

## ZNAČAJ RAZLIČITIH VRSTA ŽIVOTINJA U EKSPERIMENTALNIM MODELIMA ZA PROUČAVANJE HEMATOPOEZE *IN VIVO*\*

### *SIGNIFICANCE OF DIFFERENT ANIMAL SPECIES IN EXPERIMENTAL MODELS FOR IN VIVO INVESTIGATIONS OF HEMATOPOIESIS*

Milica Kovačević-Filipović, Tatjana Božić, Jelka Stevanović\*\*

*Do mnogobrojnih otkrića u medicini došlo se zahvaljujući eksperimentima na različitim vrstama životinja. Najčešće korišćene životinje u ispitivanjima procesa hematopoeze su laboratorijski miševi i pacovi, međutim i „velike” životinje, poput svinja, ovaca, mačaka, pasa i majmuna, evolutivno bližih ljudima, imaju svoje mesto u eksperimentalnoj hematologiji. Specifična problematika određene vrste životinja može da dovede do fundamentalnih saznanja o pojedinim aspektima procesa hematopoeze i biologiji matičnih ćelija hematopoeze. Takođe, uporedno ispitivanje pojedinih fenomena kod različitih vrsta pomaže u sagledavanju opštih zakonitosti u živom svetu. U domenu pretkliničkih ispitivanja životinjski modeli su nezaoblazni korak u izučavanju transplantacione biologije matičnih ćelija hematopoeze, kao i u izučavanju biološki aktivnih molekula sa efektom na hematopoetski sistem. Saznanja dobijena na životinjskim modelima imaju svoju primenu i u humanoj i u veterinarskoj medicini.*

*Ključne reči: životinje, eksperimentalni modeli, hematopoeza*

#### **Uvod / Introduction**

Ograničen životni vek zrelih ćelija krvi uslovljava potrebu za njihovim neprekidnim obnavljanjem koje se odvija procesom hematopoeze. Tokom ovog procesa iz malog broja primitivnih, pluripotentnih matičnih ćelija hematopoeze (PMČH), preko niza razvojnih stadijuma i pod dejstvom različitih faktora, neprekidno nastaju sve ćelije krvi. Aktuelna istraživanja na polju hematopoeze su-

\* Rad primljen za štampu 5. 3. 2004. godine

\*\* Mr Milica Kovačević-Filipović, asistent, dr Tatjana Božić, redovni profesor, Katedra za patološku fiziologiju, dr Jelka Stevanović, vanredni profesor, Katedra za fiziologiju, Fakultet veterinarske medicine, Beograd

merena na ispitivanja funkcionalnih osobina PMČH *in vitro* i *in vivo*, kao i njihovih karakteristika na molekularnom i biohemijskom nivou, a u cilju različitih i sve mnogobrojnijih mogućnosti njihove primene u terapiji hematoloških i nehematoloških malignih bolesti, zatim autoimunih bolesti, imunodeficijencija i drugih.

Ispitivanja biologije matičnih ćelija hematopoeze, kao i ispitivanja mogućnosti kliničke primene saznanja dobijenih fundamentalnim istraživanjima, odvijaju se na različitim vrstama životinja. Prvi korak u fundamentalnim istraživanjima, kao i u definisanju promena koje nastaju kod različitih bolesti hematopoetskog sistema i eventualnim mogućnostima terapije, predstavljaju *in vitro* test sistemi, kako iz etičkih tako i iz ekonomskih razloga. Zatim slede ispitivanja *in vivo*, odnosno koriste se različiti eksperimentalni modeli fizioloških i patoloških procesa i ispituju se mogući načini terapija, upravo na „malim” i „velikim” eksperimentalnim životinjama. S druge strane, vrlo često pre, a najčešće paralelno ili neposredno posle uspostavljanja određenog protokola za terapiju kod ljudi, dolazi do njegove primene i u veterinarskoj medicini. Upravo iz tog razloga u ovom radu je opisan značaj pojedinih eksperimentalnih životinjskih modela u ispitivanjima vezanim za proces hematopoeze.

