a.

Vanćelijski ATP se brzo hidrolizuje pomoću CD39, a povećana specifična aktivnost ovog enzima u koštanoj srži i slezini životinja tretiranih klodronatom može biti odraz sprečavanja toksičnih i proinflamatornih efekata kontinuirano visokih nivoa ATP-a (*Lee i sar., 2019*). Takođe, povećana specifična aktivnost i ekspresija ovog enzima kod miševa izloženih hroničnom stresu može biti zaštitna od prekomerne mobilizacije HSPC iz koštane srži (*Adamiak i sar., 2019*). Rezultati najnovijih istraživanja su pokazali da adenzin može delovati inhibitorno na eritrocitopoezu (*Mikdar i sar., 2023*). S obzirom na suprotne uloge ATP i adenozina u regulaciji SE, odsustvo u promeni ekspresije i specifične aktivnosti enzima CD73 u koštanoj srži i slezini tokom hroničnog stresa ukazuje na stresom-indukovana tkivna mikrosredina sa dominacijom ATP-a u cilju stimulacije eritrocitopoeze. Značaj makrofaga kao negativnog regulatora u kontroli specifične aktivnosti CD73 enzima tokom stresa pokazan je povećanjem aktivnosti ovog enzima kod životinja koje su istovremeno bila tretirane klodronat-lipozomom i izložene hroničnom stresu. Bez obzira na odsustvo u promeni specifične aktivnosti enzima CD73, hronični psihološki stres je doveo do povećane ekspresije ADORA2A i ADORA2B receptora. Saglasno tome, pokazano je da usled hipoksije u uslovima stresa dolazi povećane ekspresije adenzinskih receptora (*Fredholm, 2007; Burnstock i Verkhatsky, 2012*). Kako je ADORA2B eksprimiran na zajedničkim megakariocit-eritroidnim progenitorima (*Liu i sar., 2018*), ovo povećanje u koštanoj srži i slezini nastaje i usled ekspanzije navedenih ćelija. Povećanje ekspresije ADORA2B u odsustvu makrofaga u bazalnim uslovima ukazuje na značajnu ulogu makrofaga u kontroli prekomerne ekspanzije eritroidnih progenitora, dok je povećana ekspresija ADORA2B receptora kod životinja koje su tretirane klodronatom i bile izložene stresu, najverovatnije posledica povećane aktivnosti CD73 enzima i usmeravanja eritromijeloidne loze ka mijeloidnoj lozi (*Mikdar i sar., 2023*). S druge strane, stres je izazvao povećanu ekspresiju ADORA2A receptora koji imaju ulogu u aktivaciji antiinflamatornih M2 makrofaga (*Ohta i Sitkovsky, 2001*), tako da je u uslovima deplecije makrofaga izostalo povećanje ekspresije ovog receptora.

Vanćelijski nukleotidi su označeni kao faktori koji određuju sudbinu MSC, a čini se da na njihovu funkciju utiče i izvor/poreklo ćelija. Kako je u sklopu svojih istraživanja Peng (2014) pokazao da ATP u različitim koncentracijama ne utiče bitno na proliferaciju MSC, dok je Riddle sa svojim saradnicima (2007) pokazao da ATP povećava proliferativnu sposobnost ovih ćelija, može se zaključiti da je povećani klonogeni potencijal MSC koštane srži i slezine u uslovima hroničnog



psihološkog stresa uzrokovan delovanjem većeg broja faktora mikrookruženja. Takođe, Peng (2014) je pokazao da ATP smanjuje osteogenu diferencijaciju MSC, što je u saglasnosti sa našim rezultatima da psihološki stres koji izaziva povećanu produkciju ATP izaziva i samnjenu osteogenu diferencijaciju MSC.

Lokalnu interakciju ATP-a sa NO kao i hipotezu da nizak nivo NO u hroničnom stresu reguliše proliferaciju BFU-E i CFU-E upravo preko ATP-a, testirali smo blokadom NOS-a u mono i ko-kulturama MSC koštane srži/slezine i RAW264.7. Blokada NOS-a je uzrokovala povećanu produkciju ATP-a u ko-kulturama tretiranim kortikosteronom i EPO. Međutim, pokazana je dozna zavisnost između NO i ATP-a. Kako medijatori stresa dovode do smanjene produkcije NO u ko-kulturi MSC koštane srži i RAW ćelija, blokada NOS-a je dodatno smanjila produkciju NO, što je imalo za posledicu smanjeno oslobađanje ATP-a. Ovaj nalaz je u saglasnosti sa rezultatima prethodnih istraživanja koja su ukazala na postojanje dozne zavisnosti između NO i oslobođenog ATP-a (*De Deus i sar., 2018*). Medijatori SE doveli su do smanjene koncentracije adenzina u ko-kulturama, a blokada NOS-a nije promenila efekat medijatora stresa. Smanjenje adenzina može biti posledica njegovog povećanog uklanjanja putem ADA ili usled povećanog preuzimanja posredstvom ENT-a. Ovo bi bilo u skladu sa istraživanjima koja kazuju da glukokortikoidi povećavaju aktivnost ADA i ENT (*Aymerich i sar., 2004; Badmus i sar., 2021*). Interakcija MSC i makrofaga pokazala se kao ključna u regulaciji produkcije ATP-a i njegove zavisnosti od NO, s obzirom da su monokulture pokazale različitu produkciju ATP-a kada su tretirane kortikosteronom i EPO i blokatorom NOS-a u odnosu na ko-kulture. Značaj interakcija makrofaga i MSC u kontroli metabolizma ATP-a pokazali smo i na osnovu ekspresije gena za receptore i enzime kojima se kontroliše metabolizam ATP-a. Povećana ekspresija P2X7R, CD39 i ADORA2B u ko-kulturi MSC koštane srži i RAW264.7 ćelija tretirane medijatorima stresa, koja je u saglasnosti sa povećanjem ekspresije ovih gena u koštanoj srži miševa izloženih *restraint* stresu, ukazuje na ključan značaj interakcije ovih ćelija u regulaciji SE u koštanoj srži. Pri tome, povećana ekspresija ADORA2B receptora usled delovanja medijatora stresa, prisutna i pored i smanjenja nivoa vanćelijskog adenzina, može biti rezultat njegove alternativne aktivacije posredstvom netriona-1 (*Yuan X i sar., 2022*). Za razliku od koštane srži, pored interakcija MSC i makrofaga, ulogu u regulaciji hidrolize ATP-a u slezini, imaju i ostali faktori mikrosredine. Blokada NOS-a dovela je do promene u ekspresiji CD73 gena u kulturama tretiranim kortikosteronom i EPO, što je u saglasnosti sa rezultatima novijih istraživanja koji su pokazali da L-NAME povećava aktivnost CD73 enzima (*Cardoso i sar., 2019*). Iako je L-NAME doveo do povećane ekspresije CD73 enzima nije uticao na koncentraciju vanćelijskog adenzina u uslovima stresa, sugerišući da NO kontroliše vanćelijski ATP-a ali ne i adenzin. Naime, jako nizak nivo NO smanjuje vanćelijski ATP-a stimulišući njegovu hidrolizu i stvaranje adenzina čije je pruzimanje povećano (*Farias i sar., 2006*). Kako ATP i adenzin imaju suprotne efekte u procesu eritrocitopoeze, odnosno adenzin inhibira mobilizaciju hematopoeznih progenitornih ćelija (*Thapa i sar., 2022*) NO posredstvom purinergičke signalizacije može imati značajnu ulogu u regulaciji migracije eritroidnih progenitora.

S obzirom da su glavni izvori NO nitrati i nitriti s jedne strane, i produkcija od strane NOS enzima s druge strane, ispitali smo kako blokada CD73 enzima utiče na ove izvore. Blokada CD73 enzima nije izazvala promene u produkciji NO u ko-kulturama za razliku od monokultura, što ukazuje na značaj interakcije MSC i makrofaga u regulaciji produkcije NO, koja je nezavisna od aktivnosti CD73 enzima. S druge strane, CD73 se pokazao veoma značajnim u regulaciji ekspresije iNOS-a i eNOS-a u ko-kulturi MSC koštane srži i RAW ćelija i nNOSa u ko-kulturi MSC slezine i RAW ćelija. Naime, blokada CD73 enzima izazvala je povećanu ekspresiju ovih enzima u ko-kulturama, ukazujući da bi enzim CD73 mogao biti odgovoran za regulaciju produkcije NO putem NOS-a u uslovima stresa. Zavisnost eNOSa od CD73 enzima pokazana je i na CD73 *knockout* miševima kod kojih se razvila endotelna disfunkcija usled poremećaja u metabolizmu L-arginina (*Mierzejewska i sar., 2019*). Takođe, dobijeni rezultati ukazuju na značaj ovog enzima u kontroli ekspresije iNOSa u monokulturi ćelijske linije makrofaga. Blokada enzima CD73 povećava

ekspresiju iNOS-a u makrofagima. Ovaj nalaz je u skladu sa i našim *in vivo* istraživanjima koja pokazuju da je deplecija makrofaga izazvala kompenzatorno povećanje CD73 enzima u cilju nadoknade produkcije NO. Costales i sar. (2018) su dokazali da povećana aktivnost enzima CD73 suprimira produkciju NO od strane makrofaga tokom inflamacije i stimuliše polarizaciju makrofaga ka M2 tipu (Xu i sar., 2018).

## 6. ZAKLJUČCI

Deplecija makrofaga dodatno smanjuje značajno redukovan broj eritrocita i nivoa hemoglobina u krvi hronično stresiranih miševa, sugerišući da nedostatak makrofaga pogoršava anemiju tokom stresa.

Ponavljano izlaganje psihološkom stresoru markantno povećava broj eritroidnih progenitora u koštanoj srži i slezini, dok deplecija makrofaga poništava ovaj efekat stresa, ukazujući na ključnu ulogu makrofaga u stresom-indukovanoj ekspanziji eritroidnih progenitornih ćelija.

Deplecija makrofaga poništava stimulišući efekat hroničnog stresa na broj CD71+/Ter119+ i CD71-/Ter119+ ćelija u koštanoj srži, broj CD71+/Ter119+ ćelija u slezini, i sprečava stresom-uzrokovane promene u zastupljenosti različitih subpopulacija eritroidnih ćelija u koštanoj srži i slezini.

Hronični stres je povećao klonogeni potencijal MSC iz koštane srži i slezine i smanjio njihov potencijal za diferencijaciju u osteoblaste i adipocite, a deplecija makrofaga je pokazala da makrofagi, u zavisnosti od tkivno-specifičnog mikrookruženja, doprinose regulaciji klonogenog potencijala i sposobnosti diferencijacije MSC u uslovima stresa.

Ponavljano izlaganje stresoru je uzrokovalo smanjenu produkciju NO u koštanoj srži, dok je njegova produkcija u slezini ostala neizmenjena. Tretman klodronat-lipozomima je smanjo produkciju NO u koštanoj srži u bazalnim uslovima i potpuno prevenirao efekat stresa na produkciju ovog molekula, sugerišući na značajnu ulogu makrofaga u regulaciji produkcije NO u koštanoj srži.

Deplecija makrofaga je sprečila stresom-indukovano povećanje nivoa vanćelijskog ATP-a i povećanu ekspresiju gena za ATP receptor P2X7 u koštanoj srži i slezini, što ukazuje ključnu ulogu makrofaga u regulaciji nivoa eksprancelarnog ATP-a tokom hroničnog stresa.