#### **Istorijat, metode i značaj proučavanja hematopoeze /**

#### *History, methods and significance of hematopoiesis studies*

Prva zapažanja o nastanku krvnih ćelija, krajem 19. veka, bila su u domenu deskriptivne citologije i odnosila su se na morfologiju prethodnika zrelih ćelija krvi koji se nalaze u kostnoj srži. Veliki broj tih ćelija u mitozu naveo je na zaključak da se proces stvaranja krvnih ćelija odvija upravo na tom mestu. Međutim, s obzirom na skromne tehničke mogućnosti tadašnjih istraživača, svet malobrojnih i morfološki neprepoznatljivih, ali vrlo moćnih matičnih ćelija, morao je još malo da sačeka da bude otkriven. Prve pretpostavke o postojanju i prirodi matičnih ćelija, početkom 20. veka, dali su Maksimov i Vera Daničkova, formulišući monofiletičku teoriju po kojoj sve ćelije krvi imaju zajedničko poreklo. Najraniji dokazi o organizaciji hematopoetskog sistema dobijeni su sredinom 20. veka, primenom radijacione biologije i *in vivo* modela [50 i 64] na kojima je bilo moguće ispitivanje matičnih ćelija hematopoeze na osnovu njihovih funkcionalnih osobina. Tako je ustanovljeno da se 7-14 dana nakon transplantacije singene kostne srži letalno ozračenom mišu u slezini razvijaju kolonije nezrelih ćelija krvi. One nastaju od pluripotentnih matičnih ćelija nazvanih *colony forming unit – spleen* (CFU-S) koje su tada smatrane najprimitivnijim PMČH [65]. Kasnije je pokazano da CFU-S ne pripadaju kategoriji najprimitivnijih PMČH. Paralelan razvoj brojnih *in vivo* modela i *in vitro* sistema za kultivaciju ćelija, dali su kasnijih godina jasniju sliku toka hematopoeze. Tako je utvrđeno da se odeljak matičnih ćelija svih ispitivanih vrsta životinja sastoji od niza ćelija različitog stepena zrelosti. Najprimitivnije među PMČH imaju najveći kapacitet samoobnove sopstvene populacije, veliki proliferativni potencijal i mogućnost za diferentovanje u sve loze krvnih

ćelija, kao i mogućnost kompletne i trajne obnove hematopoeze kod primaoca sa suprimiranom sopstvenom hematopoezom. Sazrevanje ovih ćelija vodi opadanju mogućnosti samoobnove, ograničavanju proliferativnog potencijala i mogućnosti diferentovanja, ali rezultira povećanjem proliferativne aktivnosti [32, 49, 51, 52].

Proces hematopoeze se odvija u mikrosredini kostne srži koja ima ključnu ulogu u njenoj regulaciji. Mikrosredina hematopoeze podrazumeva funkcionalno jedinstvo stromalnih ćelija i njihovih proizvoda (molekuli međucelijske supstance i biološki aktivni molekuli) koji imaju stimulatorna [53] i/ili inhibitorna dejstva [47, 48, 56, 68]. Među biološki aktivnim molekulima koji regulišu proces hematopoeze nalaze se citokini u koje se ubrajaju faktori rasta (G-CSF\*, GM-CSF\*\*), eritropoetin [12] i razni drugi citokini kao što su IL-1 i IL-6 [39, 60]. Jedan od uslova mikrosredine koji ima veliki uticaj na matične ćelije hematopoeze je i parcijalni pritisak kiseonika [35, 60]. U ostale faktore neophodne za normalno odvijanje procesa hematopoeze ubrajaju se različiti mikroelementi, vitamini i hormoni [28, 57].

Dinamika hematopoeze zdravih jedinki je uvek dobro prilagođena potrebama organizma. Tako, na primer, hipoksija tkiva stimuliše stvaranje eritropoetina [58], koji obezbeđuje proliferaciju i preživljavanje većeg broja matičnih ćelija eritrocitopoeze i nastanak većeg broja eritrocita, čime se uspostavlja bolje snabdevanje tkiva kiseonikom koje je u početku bilo narušeno hipoksijom. Opsežno oštećenje tkiva i posledični razvoj zapaljenjske reakcije dovodi do oslobađanja proinflammatoryh medijatora (na primer, IL-1 i IL-6) koji stimulišu kostnu srž na proizvodnju većeg broja mladih granulocita i monocita [37, 54, 59] koji treba da uklone štetne agense i ćelijski detritus, kao i da pokrenu obnovu oštećenog tkiva. Takođe, deficit pojedinih materija, trovanje i jonizujuće zračenje takođe se odražavaju na promene u broju i funkcionalnoj aktivnosti krvnih ćelija [13, 14].