Tretman klodronat-lipozomima je u potpunosti poništio stresom izazvano povećanje ekspresije molekula CD39 i specifične aktivnosti ovog enzima u koštanoj srži i slezini, značajno je povećao specifičnu aktivnost enzima CD73 u koštanoj srži i slezini tokom hroničnog stresa, i sprečio je stresom-uzokovano povećanje ekspresije receptora ADORA2A u koštanoj srži, sveukupno ukazujući na značajan doprinos makrofaga procesu hidolize vanćelijskog ATP-a u uslovima hroničnog stresa.

Tretman ko-kultura MSC koštane srži i RAW264.7 ćelija medijatorima SE izazvao je povećanu produkciju ATP-a i smanjenu adenzina, dok je blokada NOS-a poništila ovaj efekat medijatora SE na ATP ali ne i na adenzin. Medijatori SE nisu uticali na produkciju ATP-a u ko-kulturi MSC slezine i RAW264.7 ćelije, ali doveli su do smanjenog oslobađanja adenzina, dok su medijatori SE zajedno sa blokatorom NOS-a doveli do povećanog oslobađanja ATP. Navedeni rezultati ukazuju na značaj tkivno-specifičnih interakcija MSC sa makrofagima u regulaciji produkcije adenzina, ATP-a i njegove zavisnosti od NO.

Povećana ekspresija P2X7R, CD39 i ADORA2B u ko-kulturi MSC koštane srži i RAW ćelija tretirane medijatorima stresa, koja je u saglasnosti sa sa povećanjem ekspresije ovih gena u koštanoj srži miševa izloženih *restraint* stresu dodatno potvrđuje ulogu purinergičkog signalnog sistema u interakcijama ovih ćelija u uslovima SE.

Blokada CD73 enzima, uz istovremeni tretman medijatorima SE, suprostavila se efektu kortikosterona i EPO, koji su izazvali smanjenu produkciju NO i povećala ekspresiju gena za iNOS i eNOS u ko-kulturi MSC koštane srži i RAW264.7 ćelija, kao i ekspresiju nNOSa u ko-kulturi MSC slezine sa RAW264.7 ćelijama. S druge strane, blokada NOS-a dovela je do povećane ekspresije CD73 gena u ko-kulturi MSC koštane srži i RAW264.7, ukazujući na složenu regulaciju međusobnih interakcija između CD73 enzima i NOS-a i njihov značaj u regulaciji proizvodnje NO, u ko-kulturi MSC i RAW264.7 ćelija.

Istraživanja obuhvaćena ovom disertacijom su doprinela definisanju uloge makrofaga i njihovih interakcija sa MSC u regulaciji procesa SE. Prvi put je pokazana uloga NO i purinergičnog signalnog sistema u komunikaciji makrofaga sa MSC u uslovima povišenih koncentracija glukokortikoida i EPO. Razumevanje uloge ovih signalnih molekula u navedenim interakcijama značajno je, ne samo za rasvetljavanje mehanizama koji regulišu ubrzanu proliferaciju i diferencijaciju nezrelih ćelija eritroidne loze tokom procesa SE, već može doprineti razvoju novih i potencijalno efikasnijih modaliteta lečenja anemije, imajući u vidu rizik od neželjenih dejstava terapije EPO, naročito kod onkoloških pacijenata, kao i sve učestaliji problem rezistencije na postojeće agense za stimulisanje eritrocitopoeze (engl. erythropoiesis-stimulating agents, ESAs)

## 7. LITERATURA

- Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Knight GE, Fumagalli M, Gachet C, Jacobson KA, Weisman GA. International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 2006;58(3):281-341.
- Adamiak M, Abdelbaset-Ismail A, Moore JB 4th, Zhao J, Abdel-Latif A, Wysoczynski M, Ratajczak MZ. Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Is a Novel Negative Regulator of Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Trafficking. *Stem Cell Rev Rep.* 2017;13(1):92-103.
- Adamiak M, Bujko K, Brzezniakiewicz-Janus K, Kucia M, Ratajczak J, Ratajczak MZ. The Inhibition of CD39 and CD73 Cell Surface Ectonucleotidases by Small Molecular Inhibitors Enhances the Mobilization of Bone Marrow Residing Stem Cells by Decreasing the Extracellular Level of Adenosine. *Stem Cell Rev Rep.* 2019;15(6):892-899.
- Adamiak M, Bujko K, Cymer M, Plonka M, Glaser T, Kucia M, Ratajczak J, Ulrich H, Abdel-Latif A, Ratajczak MZ. Novel evidence that extracellular nucleotides and purinergic signaling induce innate immunity-mediated mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Leukemia.* 2018;32(9):1920-1931.
- Agani FH, Puchowicz M, Chavez JC, Pichiule P, LaManna J. Role of nitric oxide in the regulation of HIF-1 $\alpha$  expression during hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;283(1):C178-C186.
- Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005;105(4):1815-22.
- Akinosoglou KS, Solomou EE, Gogos CA. Malaria: a haematological disease. *Hematology.* 2012;17(2):106-14.
- Alamo IG, Kannan KB, Loftus TJ, Ramos H, Efron PA, Mohr AM. Severe trauma and chronic stress activates extramedullary erythropoiesis. *J Trauma Acute Care Surg.* 2017;83(1):144-150.
- Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Lambrechts D, Fish RJ, Tjwa M, Plaisance S, Sugamele R, DeMol M, Martinez-Soria E, Maxwell PH, Lemke G, Goff SP, Matsushima GK, Earp HS, Chanson M, Collen D, Izui S, Schapira M, Conway EM, Carmeliet P. Role of Gas6 in erythropoiesis and anemia in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(2):583-96.
- Antić S, Ilić S, Avramović M, Buzurović M, Deljanin Ilić M, Dimić A i saradnici. Interna medicina: Poremećaji eritrocitne loze. Niš: Medicinski fakultet Niš 2009; 383
- Aqmasheh S, Shamsasanjan K, Akbarzadehlaleh P, Pashoutan Sarvar D, Timari H. Effects of mesenchymal stem cell derivatives on hematopoiesis and hematopoietic stem cells. *Adv Pharm Bull.* 2017;7:165–177.
- Asgari E, Le Fric G, Yamamoto H, Perucha E, Sacks SS, Kohl J, et al. C3a modulates IL-1 $\beta$  secretion in human monocytes by regulating ATP efflux and subsequent NLRP3 inflammasome activation. *Blood* 2013;122(20):3473-81.
- Avitsur R, Stark JL, Sheridan JF. Social stress induces glucocorticoid resistance in subordinate animals. *Horm Behav.* 2001;39(4):247-57.
- Aymerich I, Pastor-Anglada M, Casado FJ. Long term endocrine regulation of nucleoside transporters in rat intestinal epithelial cells. *J Gen Physiol.* 2004;124(5):505-12.
- Bader JE, Enos RT, Velázquez KT, Carson MS, Sougiannis AT, McGuinness OP, Robinson CM, Murphy EA. Repeated clodronate-liposome treatment results in neutrophilia and is not effective in limiting obesity-linked metabolic impairments. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2019;316(3):E358-E372
- Badmus OO, Areola ED, Benjamin E, Obekpa MA, Adegoke TE, Elijah OE, Imam A, Olajide OJ, Olatunji LA. Suppression of Adenosine Deaminase and Xanthine Oxidase Activities by Mineralocorticoid and Glucocorticoid Receptor Blockades Restores Renal Antioxidative

- Barrier in Oral Contraceptive-Treated Dam. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2021;2021:9966372.
- Barbosa CM, Leon CM, Nogueira-Pedro A, Wasinsk F, Araújo RC, Miranda A, Ferreira AT, Paredes-Gamero EJ. Differentiation of hematopoietic stem cell and myeloid populations by ATP is modulated by cytokines. *Cell Death Dis.* 2011;2(6):e165.
- Bartocci A, Mastrogriannis DS, Migliorati G, Stockert RJ, Wolkoff AW, Stanley ER. Macrophages specifically regulate the concentration of their own growth factor in the circulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(17):6179-83.
- Baykov AA, Evtushenko OA, Avaeva SM. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal Biochem.* 1988;171(2):266-70.
- Benes P, Macecková V, Zdráhal Z, Konečná H, Zahradníková E, Muzík J, Smarda J. Role of vimentin in regulation of monocyte/macrophage differentiation. *Differentiation.* 2006;74(6):265-76.
- Bennett LF, Liao C, Quickel MD, Yeoh BS, Vijay-Kumar M, Hankey-Giblin P, Prabhu KS, Paulson RF. Inflammation induces stress erythropoiesis through heme-dependent activation of SPI-C. *Sci Signal.* 2019;12(598):eaap7336
- Bernard OA, Busson-LeConiat M, Ballerini P, Mauchauffé M, Della Valle V, Monni R, Nguyen Khac F, Mercher T, Penard-Lacronique V, Pasturaud P, Gressin L, Heilig R, Daniel MT, Lessard M, Berger R. A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5;14)(q35;q32), is associated with expression of the Hox11L2 gene in T acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2001;15(10):1495-504.
- Bessis M. Erythroblastic island, functional unity of bone marrow. *Rev Hematol.* 1958;13:8–11
- Bierhaus A, Wolf J, Andrassy M, Rohleder N, Humpert PM, Petrov D, Ferstl R, von Eynatten M, Wendt T, Rudofsky G, Joswig M, Morcos M, Schwaninger M, McEwen B, Kirschbaum C, Nawroth PP. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:1920-1925
- Blank U, Karlsson G, Karlsson S. Signaling pathways governing stem-cell fate. *Blood.* 2008;111:492–503.
- Blikstad I, Nelson WJ, Moon RT, Lazarides E. Synthesis and assembly of spectrin during avian erythropoiesis: stoichiometric assembly but unequal synthesis of alpha and beta spectrin. *Cell* 1983; 32:1081-1091
- Bloch W, Fleischmann BK, Lorke DE, Andressen C, Hops B, Hescheler J, Addicks K. Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res.* 1999;43:675–684.
- Bogdan C. Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.* 2001;11:66-75.
- Boyd NL, Dhara SK, Rekaya R, Godbey EA, Hasneen K, Rao RR, West FD 3rd, Gerwe BA, Stice SL. BMP4 promotes formation of primitive vascular networks in human embryonic stem cell-derived embryoid bodies. *Exp Biol Med (Maywood).* 2007 Jun;232(6):833-43. PMID: 17526776.
- Broudy VC, Lin N, Brice M, Nakamoto B, Papayannopoulou T. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood.* 1991;77(12):2583-90.
- Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med.* 2005;26:3-31.
- Bunn HF. Erythropoietin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(3):a011619.
- Burgess AW, Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood.* 1980;56(6):947-58.
- Burnstock G, Verkhatsky A. Receptors for Purines and Pyrimidines. *Purinergic Signal Nerv Syst.* 2012;50(3):119-244.
- Burnstock G. Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(12):1471-83.
- Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009;33(7):1089-98.
- Cardoso AM, Manfredi LH, Zanini D, Bagatini MD, Gutierrez JM, Carvalho F, Tremblay A, Belló-Klein A, Rubin MA, Morsch VM, Sévigny J, Schetinger MRC. Physical exercise prevents