Centralno mesto u regulaciji procesa hematopoeze pripada citokinima. Mnogi od njih su otkriveni zahvaljujući *in vitro* kulturama matičnih ćelija. Razvoj genetskog inženjeringa doveo je do sinteze rekombinantnih citokina, čija je biološka aktivnost definisana brojnim *in vivo* ispitivanjima kako bi postali dostupni i za kliničku primenu. Tako se danas eritropoetin koristi i u humanoj [38] i u veterinarskoj medicini [61] u svim stanjima kada je njegova sinteza nedovoljna zbog oštećenja bubrega. Jedna od kliničkih primena G-CSF i GM-CSF je u okviru protokola za mobilizaciju matičnih ćelija kostne srži u perifernu krv i njihovu kasniju transplantaciju [9]. Najperspektivnija primena velikog broja citokina je njihova upotreba za *ex vivo* ekspanziju matičnih ćelija hematopoeze koja bi trebala da obezbedi uspešniju, kvalitetniju i bezbedniju transplantaciju ovih ćelija [18, 31]. Međutim, konačan broj ovih faktora nije definitivno utvrđen, kao što nisu u potpu-

---

\* G-CSF (*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) Faktor koji stimuliše rast granulocitnih kolonija.

\*\* GM-CSF (*Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor*) Faktor koji stimuliše rast granulocitno - monocitnih kolonija.

nosti razjašnjeni ni svi njihovi *in vivo* efekti. Neprekidno se otkrivaju novi citokini i dopunjuju se ili menjaju shvatanja o onima koji su već otkriveni, a jedan od nezao-bilaznih stadijuma, pre njihove eventualne kliničke primene je testiranje, ne samo *in vitro* nego i *in vivo*, upravo na životinjskim eksperimentalnim modelima.

### ■ Eksperimentalni modeli u hematologiji / *Experimental models in hematology*

Uspešnim modelom u biomedicinskim istraživanjima smatra se onaj koji podražava stanja u zdravom ili bolesnom ljudskom ili životinjskom organizmu, u kome se detaljno mogu da prate različiti fiziološki i patofiziološki procesi. Međutim, realno je očekivati da nijedan eksperimentalni model ne može u potpunosti da zadovolji sve potrebe istraživača. Takođe, često se dešava da se baš sumiranjem podataka dobijenih na specifičnostima pojedinih modela može da dođe do kompletnog rešenja nekog problema.

Interesovanje za detaljnu analizu i proučavanje hematopoeze kod različitih vrsta životinja važno je za utvrđivanje fundamentalnih procesa funkcionisanja živog sveta. Takođe, podjednako je važno i sa stanovišta uspostavljanja životinjskih modela koji bi poslužili za utvrđivanje principa dijagnostike i terapije različitih oboljenja sistema za hematopoezu, odnosno i samih matičnih ćelija. Ispitivanje PMČH nije moguće bez *in vivo* eksperimenata na životinjama, jer ne postoje *in vitro* sistemi u kojima se u potpunosti mogu da ispolje njihove funkcionalne osobine.

Najintenzivnija istraživanja u domenu hematopoeze obavljaju se na **mišu**. Razloga za to ima više, a jedan od njih je visoka srodnost sojeva laboratorijskih miševa koja omogućava dobijanje reproducibilnih rezultata i olakšava donošenje zaključaka radi objašnjenja određenih pojava. Osim toga, mala telesna masa ovih životinja omogućava testiranje relativno malih količina biološki aktivnih molekula na velikom broju pojedinačnih uzoraka. Savremene tehnologije obezbedile su uslove izvođenja izuzetno suptilnih poduhvata, kao što je ciljano izazivanje mutacija na životinjama (transgene ili „knock-out” životinje), koje pružaju mogućnosti ispitivanja pojedinih parametara *in vivo*, ne isključujući kompleksnost živog organizma, što svakako daje preciznije podatke o njihovim ulogama u odnosu na one dobijene *in vitro*. Zahvaljujući takvim modelima shvaćena je, na primer, važnost pojedinih adhezivnih molekula, citokina, hemokina i njihovih receptora angažovanih u kontroli hematopoeze. Takođe, miš je jedna od dve životinjske vrste na kojima je trenutno moguće proučavati PMČH ljudi posle ksenotransplantacije (druga vrsta životinja su ovce – opisano dalje u tekstu). Naime, specifična vrsta miševa sa kombinovanom imunodeficijencijom (NOD/SCID<sup>\*</sup>) čini humanu hematopoezu dostupnu proučavanju *in vivo*, jer se ne

---

\* NOD/SCID je skraćenica za englesku složenicu *non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency*, koja bi mogla da se prevede kao nekojzane dijabetične životinje sa teškom kombinovanom imunodeficijencijom.

razvija imunološka reakcija posle transplantacije PMČH ljudi čime se obezbeđuje njihova samoobnova, proliferacija i diferencijacija [31].