- memory impairment in an animal model of hypertension through modulation of CD39 and CD73 activities and A2A receptor expression. *J Hypertens*. 2019;37(1):135-143.
- Casella G, Garzetti L, Gatta AT, Finardi A, Maiorino C, Ruffini F, Martino G, Muzio L, Furlan R. IL4 induces IL6-producing M2 macrophages associated to inhibition of neuroinflammation in vitro and in vivo. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):139.
- Caulier AL, Sankaran VG. Molecular and cellular mechanisms that regulate human erythropoiesis. *Blood*. 2022;139(16):2450-2459
- Cavaliere F, Donno C, D'Ambrosi N. Purinergic signaling: a common pathway for neural and mesenchymal stem cell maintenance and differentiation. *Front Cell Neurosci*. 2015;9:211.
- Chang H, Langer PJ, Lodish HF. Asynchronous synthesis of erythrocyte membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976;73:3206-3210.
- Charles R. Harrington. Lowry Protein Assay containing Sodium Dodecyl Sulfate in Microtiter Plates for Protein determinations on Fractions from Brain Tissue. *Analytical biochemistry*. 1990; 186:285-287.
- Chasis JA, Mohandas N. Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood*. 2008;112(3):470-8.
- Chen K, Pikhova B, Pittman RN, Schechter AN, Popel AS. Nitric oxide from nitrite reduction by hemoglobin in the plasma and erythrocytes. *Nitric Oxide*. 2008;18:47-60.
- Chen L, Carlton M, Chen X, Kaur N, Ryan H, Parker TJ, Lin Z, Xiao Y, Zhou Y. Effect of fibronectin, FGF-2, and BMP4 in the stemness maintenance of BMSCs and the metabolic and proteomic cues involved. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):165.
- Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*. 2008;3(4):e1886.
- Chen Y, Xiang J, Qian F, Diwakar BT, Ruan B, Hao S, Prabhu KS, Paulson RF. Epo receptor signaling in macrophages alters the splenic niche to promote erythroid differentiation. *Blood*. 2020;136(2):235-246
- Chénais B, Molle I, Jeannesson P. Inhibitory effect of nitric oxide on chemically induced differentiation of human leukemic K562 cells. *Biochem Pharmacol*. 1999;58:773-778.
- Cheng Y, Jope RS, Beurel E. A pre-conditioning stress accelerates increases in mouse plasma inflammatory cytokines induced by stress. *BMC Neurosci*. 2015;16:31.
- Cho DI, Kim MR, Jeong HY, Jeong HC, Jeong MH, Yoon SH, Kim YS, Ahn Y. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp Mol Med*. 2014;46:e70.
- Chow A, Huggins M, Ahmed J, Hashimoto D, Lucas D, Kunisaki Y, Pinho S, Leboeuf M, Noizat C, van Rooijen N, Tanaka M, Zhao ZJ, Bergman A, Merad M, Frenette PS. CD169<sup>+</sup> macrophages provide a niche promoting erythropoiesis under homeostasis and stress. *Nat Med*. 2013;19(4):429-36.
- Choy L, Derynck R. Transforming growth factor-beta inhibits adipocyte differentiation by Smad3 interacting with CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) and repressing C/EBP transactivation function. *J Biol Chem*. 2003;278(11):9609-19.
- Cipolleschi MG, D'Ippolito G, Bernabei PA, Caporale R, Nannini R, Mariani M, Fabbiani M, Rossi-Ferrini P, Olivetto M, Dello Sbarba P. Severe hypoxia enhances the formation of erythroid bursts from human cord blood cells and the maintenance of BFU-E in vitro. *Exp Hematol*. 1997;25(11):1187-94.
- Čokić VP, Schechter AN. Effects of nitric oxide on red blood cell development and phenotype. *Curr Top Dev Biol*. 2008;82:169-215.
- Cole RJ, Regan T. Haemopoietic progenitor cells in prenatal congenitally anaemic 'flexed-tailed' (f/f) mice. *Br J Haematol*. 1976;33(3):387-94.
- Coppi E, Pugliese AM, Urbani S, Melani A, Cerbai E, Mazzanti B, Bosi A, Saccardi R, Pedata F. ATP modulates cell proliferation and elicits two different electrophysiological responses in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2007;25(7):1840-9.

- Costales MG, Alam MS, Cavanaugh C, Williams KM. Extracellular adenosine produced by ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulates macrophage pro-inflammatory responses, nitric oxide production, and favors Salmonella persistence. *Nitric Oxide*. 2018;72:7-15
- Crippa S, Santi L, Berti M, De Ponti G, Bernardo ME. Role of ex vivo Expanded Mesenchymal Stromal Cells in Determining Hematopoietic Stem Cell Transplantation Outcome. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:663316.
- Csóka B, Selmeczy Z, Koscsó B, Németh ZH, Pacher P, Murray PJ, Kepka-Lenhart D, Morris SM Jr, Gause WC, Leibovich SJ, Haskó G. Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. *FASEB J*. 2012;26(1):376-86.
- Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:745-85.
- Das R, Giri J, K Paul P, Froelich N, Chinnadurai R, McCoy S, Bushman W, Galipeau J. A STAT5-Smad3 dyad regulates adipogenic plasticity of visceral adipose mesenchymal stromal cells during chronic inflammation. *NPJ Regen Med*. 2022;7(1):41.
- Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev*. 2006;20(3):161-71.
- de Deus JL, Dagostin ALA, Varanda WA. Nitric oxide modulates ATP-evoked currents in mouse Leydig cells. *Braz J Med Biol Res*. 2018;51(5):e6693.
- De Maria R, Testa U, Luchetti L, Zeuner A, Stassi G, Pelosi E, Riccioni R, Felli N, Samoggia P, Peschle C. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood*. 1999;93(3):796-803.
- De Maria R, Zeuner A, Eramo A, Domenichelli C, Bonci D, Grignani F, Srinivasula SM, Alnemri ES, Testa U, Peschle C. Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1. *Nature*. 1999;401(6752):489-93.
- de Witte SFH, Luk F, Sierra Parraga JM, Gargasha M, Merino A, Korevaar SS, Shankar AS, O'Flynn L, Elliman SJ, Roy D, Betjes MGH, Newsome PN, Baan CC, Hoogduijn MJ. Immunomodulation By Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells (MSC) Is Triggered Through Phagocytosis of MSC By Monocytic Cells. *Stem Cells*. 2018;36:602–615.
- Deleschaux C, Moras M, Lefevre SD, Ostuni MA. An Overview of Different Strategies to Recreate the Physiological Environment in Experimental Erythropoiesis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(15):5263.
- Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29(6):313-26.
- Dhabhar FS. Effects of stress on immune function: the good, the bad, and the beautiful. *Immunol Res*. 2014;58(2-3):193-210.
- Diaz-Jimenez D, Kolb JP, Cidlowski JA. Glucocorticoids as regulators of macrophage-mediated tissue homeostasis. *Front Immunol* 2021;12:669891.
- Ding Y, Gao ZG, Jacobson KA, Suffredini AF. Dexamethasone enhances ATP-induced inflammatory responses in endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010;335(3):693-702.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
- Dresner-Pollak R, Gelb N, Rachmilewitz D, Karmeli F, Weinreb M. Interleukin 10-deficient mice develop osteopenia, decreased bone formation, and mechanical fragility of long bones. *Gastroenterology*. 2004;127(3):792-801.
- Dulmovits BM, Hom J, Narla A, Mohandas N, Blanc L. Characterization, regulation, and targeting of erythroid progenitors in normal and disordered human erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*. 2017;24(3):159-166.
- Echeverry MB, Guimarães FS, Del Bel EA. Acute and delayed restraint stress-induced changes in nitric oxide producing neurons in limbic regions. *Neuroscience*. 2004;125:981-993.
- Ehrchen JM, Roth J, Barczyk-Kahlert K. More than suppression: glucocorticoid action on monocytes and macrophages. *Front Immunol*. 2019;10:2028.



- Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 2000;109(1):235-42.
- Eskiocak S, Gozen AS, Taskiran A, Kilic AS, Eskiocak M, Gulen S. Effect of psychological stress on the L-arginine-nitric oxide pathway and semen quality. *Braz J Med Biol Res.* 2006;39(5):581-8
- Fabriek BO, Polfliet MM, Vloet RP, van der Schors RC, Ligtenberg AJ, Weaver LK, Geest C, Matsuno K, Moestrup SK, Dijkstra CD, van den Berg TK. The macrophage CD163 surface glycoprotein is an erythroblast adhesion receptor. *Blood.* 2007;109(12):5223-9.
- Fariás M, San Martín R, Puebla C, Pearson JD, Casado JF, Pastor-Anglada M, Casanello P, Sobrevia L. Nitric oxide reduces adenosine transporter ENT1 gene (SLC29A1) promoter activity in human fetal endothelium from gestational diabetes. *J Cell Physiol.* 2006;208(2):451-60.
- Ferrari D, Gulinelli S, Salvestrini V, Lucchetti G, Zini R, Manfredini R, Caione L, Piacibello W, Ciciarello M, Rossi L, Idzko M, Ferrari S, Di Virgilio F, Lemoli RM. Purinergic stimulation of human mesenchymal stem cells potentiates their chemotactic response to CXCL12 and increases the homing capacity and production of proinflammatory cytokines. *Exp Hematol.* 2011;39(3):360-74, 374.e1-5.
- FISHER JW, CROOK JJ. Influence of several hormones on erythropoiesis and oxygen consumption in the hypophysectomized rat. *Blood.* 1962;19:557-65.
- Flygare J, Rayon Estrada V, Shin C, Gupta S, Lodish HF. HIF1 $\alpha$  synergizes with glucocorticoids to promote BFU-E progenitor self-renewal. *Blood.* 2011;117(12):3435-44.
- Foronjy RF, Majka SM. The potential for resident lung mesenchymal stem cells to promote functional tissue regeneration: understanding microenvironmental cues. *Cells.* 2012;1:874.
- Francois M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther.* 2012;20:187–195.
- Fredholm BB. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. *Cell Death Differ.* 2007;14(7):1315-1323.
- Frick LR, Arcos ML, Rapanelli M, Zappia MP, Brocco M, Mongini C, Genaro AM, Cremaschi GA. Chronic restraint stress impairs T-cell immunity and promotes tumor progression in mice. *Stress.* 2009;12(2):134-43.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976;4(5):227–234, 267-74.
- Fuseler JW, Valarmathi MT. Modulation of the migration and differentiation potential of adult bone marrow stromal stem cells by nitric oxide. *Biomaterials.* 2012;33:1032-43.
- Fuseler JW, Valarmathi MT. Nitric Oxide Modulates Postnatal Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Migration. *Front Cell Dev Biol.* 2016;4:133.
- Gądek-Michalska A, Tadeusz J, Rachwalska P, Spyrczka J, Bugajski J. Effect of repeated restraint on homotypic stress-induced nitric oxide synthases expression in brain structures regulating HPA axis. *Pharmacol Rep.* 2012;64(6):1381-90.
- Galloway JL, Zon LI. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol.* 2003;53:139-58
- Gao J, Cheng Y, Hao H, Yin Y, Xue J, Zhang Q, Li L, Liu J, Xie Z, Yu S, Li B, Han W, Mu Y. Decitabine assists umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in improving glucose homeostasis by modulating macrophage polarization in type 2 diabetic mice. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):259.
- Gao W, Yang X, Du J, Wang H, Zhong H, Jiang J, Yang C. Glucocorticoid guides mobilization of bone marrow stem/progenitor cells via FPR and CXCR4 coupling. *Stem Cell Res Ther.* 2021;12(1):16.
- Gasson JC. Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 1991 Mar;77(6):1131-45.

- Gervois P, Struys T, Hilkens P, Bronckaers A, Ratajczak J, Politis C, Brône B, Lambrichts I, Martens W. Neurogenic maturation of human dental pulp stem cells following neurosphere generation induces morphological and electrophysiological characteristics of functional neurons. *Stem Cells Dev.* 2015;24(3):296-311.
- Gharibi B, Abraham AA, Ham J, Evans BA. Adenosine receptor subtype expression and activation influence the differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and adipocytes. *J Bone Miner Res.* 2011;26(9):2112-24.
- Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, Marden MC, Wajcman H, Douay L. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2005;23(1):69-74.
- Ginzburg Y, An X, Rivella S, Goldfarb A. Normal and dysregulated crosstalk between iron metabolism and erythropoiesis. *Elife.* 2023;12:e90189.
- Giri J, Das R, Nylen E, Chinnadurai R, Galipeau J. CCL2 and CXCL12 Derived from Mesenchymal Stromal Cells Cooperatively Polarize IL-10+ Tissue Macrophages to Mitigate Gut Injury. *Cell Rep.* 2020;30(6):1923-1934.e4.
- Girousse A, Mathieu M, Sastourné-Arrey Q, Monferran S, Casteilla L, Sengenès C. Endogenous Mobilization of Mesenchymal Stromal Cells: A Pathway for Interorgan Communication? *Front Cell Dev Biol.* 2021;8:598520.
- Giuliani AL, Sarti AC, Di Virgilio F. Extracellular nucleotides and nucleosides as signalling molecules. *Immunol Lett.* 2019 ;205:16-24
- Goto T, Ubukawa K, Kobayashi I, Sugawara K, Asanuma K, Sasaki Y, Guo YM, Takahashi N, Sawada K, Wakui H, Nunomura W. ATP produced by anaerobic glycolysis is essential for enucleation of human erythroblasts. *Exp Hematol.* 2019;72:14-26.e1.
- Gu F, Zhang K, Li J, Xie X, Wen Q, Sui Z, Su Z, Yu T. Changes of Migration, Immunoregulation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Different Stages of Inflammation. *Int J Med Sci.* 2022;19(1):25-33.
- Gupta N, Su X, Popov B. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J Immunol.* 2007;179(3):1855-1863.
- Guzik TJ, Korbout R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* 2003;54(4):469-87.
- Haas N, Riedt T, Labbaf Z, Baßler K, Gergis D, Fröhlich H, Gütgemann I, Janzen V, Schorle H. Kit transduced signals counteract erythroid maturation by MAPK-dependent modulation of erythropoietin signaling and apoptosis induction in mouse fetal liver. *Cell Death Differ.* 2015;22(5):790-800.
- Halawi R, Moukhadder H, Taher A. Anemia in the elderly: a consequence of aging? *Expert Rev Hematol.* 2017;10(4):327-335.
- Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2008(Cipolleschi et al., 1997; Hamilton, 2008);8(7):533-44.
- Hanspal M. Importance of cell-cell interactions in regulation of erythropoiesis. *Curr Opin Hematol* 1997;4: 142-147.
- Hao S, Xiang J, Wu DC, Fraser JW, Ruan B, Cai J, Patterson AD, Lai ZC, Paulson RF. Gdf15 regulates murine stress erythroid progenitor proliferation and the development of the stress erythropoiesis niche. *Blood Adv.* 2019 Jul;3(14):2205-2217.
- Harandi OF, Hedge S, Wu DC, McKeone D and Paulson RF. Murine erythroid short-term radioprotection requires a BMP4-dependent, self-renewing population of stress erythroid progenitors. *J Clin Invest.* 2010;120(12):4507–4519
- Hariharan S. Study of growth of stress erythroid progenitors from peripheral blood mononuclear cells in murine and human anemic model systems. Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science, 2016.

- Harkat M, Peverini L, Cerdan AH, Dunning K, Beudez J, Martz A, Calimet N, Specht A, Cecchini M, Chataigneau T, Grutter T. On the permeation of large organic cations through the pore of ATP-gated P2X receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(19):E3786-E3795.
- Haskó G, Cronstein B. Regulation of inflammation by adenosine. *Front Immunol*. 2013;8:4:85.
- Haskó G, Pacher P. A2A receptors in inflammation and injury: lessons learned from transgenic animals. *J Leukoc Biol*. 2008;83(3):447-55.
- Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J, Lodish HF. From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications. *Blood*. 2011;118(24):6258-6268.
- Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tatenos M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA, Rafii S. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2001;193(9):1005-14.
- Hegde S, Lenox LE, Lariviere A, Porayette P, Perry JM, Yon M, Paulson RF. An intronic sequence mutated in flexed-tail mice regulates splicing of Smad5. *Mamm Genome*. 2007;18(12):852-60.
- Heideveld E, Hampton-O'Neil LA, Cross SJ, van Alphen FPJ, van den Biggelaar M, Toye AM, van den Akker E. Glucocorticoids induce differentiation of monocytes towards macrophages that share functional and phenotypical aspects with erythroblastic island macrophages. *Haematologica*. 2018;103(3):395-405.
- Herman JP, McKlveen JM, Ghosal S, Kopp B, Wulsin A, Makinson R, Scheimann J, Myers B. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical stress response. *Compr Physiol*. 2016;6(2):603-21.
- Hu Y, Fisette PL, Denlinger LC, Guadarrama AG, Sommer JA, Proctor RA, Bertics PJ. Purinergic receptor modulation of lipopolysaccharide signaling and inducible nitric-oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem*. 1998;273(42):27170-5. 9765236.
- Huang B, Cheng X, Wang H, Huang W, la Ga Hu Z, Wang D, Zhang K, Zhang H, Xue Z, Da Y, Zhang N, Hu Y, Yao Z, Qiao L, Gao F, Zhang R. Mesenchymal stem cells and their secreted molecules predominantly ameliorate fulminant hepatic failure and chronic liver fibrosis in mice respectively. *J Transl Med*. 2016;14:45.
- Hwang DJ, Kwon KC, Hwang DY, Seo MS, Kim KS, Jung YS, Cho JY. Comparative analysis of restraint stress-induced depressive-like phenotypes in C57BL/6N mice derived from three different sources. *Lab Anim Res*. 2020 Aug 26;36:29. doi: 10.1186/s42826-020-00062-0. PMID: 32874958; PMCID: PMC7448453.
- Ikuta T, Sellak H, Odo N, Adekile AD, Gaensler KM. Nitric Oxide-cGMP Signaling Stimulates Erythropoiesis through Multiple Lineage-Specific Transcription Factors: Clinical Implications and a Novel Target for Erythropoiesis. *PLoS One*. 2016;11(1):e0144561.
- Inra CN, Zhou BO, Acar M, Murphy MM, Richardson J, Zhao Z, Morrison SJ. A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen. *Nature*. 2015;527(7579):466-471.
- Ishidou Y, Kitajima I, Obama H, Maruyama I, Murata F, Imamura T, Yamada N, ten Dijke P, Miyazono K, Sakou T. Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. *J Bone Miner Res*. 1995;10(11):1651-9.
- Itkin T, Ludin A, Gradus B, Gur-Cohen S, Kalinkovich A, Schajnovitz A, Ovadya Y, Kollet O, Canaani J, Shezen E, Coffin DJ, Enikolopov GN, Berg T, Piacibello W, Hornstein E, Lapidot T. FGF-2 expands murine hematopoietic stem and progenitor cells via proliferation of stromal cells, c-Kit activation, and CXCL12 down-regulation. *Blood*. 2012;120(9):1843-55.
- Jackson MV, Krasnodembskaya AD. Analysis of Mitochondrial Transfer in Direct Co-cultures of Human Monocyte-derived Macrophages (MDM) and Mesenchymal Stem Cells (MSC). *Bio Protoc*. 2017;7(9):e2255J
- Jackson MV, Morrison TJ, Doherty DF, McAuley DF, Matthay MA, Kissenpfennig A, O'Kane CM, Krasnodembskaya AD. Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes is an Important

- Mechanism by Which Mesenchymal Stem Cells Enhance Macrophage Phagocytosis in the In Vitro and In Vivo Models of ARDS. *Stem Cells*. 2016;34(8):2210-23.
- Jalili A, Shirvaikar N, Marquez-Curtis LA, Turner AR, Janowska-Wieczorek A. The HGF/c-Met axis synergizes with G-CSF in the mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells Dev*. 2010;19(8):1143-51.
- Javan GT, Salhotra A, Finley SJ, Soni S. Erythroblast macrophage protein (Emp): Past, present, and future. *Eur J Haematol*. 2018 Jan;100(1):3-9.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002 ;418(6893):41-9.
- Jin QH, Kim HK, Na JY, Jin C, Seon JK. Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cell-conditioned media inhibited macrophages activation in vitro. *Scientific Reports*. 2022;12(1):4754.
- Jing D, Fonseca AV, Alakel N, Fierro FA, Muller K, Bornhauser M, Ehninger G, Corbeil D, Ordemann R. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells-- modeling the niche compartments in vitro. *Haematologica*. 2010;95(4):542-50.
- Kapur R, Cooper R, Zhang L, Williams DA. Cross-talk between alpha(4)beta(1)/alpha(5)beta(1) and c-Kit results in opposing effect on growth and survival of hematopoietic cells via the activation of focal adhesion kinase, mitogen-activated protein kinase, and Akt signaling pathways. *Blood* 2001; 97: 1975-1981
- Karp CL, Murray PJ. Non-canonical alternatives: what a macrophage is 4. *J Exp Med*. 2012;209(3):427-431.
- Katebi M, Soleimani M, Cronstein BN. Adenosine A2A receptors play an active role in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cell development. *J Leukoc Biol*. 2009;85(3):438-44..
- Katsuyama K, Shichiri M, Kato H, Imai T, Marumo F, Hirata Y. Differential inhibitory actions by glucocorticoid and aspirin on cytokine-induced nitric oxide production in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*. 1999;140(5):2183-90.
- Kawane K, Fukuyama H, Kondoh G, Takeda J, Ohsawa Y, Uchiyama Y, Nagata S. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. *Science*. 2001;292(5521):1546-9.
- Kholodenko IV, Kurbatov LK, Kholodenko RV, Manukyan GV, Yarygin KN. Mesenchymal Stem Cells in the Adult Human Liver: Hype or Hope? *Cells*. 2019;8(10):1127.
- Kim MY, Yan B, Huang S, Qiu Y. Regulating the Regulators: The Role of Histone Deacetylase 1 (HDAC1) in Erythropoiesis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):8460.
- Kina-Tanada M, Sakanashi M, Tanimoto A, Kaname T, Matsuzaki T, Noguchi K, Uchida T, Nakasone J, Kozuka C, Ishida M, Kubota H, Taira Y, Totsuka Y, Kina SI, Sunakawa H, Omura J, Satoh K, Shimokawa H, Yanagihara N, Maeda S, Ohya Y, Matsushita M, Masuzaki H, Arasaki A, Tsutsui M. Long-term dietary nitrite and nitrate deficiency causes the metabolic syndrome, endothelial dysfunction and cardiovascular death in mice. *Diabetologia*. 2017;60:1138–1151.
- Koning JJ, Kooij G, de Vries HE, Nolte MA, Mebius RE. Mesenchymal stem cells are mobilized from the bone marrow during inflammation. *Front Immunol*. 2013;4:49.
- Koulnis M, Pop R, Porpiglia E, Shearstone JR, Hidalgo D, Socolovsky M. Identification and analysis of mouse erythroid progenitors using the CD71/TER119 flow-cytometric assay. *J Vis Exp*. 2011;(54):2809.
- Krstić A, Santibanez JF, Okić I, Mojsilović S, Kocić J, Jovčić G, Milenković P, Bugarski D. Combined effect of IL-17 and blockade of nitric oxide biosynthesis on haematopoiesis in mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 2010;199(1):31-41.
- Krumenacker JS, Hanafy KA, Murad F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. *Brain Res Bull*. 2004;62:505–515.

- Kumar A, Chanana P. Role of Nitric Oxide in Stress-Induced Anxiety: From Pathophysiology to Therapeutic Target. *Vitam Horm*. 2017;103:147-167.
- Lagraauw HM, Kuiper J, Bot I. Acute and chronic psychological stress as risk factors for cardiovascular disease: Insights gained from epidemiological, clinical and experimental studies. *Brain Behav Immun*. 2015;50:18-30.
- Lazarowski ER. Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic Signal* (2012) 8(3):359–73.
- Lee G, Lo A, Short SA, Mankelov TJ, Spring F, Parsons SF et al. Targeted gene deletion demonstrates that the cell adhesion molecule ICAM-4 is critical for erythroblastic island formation. *Blood*. 2006;108(6):2064-
- Lee GR, Shaefi S, Otterbein LE. HO-1 and CD39: It Takes Two to Protect the Realm. *Front Immunol*. 2019;10:1765.
- Lee HY, Gao X, Barrasa MI, Li H, Elmes RR, Peters LL, Lodish HF. PPAR- $\alpha$  and glucocorticoid receptor synergize to promote erythroid progenitor self-renewal. *Nature*. 2015;522(7557):474-7.
- Lee J, Dey S, Rajvanshi PK, Merling RK, Teng R, Rogers HM, Noguchi CT. Neuronal nitric oxide synthase is required for erythropoietin stimulated erythropoiesis in mice. *Front Cell Dev Biol*. 2023;11:1144110.
- Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, Chen JR, Chen YP, Lee OK. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*. 2004;40(6):1275-84.
- Lee SH, Crocker PR, Westaby S, Key N, Mason DY, Gordon S, Weatherall DJ. Isolation and immunocytochemical characterization of human bone marrow stromal macrophages in hemopoietic clusters. *J Exp Med*. 1988;168:1193–1198.
- QjsijhbjqZ1 [js; X1\ tppj H3R fhwtumfljx? xmfujx fsi kzshyt sx3Hmj r Yj }x3 7577@-7 .373
- Lenox LE, Perry JM, Paulson RF. BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia. *Blood*. 2005;105(7):2741-2748.
- Li J, Hale J, Bhagia P, Xue F, Chen L, Jaffray J, et al. Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E. *Blood*. 2014;124(24):3636–3645.
- Li N, Lu X, Zhao X, Xiang FL, Xenocostas A, Karmazyn M, Feng Q. Endothelial nitric oxide synthase promotes bone marrow stromal cell migration to the ischemic myocardium via upregulation of stromal cell-derived factor-1alpha. *Stem Cells*. 2009;27(4):961-70.
- Li W, Wang Y, Zhao H, Zhang H, Xu Y, Wang S, Guo X, Huang Y, Zhang S, Han Y, Wu X, Rice CM, Huang G, Gallagher PG, Mendelson A, Yazdanbakhsh K, Liu J, Chen L, An X. Identification and transcriptome analysis of erythroblastic island macrophages. *Blood*. 2019;134(5):480-491.
- Li X, Shang B, Li YN, Shi Y, Shao C. IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  synergistically induce apoptosis of mesenchymal stem/stromal cells via the induction of nitric oxide. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):18.
- Li Y, Zhang D, Xu L, Dong L, Zheng J, Lin Y, Huang J, Zhang Y, Tao Y, Zang X, Li D, Du M. Cell-cell contact with proinflammatory macrophages enhances the immunotherapeutic effect of mesenchymal stem cells in two abortion models. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(12):908-920.
- Liao C, Prabhu KS, Paulson RF. Monocyte-derived macrophages expand the murine stress erythropoietic niche during the recovery from anemia. *Blood*. 2018;132(24):2580-2593..
- Liao Y, Li G, Zhang X, Huang W, Xie D, Dai G, Zhu S, Lu D, Zhang Z, Lin J, Wu B, Lin W, Chen Y, Chen Z, Peng C, Wang M, Chen X, Jiang MH, Xiang AP. Cardiac Nestin<sup>+</sup> Mesenchymal Stromal Cells Enhance Healing of Ischemic Heart through Periostin-Mediated M2 Macrophage Polarization. *Mol Ther*. 2020;28(3):855-873.
- Libregts SF, Gutiérrez L, de Bruin AM, Wensveen FM, Papadopoulos P, van Ijcken W, Özgür Z, Philipsen S, Nolte MA. Chronic IFN- $\gamma$  production in mice induces anemia by reducing

- erythrocyte life span and inhibiting erythropoiesis through an IRF-1/PU.1 axis. *Blood*. 2011;118(9):2578-88.
- Lim HY, Muller N, Herold MJ, van den Brandt J, Reichardt HM. Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. *Immunology*. 2007;122(1):47-53.
- Lin H, Lee E, Hestir K, Leo C, Huang M, Bosch E, Halenbeck R, Wu G, Zhou A, Behrens D, Hollenbaugh D, Linnemann T, Qin M, Wong J, Chu K, Doberstein SK, Williams LT. Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science*. 2008;320(5877):807-11.
- Lin TH, Gibon E, Loi F, Pajarinen J, Córdova LA, Nabeshima A, Lu L, Yao Z, Goodman SB. Decreased osteogenesis in mesenchymal stem cells derived from the aged mouse is associated with enhanced NF- $\kappa$ B activity. *J Orthop Res*. 2017;35(2):281-288.
- Liu F, Qiu H, Xue M, Zhang S, Zhang X, Xu J, Chen J, Yang Y, Xie J. MSC-secreted TGF- $\beta$  regulates lipopolysaccharide-stimulated macrophage M2-like polarization via the Akt/FoxO1 pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2019;10(1):345.
- Liu H, Liu R, Nemkov T, Couturier J, Liang L, Song A, Zhao S, Sun K, Adebisi M, Edward Wen Y, Alexander Wen, Liu J, Kellems R, D'Alessandro A, Blackburn M, Xia Y; Adenosine A2B Receptor Controls Erythroid Lineage Commitment in Stress Erythropoiesis By Promoting Metabolic Reprogramming. *Blood* 2018; 132 (Supplement 1): 845.
- Liu H. The role of adenosine signaling in mature erythrocytes and erythroid progenitors. Dissertation (PhD). Houston, Texas. The University of Texas, MD Anderson Cancer Center UTHealth. 2017.
- Liu M, Jin X, He X, Pan L, Zhang X, Zhao Y. Macrophages support splenic erythropoiesis in 4T1 tumor-bearing mice. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121921
- Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, mechanisms, and significance of macrophage plasticity. *Annu Rev Pathol*. 2020;15:123–147.
- Lopez-Yrigoyen M, Yang CT, Fidanza A, Cassetta L, Taylor AH, McCahill A, Sellink E, von Lindern M, van den Akker E, Mountford JC, Pollard JW, Forrester LM. Genetic programming of macrophages generates an in vitro model for the human erythroid island niche. *Nat Commun*. 2019;10(1):881.
- Lu D, Xu Y, Liu Q, Zhang Q. Mesenchymal Stem Cell-Macrophage Crosstalk and Maintenance of Inflammatory Microenvironment Homeostasis. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:681171.
- Lu L, Broxmeyer HE. Comparative influences of phytohemagglutinin-stimulated leukocyte conditioned medium, hemin, prostaglandin E, and low oxygen tension on colony formation by erythroid progenitor cells in normal human bone marrow. *Exp Hematol*. 1985;13(10):989-93.
- Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7:156–167.
- Luo Y, Shao L, Chang J, Feng W, Liu YL, Cottler-Fox MH, Emanuel PD, Hauer-Jensen M, Bernstein ID, Liu L, Chen X, Zhou J, Murray PJ, Zhou D. M1 and M2 macrophages differentially regulate hematopoietic stem cell self-renewal and ex vivo expansion. *Blood Adv*. 2018;2(8):859-870.
- Ma X, Lin WY, Chen Y, Stawicki S, Mukhyala K, Wu Y, Martin F, Bazan JF, Starovasnik MA. Structural basis for the dual recognition of helical cytokines IL-34 and CSF-1 by CSF-1R. *Structure*. 2012;20(4):676-87.
- Madrigal JL, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Boscá L, Leza JC. Inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after acute restraint stress is regulated by nuclear factor kappaB-mediated mechanisms. *J Neurochem*. 2001;76(2):532-8.
- Maeda H, Hotta T, Yamada H. Enhanced colony formation of human hemopoietic stem cells in reduced oxygen tension. *Exp Hematol*. 1986;14(10):930-4.
- Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrzakowski Z, Kowalska MA, Gewirtz AM, Emerson SG, Ratajczak MZ. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and

- megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*. 2001;97(10):3075-85.
- Majumdar MK, Thiede MA, Haynesworth SE, Bruder SP, Gerson SL. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res*. 2000;9:841-8.
- Maldonado-Lasunción I, O'Neill N, Umland O, Verhaagen J, Oudega M. Macrophage-Derived Inflammation Induces a Transcriptome Makeover in Mesenchymal Stromal Cells Enhancing Their Potential for Tissue Repair. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):781.
- Mancuso C, Navarra P, Preziosi P. Roles of nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neurochem*. 2010;113(3):563-575.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-86.
- Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene*. 2003;316:23-32.
- Marletta MA. Nitric oxide synthase: Aspects concerning structure and catalysis. *Cell*. 1994;78:927-930.
- Martínez VG, Rubio C, Martínez-Fernández M, Segovia C, López-Calderón F, Garín MI, Teijeira A, Munera-Maravilla E, Varas A, Sacedón R, Guerrero F, Villacampa F, de la Rosa F, Castellano D, López-Collazo E, Paramio JM, Vicente Á, Dueñas M. BMP4 Induces M2 Macrophage Polarization and Favors Tumor Progression in Bladder Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(23):7388-7399.
- Massicot F, Hache G, David L, Chen D, Leuxe C, Garnier-Legrand L, Rat P, Laprevote O, Coudore F. P2X7 Cell death receptor activation and mitochondrial impairment in oxaliplatin-induced apoptosis and neuronal injury: Cellular mechanisms and in vivo approach. *PLoS ONE* 2013; 8: e66830.
- Mazaheri Z, Movahedin M, Rahbarizadeh F, Amanpour S. Different doses of bone morphogenetic protein 4 promote the expression of early germ cell-specific gene in bone marrow mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2011;47(8):521-5.
- McCall TB, Palmer RM, Moncada. Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone. *Eur J Immunol*. 1991;21(10):2523-7.
- McGrath KE, Frame JM, Fromm GJ, Koniski AD, Kingsley PD, Little J, Bulger M, Palis J. A transient definitive erythroid lineage with unique regulation of the  $\beta$ -globin locus in the mammalian embryo. *Blood*. 2011;117(17):4600-8.
- McLaughlin KJ, Gomez JL, Baran SE, Conrad CD. The effects of chronic stress on hippocampal morphology and function: an evaluation of chronic restraint paradigms. *Brain Res*. 2007;1161:56-64.
- Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Oct-Dec;20(5-6):419-27. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.002. Epub 2009 Nov 18. PMID: 19926330.
- Mendes SC, Robin C, Dzierzak E. Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development*. 2005;132:1127-1136.
- Merabet N, Lucassen PJ, Crielaard L, Stronks K, Quax R, Sloot PMA, la Fleur SE, Nicolaou M. How exposure to chronic stress contributes to the development of type 2 diabetes: A complexity science approach. *Front Neuroendocrinol*. 2022;65:100972.
- Mierzejewska P, Zabielska MA, Kutryb-Zajac B, Tomczyk M, Koszalka P, Smolenski RT, Slominska EM. Impaired L-arginine metabolism marks endothelial dysfunction in CD73-deficient mice. *Mol Cell Biochem*. 2019;458(1-2):133-142.
- Mikdar M, González-Menéndez P, Cai X, Zhang Y, Serra M, Dembele AK, Boschhat AC, Sanquer S, Chhuon C, Guerrero IC, Sitbon M, Hermine O, Colin Y, Le Van Kim C, Kinet S, Mohandas N, Xia Y, Peyrard T, Taylor N, Azouzi S. The equilibrative nucleoside transporter ENT1 is

- critical for nucleotide homeostasis and optimal erythropoiesis. *Blood*. 2021;137(25):3548-3562.
- Mikdar M, Serra M, Colin E, Duval R, Gauthier EF, Lamarre Y, Colin Y, Le Van Kim C, Peyrard T, Koehl B, Azouzi S. Adenosine signaling inhibits erythropoiesis and promotes myeloid differentiation. *Haematologica*. 2023.
- Millot S, Andrieu V, Letteron P, Lyoumi S, Hurtado-Nedelec M, Karim Z, Thibaudeau O, Bennada S, Charrier JL, Lasocki S, Beaumont C. Erythropoietin stimulates spleen BMP4-dependent stress erythropoiesis and partially corrects anemia in a mouse model of generalized inflammation. *Blood*. 2010;116(26):6072-81.
- Miyagawa S-i, Kobayashi M, Konishi N, Sato T, Ueda K. Insulin and insulin-like growth factor I support the proliferation of erythroid progenitor cells in bone marrow through the sharing of receptors. *Br J Haematol*. 2000;109(3):555–562.
- Modica S, Wolfrum C. The dual role of BMP4 in adipogenesis and metabolism. *Adipocyte*. 2017;6(2):141-146..
- Mojsilović S. Uticaj interleukona-17 na mezenhimske matične ćelije kostne srži miša u in vitro uslovima. Doktorska disertacija. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet. 2014.
- Momčilović S, Bogdanović A, Milošević MS, Mojsilović S, Marković DC, Kočović DM, Vignjević Petrinović S. Macrophages Provide Essential Support for Erythropoiesis, and Extracellular ATP Contributes to a Erythropoiesis-Supportive Microenvironment during Repeated Psychological Stress. *Int J Mol Sci*. 2023;24(14):11373.
- Momčilović S, Vignjević Petrinović S, Bogdanović A. Molekularni mehanizmi regulacije eritrocitopoeze i stres eritrocitopoeze. *Medicinski podmladak* 2024; 75(6).
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43:109–142.
- Monif M, Burnstock G, Williams DA. Microglia: Proliferation and activation driven by the P2X7 receptor. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2010, 42, 1753–1756.
- Moriguchi T, Yamamoto M. A regulatory network governing Gata1 and Gata2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation. *Int J Hematol*. 2014;100(5):417-24.
- Müller L, Tunger A, Wobus M, von Bonin M, Towers R, Bornhäuser M, Dazzi F, Wehner R, Schmitz M. Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stromal Cells: An Update. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:637725.
- Munshi S, Loh MK, Ferrara N, DeJoseph MR, Ritger A, Padival M, Record MJ, Urban JH, Rosenkranz JA. Repeated stress induces a pro-inflammatory state, increases amygdala neuronal and microglial activation, and causes anxiety in adult male rats. *Brain Behav Immun*. 2020;84:180-199.
- Munugalavadla V, Kapur R. Role of c-Kit and erythropoietin receptor in erythropoiesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;54(1):63-75.
- Myslivecek J, Rícný J, Palkovits M, Kvetnanský R. The effects of short-term immobilization stress on muscarinic receptors, beta-adrenoceptors, and adenylyl cyclase in different heart regions. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1018:315-22.
- Myslivecek J, Tillinger A, Novakova M, Kvetnanský R. Regulation of adrenoceptor and muscarinic receptor gene expression after single and repeated stress. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1148:367-76.
- Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, Yoshida A, Long G, Wright KT, Johnson WE, Baba H. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2012;29:1614–1625.
- Nogueira-Pedro A, Dias CC, Regina H, Segreto C, Addios PC, Lungato L, D'Almeida V, Barros CC, Higa EM, Buri MV, Ferreira AT, Paredes-Gamero EJ. Nitric oxide-induced murine hematopoietic stem cell fate involves multiple signaling proteins, gene expression, and redox modulation. *Stem Cells*. 2014;32(11):2949-60.
- North RA. P2X receptors. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci*. 2016, 371, 1700.



- Nybo SE, Lamberts JT. Integrated use of LC/MS/MS and LC/Q-TOF/MS targeted metabolomics with automated label-free microscopy for quantification of purine metabolites in cultured mammalian cells. *Purinergic Signal*. 2019;15(1):17-25.
- Oda A, Tezuka T, Ueno Y, Hosoda S, Amemiya Y, Notsu C, Kasahara T, Nishiyama C, Goitsuka R. Niche-induced extramedullary hematopoiesis in the spleen is regulated by the transcription factor Tlx1. *Sci Rep*. 2018;8:8308.
- Ode A, Kopf J, Kurtz A, Schmidt-Bleek K, Schrade P, Kolar P, Buttgereit F, Lehmann K, Hutmacher DW, Duda GN, Kasper G. CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells. *Eur Cell Mater*. 2011;22:26-42.
- Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* 2001; 414(6866):916–20.
- Ong SL, Whitworth JA. Glucocorticoid-induced hypertension and the nitric oxide system. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2012;7(3):273-280.
- Orioli, E.; De Marchi, E.; Giuliani, A.L.; Adinolfi, E. P2X7 receptor orchestrates multiple signalling pathways triggering inflammation, autophagy and metabolic/trophic responses. *Curr. Med. Chem*. 2017;24:2261–2275.
- Paik EJ, Zon LI. Hematopoietic development in the zebrafish. *Int J Dev Biol*. 2010;54(6-7):1127-1137.
- Palis J, Yoder MC. Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man. *Exp Hematol*. 2001;29(8):927-936
- Palis J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Front Physiol*. 2014;5:3.
- Pan Y, Jiang Z, Ye Y, Zhu D, Li N, Yang G, Wang Y. Role and Mechanism of BMP4 in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Ann Biomed Eng*. 2023;51(7):1374-1389.
- Parabucki. Aktivnosti komponenata adenozienskog signalnog sistema astrocita u modelu moždane povrede in vitro in vivo, Doktorska disertacija. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu. 2013.
- Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strom SC. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*. 2008;26(2):300-11
- Paul P, Rothmann SA, Meagher RC. Modulation of erythropoietin production by adenosine. *J Lab Clin Med*. 1988;112(2):168-73.
- Paulson RF, Ruan B, Hao S, Chen Y. Stress Erythropoiesis is a Key Inflammatory Response. *Cells*. 2020;9(3):634.
- Paulson RF, Shi L, Wu DC. Stress erythropoiesis: new signals and new stress progenitor cells. *Curr Opin Hematol* 2011; 18:139-145.
- Păunescu V, Deak E, Herman D, Siska IR, Tănăsie G, Bunu C, Anghel S, Tatu CA, Oprea TI, Henschler R, Rüster B, Bistriean R, Seifried E. In vitro differentiation of human mesenchymal stem cells to epithelial lineage. *J Cell Mol Med*. 2007;11:502–508.
- Peng H. Extracellular Atp Signalling Mechanisms in Mesenchymal Stem Cells. Ph.D. Dissertation. University of Leeds (United Kingdom). Order Number: AAI28127008.V, 2014.
- Penz M, Kirschbaum C, Buske-Kirschbaum A, Wekenborg MK, Miller R. Stressful life events predict one-year change of leukocyte composition in peripheral blood. *Psychoneuroendocrinology* 2018; 94:17-24.
- Perera N, Ritchie RH, Tate M. The Role of Bone Morphogenetic Proteins in Diabetic Complications. *ACS Pharmacol Transl Sci*. 2019;3(1):11-20
- Perry JM, Harandi OF, Paulson RF. BMP4, SCF, and hypoxia cooperatively regulate the expansion of murine stress erythroid progenitors. *Blood*. 2007;109(10):4494-502.

- Perry JM, Harandi OF, Porayette P, et al. Maintenance of the BMP4-dependent stress erythropoiesis pathway in the murine spleen requires hedgehog signaling. *Blood*. 2009;113(4):911–918.
- Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglie D, Fossati G, Rubartelli A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(23):8067–72.
- Pineault KM, Song JY, Kozloff KM, Lucas D, Welik DM. Hox11 expressing regional skeletal stem cells are progenitors for osteoblasts, chondrocytes and adipocytes throughout life. *Nat Commun*. 2019;10(1):3168
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
- Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebé L, Papadaki HA. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cell Rev*. 2011;7:569-89.
- Porcu S, Manchinu MF, Marongiu MF, Sogos V, Poddie D, Asunis I, Porcu L, Marini MG, Moi P, Cao A, Grosveld F, Ristaldi MS. Klf1 affects DNase II-alpha expression in the central macrophage of a fetal liver erythroblastic island: a non-cell-autonomous role in definitive erythropoiesis. *Mol Cell Biol*. 2011;31(19):4144-54.
- Pricola KL, Kuhn NZ, Haleem-Smith H, Song Y, Tuan RS. Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism. *J Cell Biochem*. 2009;108(3):577-88.
- Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Feigenbaum GS, Rodriguez JE, Valdes D, Pattany PM, Zambrano JP, Hu Q, McNiece I, Heldman AW, Hare JM. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*. 2009;106:14022–14027.
- Ramkumar V, Hallam DM, Nie Z. Adenosine, oxidative stress and cytoprotection. *Jpn J Pharmacol*. 2001 Jul;86(3):265-74. doi: 10.1254/jjp.86.265. PMID: 11488425.
- Ramos P, Casu C, Gardenghi S, Breda L, Crielaard BJ, Guy E, Marongiu MF, Gupta R, Levine RL, Abdel-Wahab O, Ebert BL, Van Rooijen N, Ghaffari S, Grady RW, Giardina PJ, Rivella S. Macrophages support pathological erythropoiesis in polycythemia vera and  $\beta$ -thalassemia. *Nat Med*. 2013;19(4):437-45.
- Ramos P, Casu C, Gardenghi S, Laura Breda, Bart J Crielaard, Ritama Gupta, Ella Guy, Maria F Mariongiu, Ross L. Levine, Omar Abdel-Wahab, Benjamin L. Ebert, Nico van Rooijen, Saghi Ghaffari, Robert W Grady, Patricia Giardina, Stefano Rivella. Removal of Macrophages From the Erythroid Niche Impairs Stress Erythropoiesis but Improves Pathophysiology of Polycythemia Vera and Beta-Thalassemia. *Blood*. 2012;120(21):81.
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell* (1978) 15: 261-7.
- Ratajczak MZ, Adamiak M, Plonka M, Abdel-Latif A, Ratajczak J. Mobilization of hematopoietic stem cells as a result of innate immunity-mediated sterile inflammation in the bone marrow microenvironment-the involvement of extracellular nucleotides and purinergic signaling. *Leukemia*. 2018;32(5):1116-1123.
- Rauch A, Seitz S, Baschant U, Schilling AF, Illing A, Stride B, Kirilov M, Mandic V, Takacz A, Schmidt-Ullrich R, Ostermay S, Schinke T, Spanbroek R, Zaiss MM, Angel PE, Lerner UH, David JP, Reichardt HM, Amling M, Schütz G, Tuckermann JP. Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell Metab*. 2010;11(6):517-31.
- Ren G, Zhang L, Zhao X. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008; 2(2):141-150.
- Rettori V, Fernandez-Solari J, Mohn C, Zorrilla Zubilete MA, de la Cal C, Prestifilippo JP, De Laurentis A. Nitric oxide at the crossroad of immunoneuroendocrine interactions. *Ann NY Acad Sci* 2009;1153:35-47.

- Rhodes MM, Kopsombut P, Bondurant MC, Price JO, Koury MJ. Adherence to macrophages in erythroblastic islands enhances erythroblast proliferation and increases erythrocyte production by a different mechanism than erythropoietin. *Blood*. 2008;111(3):1700–1708.
- Rich IN, Kubanek B. The effect of reduced oxygen tension on colony formation of erythropoietic cells in vitro. *Br J Haematol*. 1982;52(4):579-88.
- Rich PB, Douillet CD, Mahler SA, Husain SA, Boucher RC. Adenosine triphosphate is released during injurious mechanical ventilation and contributes to lung edema. *J Trauma*. 2003;55(2):290-7.
- Riddle RC, Taylor AF, Rogers JR, Donahue HJ. ATP release mediates fluid flow-induced proliferation of human bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*. 2007;22(4): 589-600
- Rissiek B, Haag F, Boyer O, Koch-Nolte F, Adriouch S. P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. *Front Immunol*. 2015 ;6:204.
- Riz I, Hawley RG. G1/S transcriptional networks modulated by the HOX11/TLX1 oncogene of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene*. 2005;24(36):5561-75.
- Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(12):885-96.
- Rossi L, Manfredini R, Bertolini F, Ferrari D, Fogli M, Zini R, Salati S, Salvestrini V, Gulinelli S, Adinolfi E, Ferrari S, Di Virgilio F, Baccarani M, Lemoli RM. The extracellular nucleotide UTP is a potent inducer of hematopoietic stem cell migration. *Blood*. 2007;109(2):533-42.
- Rossi L, Salvestrini V, Ferrari D, Di Virgilio F, Lemoli RM. The sixth sense: hematopoietic stem cells detect danger through purinergic signaling. *Blood*. 2012;120(12):2365-75.
- Ruan B, Chen Y, Trimidal S, Koo I, Qian F, Cai J, Mcguigan J, Hall MA, Patterson AD, Prabhu KS, Paulson RF. Nitric oxide regulates metabolism in murine stress erythroid progenitors to promote recovery during inflammatory anemia. *bioRxiv* 2023:2023.03.11.532207.
- Russell ES. Hereditary anemias of the mouse: a review for geneticists. *Adv Genet*. 1979;20:357-459.
- Sadahira Y, Yoshino T, Monobe Y. Very late activation antigen 4-vascular cell adhesion molecule 1 interaction is involved in the formation of erythroblastic islands. *J Exp Med*. 1995;181(1):411-5.
- Sajjadi FG, Takabayashi K, Foster AC, Domingo RC, Firestein GS. Inhibition of TNF-alpha expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors. *J Immunol* 1996;156(9):3435–42.
- Sala E, Genua M, Petti L, Anselmo A, Arena V, Cibella J, Zanotti L, D'Alessio S, Scaldaferrri F, Luca G, Arato I, Calafiore R, Sgambato A, Rutella S, Locati M, Danese S, Vetrano S. Mesenchymal stem cells reduce colitis in mice via release of TSG6, independently of their localization to the intestine. *Gastroenterology*. 2015;149:163–176.e20.
- Santhanam AV, Smith LA, Nath KA, Katusic ZS. In vivo stimulatory effect of erythropoietin on endothelial nitric oxide synthase in cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(2):H781-6.
- Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(12):7265-70.
- Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Mesenchymal Stem Cells Produce Nitric Oxide, a Key Molecule for T Cell Suppression, upon Interaction with Activated T Cells. *Blood*. 2006;108(11):2556.
- Sattler C, Steinsdoerfer M, Offers M, Fischer E, Schierl R, Heseler K, Däubener W, Seissler J. Inhibition of T-cell proliferation by murine multipotent mesenchymal stromal cells is mediated by CD39 expression and adenosine generation. *Cell Transplant*. 2011;20(8):1221-30.
- Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006;441:1075-9.
- Schrier SM, van Tilburg EW, van der Meulen H, Ijzerman AP, Mulder GJ, Nagelkerke JF. Extracellular adenosine-induced apoptosis in mouse neuroblastoma cells: studies on involvement of adenosine receptors and adenosine uptake. *Biochem Pharmacol*. 2001;61(4):417-25.

- Schwiebert LM, Rice WC, Kudlow BA, Taylor AL, Schwiebert EM. Extracellular ATP signaling and P2X nucleotide receptors in monolayers of primary human vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002;282(2):C289-301.
- Shami PJ, Weinberg JB. Differential effects of nitric oxide on erythroid and myeloid colony growth from CD34+ human bone marrow cells. *Blood* 1996; 87:977-982
- Shi C, Jia T, Mendez-Ferrer S, Hohl TM, Serbina NV, Lipuma L, Leiner I, Li MO, Frenette PS, Pamer EG. Bone marrow mesenchymal stem and progenitor cells induce monocyte emigration in response to circulating toll-like receptor ligands. *Immunity.* 2011;34(4):590-601.
- Shi L, Shi L, Wang X, He J. Regulatory Roles of Osteopontin in Production of Monocyte-Origin MCP-1. *Cell Transplant.* 2018;27(8):1185-1194.
- Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol.* 2011;164:1-8.
- Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122(3):787-795.
- Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6):343-55.
- Singh S, Anshita D, Ravichandiran V. MCP-1: Function, regulation, and involvement in disease. *Int Immunopharmacol.* 2021;101(Pt B):107598.
- Song A, Zhang Y, Han L, Yegutkin GG, Liu H, Sun K, D'Alessandro A, Li J, Karmouty-Quintana H, Iriyama T, Weng T, Zhao S, Wang W, Wu H, Nemkov T, Subudhi AW, Jameson-Van Houten S, Julian CG, Lovering AT, Hansen KC, Zhang H, Bogdanov M, Dowhan W, Jin J, Kellems RE, Eltzschig HK, Blackburn M, Roach RC, Xia Y. Erythrocytes retain hypoxic adenosine response for faster acclimatization upon re-ascent. *Nat Commun.* 2017;8:14108..
- Stellacci E, Di Noia A, Di Baldassarre A, Migliaccio G, Battistini A, Migliaccio AR. Interaction between the glucocorticoid and erythropoietin receptors in human erythroid cells. *Exp Hematol.* 2009;37(5):559-72.
- Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing micro-environments. *J Leukoc Biol.* 2004;76:509–13.
- Stuehr DJ. Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:339-59.
- Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity.* 2006;25(6):977-88.
- Sung JH, Yang HM, Park JB, Choi GS, Joh JW, Kwon CH, Chun JM, Lee SK, Kim SJ. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. *Transplant Proc.* 2008;40(8):2649-54.
- Suresh S, de Castro LF, Dey S, Robey PG, Noguchi CT. Erythropoietin modulates bone marrow stromal cell differentiation. *Bone Res.* 2019;7:21
- Suresh S, Lee J, Noguchi CT. Effects of Erythropoietin in White Adipose Tissue and Bone Microenvironment. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:584696.
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 1996;272(5262):735–8.
- Takedachi M, Oohara H, Smith BJ, Iyama M, Kobashi M, Maeda K, Long CL, Humphrey MB, Stoecker BJ, Toyosawa S, Thompson LF, Murakami S. CD73-generated adenosine promotes osteoblast differentiation. *J Cell Physiol.* 2012;227(6):2622-31.
- Tang QQ, Lane MD. Activation and centromeric localization of CCAAT/enhancer-binding proteins during the mitotic clonal expansion of adipocyte differentiation. *Genes Dev.* 1999;13(17):2231-41.
- Tanioka, T.; Tamura, Y.; Fukaya, M.; Shinozaki, S.; Mao, J.; Kim, M.; Shimizu, N.; Kitamura, T.; Kaneki, M. Inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide donor decrease insulin receptor substrate-2 protein expression by promoting proteasome-dependent degradation in pancreatic beta-cells: Involvement of glycogen synthase kinase-3beta. *J. Biol. Chem.* 2011;286:29388–29396

- Tejedo JR, Tapia-Limonchi R, Mora-Castilla S, Cahuana GM, Hmadcha A, Martin F, Bedoya FJ, Soria B. Low concentrations of nitric oxide delay the differentiation of embryonic stem cells and promote their survival. *Cell Death Dis.* 2010; 7;1(10):e80
- Thapa A, Abdelbaset-Ismail A, Chumak V, Adamiak M, Brzezniakiewicz-Janus K, Ratajczak J, Kucia M, Ratajczak MZ. Extracellular Adenosine (eAdo) - A<sub>2B</sub> Receptor Axis Inhibits in Nlrp3 Inflammasome-dependent Manner Trafficking of Hematopoietic Stem/progenitor Cells. *Stem Cell Rev Rep.* 2022;18(8):2893-2911.
- Theurl M, Theurl I, Hochegger K, Obrist P, Subramaniam N, van Rooijen N, Schuemann K, Weiss G. Kupffer cells modulate iron homeostasis in mice via regulation of hepcidin expression. *J Mol Med (Berl).* 2008;86(7):825-35.
- Tordjman R, Delaire S, Plouët J, Ting S, Gaulard P, Fichelson S, Roméo PH, Lemarchandel V. Erythroblasts are a source of angiogenic factors. *Blood.* 2001;97(7):1968-74.
- Trento C, Marigo I, Pievani A, Galleu A, Dolcetti L, Wang CY, Serafini M, Bronte V, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stromal cells induce nitric oxide synthase-dependent differentiation of CD11b<sup>+</sup> cells that expedite hematopoietic recovery. *Haematologica.* 2017;102(5):818-825.
- Trivedi G, Inoue D, Chen C, Bitner L, Chung YR, Taylor J, Gönen M, Wess J, Abdel-Wahab O, Zhang L. Muscarinic acetylcholine receptor regulates self-renewal of early erythroid progenitors. *Sci Transl Med.* 2019;11(511):eaaw3781
- Tsutsui M, Shimokawa H, Morishita T, Nakashima Y, Yanagihara N. Development of genetically engineered mice lacking all three nitric oxide synthases. *J Pharmacol Sci.* 2006;102:147–154.
- Tung LT, Wang H, Belle JI, Petrov JC, Langlais D, Nijnik A. p53-dependent induction of P2X7 on hematopoietic stem and progenitor cells regulates hematopoietic response to genotoxic stress. *Cell Death Dis.* 2021;12(10):923.
- Tushinski RJ, Oliver IT, Guilbert LJ, Tynan PW, Warner JR, Stanley ER. Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy. *Cell.* 1982;28(1):71-81.
- Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol.* 2006;36(10):2566-73.
- Ulyanova T, Padilla SM, Papayannopoulou T. Stage-specific functional roles of integrins in murine erythropoiesis. *Exp Hematol.* 2014;42(5):404-409.e4.
- Valent P, Büsche G, Theurl I, Uras IZ, Germing U, Stauder R, Sotlar K, Füreder W, Bettelheim P, Pfeilstöcker M, Oberbauer R, Sperr WR, Geissler K, Schwaller J, Moriggl R, Béné MC, Jäger U, Horny HP, Hermine O. Normal and pathological erythropoiesis in adults: from gene regulation to targeted treatment concepts. *Haematologica.* 2018;103(10):1593-1603.
- Valtieri M, Gabbianelli M, Pelosi E, Bassano E, Petti S, Russo G, Testa U, Peschle C. Erythropoietin alone induces erythroid burst formation by human embryonic but not adult BFU-E in unicellular serum-free culture. *Blood.* 1989;74(1):460-70.
- Vasandan AB, Jahnavi S, Shashank C, Prasad P, Kumar A, Prasanna SJ. Human Mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE<sub>2</sub>-dependent mechanism. *Sci Rep.* 2016;6:38308.
- Vignjević Petrinović S, Budeč M, Marković D, Gotić M, Mitrović Ajtić O, Mojsilović S, Stošić-Grujičić S, Ivanov M, Jovčić G, Čokić V. Macrophage migration inhibitory factor is an endogenous regulator of stress-induced extramedullary erythropoiesis. *Histochem Cell Biol.* 2016;146(3):311-24.
- Vignjević Petrinović S, Budeč M, Marković D, Mitrović Ajtić O, Jovčić G, Milošević M, Momčilović S, Čokić V. Nitric oxide-dependent expansion of erythroid progenitors in a murine model of chronic psychological stress. *Histochem Cell Biol.* 2020;153(6):457-468.
- Vignjević Petrinović S, Jauković A, Milošević M, Bugarski D, Budeč M. Targeting Stress Erythropoiesis Pathways in Cancer. *Front Physiol.* 2022;13:844042.

- Vignjević S, Budec M, Marković D, Dikić D, Mitrović O, Diklic M et al. Glucocorticoid receptor mediates the expansion of splenic late erythroid progenitors during chronic psychological stress. *J Physiol Pharmacol*. 2015;66(1):91-100.
- Vignjević S, Budeč M, Marković D, Dikić D, Mitrović O, Mojsilović S, Durić SV, Koko V, Cokić BB, Cokić V, Jovčić G. Chronic psychological stress activates BMP4-dependent extramedullary erythropoiesis. *J Cell Mol Med*. 2014;18(1):91-103.
- Vignjević S. Čelijski i molekularni mehanizmi regulacije eritrocitopoeze u uslovima hroničnog stresa. Doktorska disertacija. Beograd: Univerzitet u Beogradu, Medicinski fakultet. 2014.
- von Lindern M, Zauner W, Mellitzer G, Steinlein P, Fritsch G, Huber K, Löwenberg B, Beug H. The glucocorticoid receptor cooperates with the erythropoietin receptor and c-Kit to enhance and sustain proliferation of erythroid progenitors in vitro. *Blood* 1999;94:550-559.
- Voorhees JL, Powell ND, Moldovan L, Mo X, Eubank TD, Marsh CB. Chronic restraint stress upregulates erythropoiesis through glucocorticoid stimulation. *PLoS One*. 2013 Oct 18;8(10):e77935.
- Wang J, Liu Y, Ding H, Shi X, Ren H. Mesenchymal stem cell-secreted prostaglandin E2 ameliorates acute liver failure via attenuation of cell death and regulation of macrophage polarization. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12:15.
- Wang J, Takemura N, Saitoh T. Macrophage Response Driven by Extracellular ATP. *Biol Pharm Bull*. 2021;44(5):599-604.
- Wang J, Wang R, Wang H, Yang X, Yang J, Xiong W, Wen Q, Ma L. Glucocorticoids Suppress Antimicrobial Autophagy and Nitric Oxide Production and Facilitate Mycobacterial Survival in Macrophages. *Sci Rep*. 2017;7(1):982.
- Wang Y, Szretter KJ, Vermi W, Gilfillan S, Rossini C, Cella M, Barrow AD, Diamond MS, Colonna M. IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat Immunol*. 2012;13(8):753-60.
- Wei Q, Boulais PE, Zhang D, Pinho S, Tanaka M, Frenette PS. Mafk expressed by macrophages, but not erythroblasts, maintains postnatal murine bone marrow erythroblastic islands. *Blood*. 2019;133(11):1222-1232
- Wessely O, Deiner EM, Beug H, von Lindern M. The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *EMBO J* 1997; 16:267–280
- Wolfe AR, Trenton NJ, Debeb BG, Larson R, Ruffell B, Chu K, Hittelman W, Diehl M, Reuben JM, Ueno NT, Woodward WA. Mesenchymal stem cells and macrophages interact through IL-6 to promote inflammatory breast cancer in pre-clinical models. *Oncotarget*. 2016;7:82482–82492.
- Wu H, Klingmüller U, Besmer P, Lodish HF. Interaction of the erythropoietin and stem-cell-factor receptors. *Nature*. 1995;377(6546):242-6.
- Xia C, Wang T, Cheng H, Dong Y, Weng Q, Sun G, Zhou P, Wang K, Liu X, Geng Y, Ma S, Hao S, Xu L, Guan Y, Du J, Du X, Li Y, Zhu X, Shi Y, Xu S, Wang D, Cheng T, Wang J. Mesenchymal stem cells suppress leukemia via macrophage-mediated functional restoration of bone marrow microenvironment. *Leukemia*. 2020;34:2375–2383.
- Xia Y, He XT, Xu XY, Tian BM, An Y, Chen FM. Exosomes derived from M0, M1, and M2 macrophages exert distinct influences on the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells. *PeerJ*. 2020;8:e8970.
- Xiang J, Wu DC, Chen Y and Paulson RF. In vitro culture of stress erythroid progenitors identifies distinct progenitor populations and analogous human progenitors. *Blood*. 2015;125(11):1803–1812.
- Xu D, Yang M, Capitano M, Guo B, Liu S, Wan J, Broxmeyer HE, Huang X. Pharmacological activation of nitric oxide signaling promotes human hematopoietic stem cell homing and engraftment. *Leukemia*. 2021;35(1):229-234.

- Xu S, Zhu W, Shao M, Zhang F, Guo J, Xu H, Jiang J, Ma X, Xia X, Zhi X, Zhou P, Lu F. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) attenuates inflammation after spinal cord injury by promoting macrophages/microglia M2 polarization in mice. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):155.
- Yien YY, Bieker JJ. EKLF/KLF1, a tissue-restricted integrator of transcription control, chromatin remodeling, and lineage determination. *Mol Cell Biol* 2013;33(1):4–13.
- Yokoyama T, Etoh T, Kitagawa H, Tsukahara S, Kannan Y. Migration of erythroblastic islands toward the sinusoid as erythroid maturation proceeds in rat bone marrow. *J Vet Med Sci*. 2003 ;65(4):449-52.
- Yokoyama T, Kitagawa H, Takeuchi T, Tsukahara S, Kannan Y. No apoptotic cell death of erythroid cells of erythroblastic islands in bone marrow of healthy rats. *J Vet Med Sci*. 2002;64:913–919
- Yu B, Sondag GR, Malcuit C, Kim MH, Safadi FF. Macrophage-associated osteoactivin/GPNMB mediates mesenchymal stem cell survival, proliferation, and migration via a CD44-dependent mechanism. *J Cell Biochem*. 2016;117:1511–1521.
- Yuan X, Mills T, Doursout MF, Evans SE, Vidal Melo MF, Eltzschig HK. Alternative adenosine Receptor activation: The netrin-Adora2b link. *Front Pharmacol*. 2022;13:944994.
- Zamai L, Secchiero P, Pierpaoli S, Bassini A, Papa S, Alnemri ES, Guidotti L, Vitale M, Zauli G. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood*. 2000;95(12):3716-24.
- Zermati Y, Fichelson S, Valensi F, Freyssinier JM, Rouyer-Fessard P, Cramer E, Guichard J, Varet B, Hermine O. Transforming growth factor inhibits erythropoiesis by blocking proliferation and accelerating differentiation of erythroid progenitors. *Exp Hematol*. 2000;28(8):885-94.
- Zhang S, Lv C, Yang X, Han Z, Zhang S, Zhang J, Zong C, Gao L, Li L, Zhao Q, Li R, Yang Y, Yu F, Li X, Zhang P, Wei L. Corticosterone mediates the inhibitory effect of restraint stress on the migration of mesenchymal stem cell to carbon tetrachloride-induced fibrotic liver by downregulating CXCR4/7 expression. *Stem Cells Dev*. 2015;24(5):587-96.
- Zhang W, Yang N, Shi XM. Regulation of mesenchymal stem cell osteogenic differentiation by glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ). *J Biol Chem*. 2008;283(8):4723-9.
- Zhang Y, Wang L, Dey S, Alnaeeli M, Suresh S, Rogers H, Teng R, Noguchi CT. Erythropoietin action in stress response, tissue maintenance and metabolism. *Int J Mol Sci*. 2014;15(6):10296-333
- Zhao M, Chen J, Wang W, Wang L, Ma L, Shen H, Li M. Psychological stress induces hypoferremia through the IL-6-hepcidin axis in rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373(1):90-3.
- Zheng Y, Wang N, Wang S, Zhang J, Yang B, Wang Z. Chronic psychological stress promotes breast cancer pre-metastatic niche formation by mobilizing splenic MDSCs via TAM/CXCL1 signaling. *J Exp Clin Cancer Res*. 2023;42(1):129.
- Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001;7(2):211-28.

**Publikovani radovi iz teze:**

1. Momčilović S, Bogdanović A, Milošević MS, Mojsilović S, Marković DC, Kočović DM, Vignjević Petrinović S. Macrophages Provide Essential Support for Erythropoiesis, and Extracellular ATP Contributes to a Erythropoiesis-Supportive Microenvironment during Repeated Psychological Stress. *Int J Mol Sci.* 2023 Jul 12;24(14):11373. doi: 10.3390/ijms241411373.
2. Momčilović S, Vignjević Petrinović S, Bogdanović A. Molekularni mehanizmi regulacije eritrocitopoeze i stres eritrocitopoeze. *Medicinski podmladak* 2024; 75(6). DOI 10.5937/mp75-47680



## BIOGRAFIJA

Sanja Momčilović je rođena 22. jula 1988. godine u Surdulici. Nakon završene gimnazije opšteg smera u Surdulici, školske 2007/2008. Godine, upisala je studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Nišu. Diplomirala je 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,15. Nakon obavljenog opšteg lekarskog staža na Vojnomedicinskoj akademiji u Beogradu položila je državni ispit 28.10.2014. godine. U periodu 2015-2016. godine je radila u domu zdravlja „Medigroup“ kao lekar opšte prakse. Školske 2015/2016. godine upisala je akademske doktorske studije na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na programu Molekularna medicina. Specijalizaciju iz dermatovenerologije na istom fakultetu upisala je školske 2023/2024. godine. Na Insitutu za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu zaposlena je od 2016. godine kao istraživač pripravnik, a 2021. godine je stekla zvanje istraživača saradnika. Učestovala je u dva projekta Ministarstva Republike Srbije nadležnog za nauku, a trenutno je koordinatoka radnog paketa na projektu Fonda za nauku Republike Srbije, dve bilatelarne saradnje i jedne *COST* akcije. Autor je ili koautor ukupno 16 bibliografskih jedinica, od čega 6 publikacija objavljenih u celini u časopisima indeksiranim u *Institute of Science Index* bazama podataka (SCI i SCIE).). Član je Evropskog hematološkog udruženja, Lekarske komore Srbije, Međunarodnog društva za masno tkivo koštane srži, Udruženja dermatovenerologa Srbije.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Сања Момчиловић

Број индекса ДС-ММ-17/15

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

МЕХАНИЗМИ ИНТЕРАКЦИЈА МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА И МАКРОФАГА  
У РЕГУЛАЦИЈИ СТРЕС ЕРИТРОЦИТОПОЕЗЕ

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

### Потпис аутора

У Београду, 12.1.2024

Момчић Сања

образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског  
рада**

Име и презиме аутора Сања Момчиловић

Број индекса ДС-ММ-17/15

Студијски програм Молекуларна медицина  
МЕХАНИЗМИ ИНТЕРАКЦИЈА МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА И МАКРОФАГА У  
Наслов рада РЕГУЛАЦИЈИ СТРЕС ЕРИТРОЦИТОПОЕЗЕ

Ментор Проф. др Андрија Богдановић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис аутора**

У Београду, 12.1.2024

Момчилов Сања

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

МЕХАНИЗМИ ИНТЕРАКЦИЈА МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА И  
МАКРОФАГА У РЕГУЛАЦИЈИ СТРЕС ЕРИТРОЦИТОПОЕЗЕ

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.  
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

у Београду, 12. 1. 2024

Момчило Савић

1. **Ауторство.** Дозвољаваје умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваје умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваје умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваје умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваје умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваје умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.