Paralelno sa izuzetno opsežnim istraživanjima na miševima obavljena su istraživanja i na pacovima kao „malim” eksperimentalnim životinjama [12]. Ostale životinjske vrste su uključivane u eksperimente sa nastojanjem razvijanja eksperimentalnih modela na „velikim” životinjama, koje bi specifičnom patologijom, sa jedne i evolutivnom bliskošću sa ljudima, sa druge strane, omogućile dalje i podrobnije razumevanje fizioloških i patofizioloških tokova hematopoeze, sve u cilju rešavanja kliničke problematike. Potreba za „velikim” životinjama postoji i kada se testiraju glavni i neželjeni efekti aktivnog principa i farmakodinamika i farmakokinetika potencijalnih lekova u terapiji hematoloških poremećaja.

Još od samog početka uvođenja *in vitro* metoda za ispitivanje matičnih ćelija hematopoeze, u istraživanja su uključene **ovce** [71], koje su danas važne eksperimentalne životinje za proučavanje PMČH ljudi *in vivo*. Naime, Zanjani i saradnici [72] na ovci su razvili metodologiju *in utero* transplantacije humanih matičnih ćelija fetusima, kod koje se prihvatanje kalema odvija bez reakcije domaćina, s obzirom na preimuni status fetusa [62]. Prednost modela hematopoeze himere na velikoj životinji u odnosu na miša, je mogućnost kontinuiranog uzimanja veće količine uzoraka, i lakše detekcije i praćenja antigenski različitih matičnih ćelija donora (najčešće čoveka). Serija eksperimenata izvedenih na ovom modelu doprinela je definisanju adhezivnih molekula koji, pod fiziološkim uslovima, obezbeđuju prelazak matičnih ćelija iz krvi u kostnu srž [73]. Prednost ovog modela je mogućnost praćenja matičnih ćelija ljudi i njihovu diferencijaciju tokom niza godina, ne samo na istoj životinji, već i na njenim potomcima [24]. Poslednja istraživanja objavljena na opisanom modelu ovce odnose se na dokazivanje **plastičnosti** matičnih ćelija hematopoeze, odnosno mogućnosti promene njihovih funkcionalnih i morfoloških osobina zavisno od mikrosredine u kojoj se nalaze [8]. Jedan od primera plastičnosti je transformacija primitivnih matičnih ćelija za hematopoezu u matične ćelije nervnog ili mišićnog tkiva [8].

**Psi** su životinje koje su se među prvima koristile u eksperimentalnoj hematologiji i još uvek se koriste u ispitivanjima vezanim za transplantaciju matičnih ćelija hematopoeze. Još 1600. godine William Harvey je na psu izveo transfuziju krvi. Zatim su usledili brojni bazični i preklinički eksperimenti u oblasti radijacione biologije i ispitivanja efekata zračenja na kostnu srž, matične ćelije hematopoeze i na maligne bolesti hematopoetskog sistema [16, 46]. Razumevanje patofiziologije ciklične hematopoeze, specifičnog autozomnog recesivnog oboljenja koje se javlja i kod ljudi, obezbeđeno je upravo izučavanjem ovog oboljenja kod pasa rase grej koli. Naime, ustanovljeno je da se promene u broju različitih vrsta krvnih ćelija javljaju sa neverovatnom pravilnošću, a da se na istovetan način menja i broj opredeljenih matičnih ćelija, odnosno da se radi o poremećaju matičnih ćelija [4].

Sigurno najznačajnija uloga pasa kao eksperimentalnih životinja u istraživanjima procesa hematopoeze leži u proučavanju autologe i alogene trans-

plantacije matičnih ćelija hematopoeze [40], zatim u izučavanju reakcije kalema protiv domaćina prilikom transplantacije [63] i u ispitivanju mogućnosti primene hematopoetskih faktora rasta i genske terapije u lečenju teške kombinovane imunodeficijencije [70]. Upravo rezultati tih i drugih istraživanja doveli su do primene G-CSF u nekoliko terapijskih protokola. Naime, danas se G-CSF koristi za skraćivanje trajanja neutropenije izazvane hemoterapijom malignih oboljenja, zatim za ubrzanje porasta broja neutrofila posle transplantacije kostne srži, za mobilizaciju matičnih ćelija kostne srži u krv, kao i za tretman teških hroničnih neutropenija (na primer, kod nekih imunodeficientnih stanja). Pri tom se G-CSF na isti način primenjuje u humanoj i veterinarskoj medicini [29, 55]. U kliničkim protokolima za lečenje malignih bolesti pasa poslednjih godina sve više se primenjuje transplantacija matičnih ćelija hematopoeze koja je omogućena upravo *in vivo* ispitivanjima na samim psima [26].

Najopsežnija, vrlo sistematična, ispitivanja na **mačkama** odnose se na problematiku održavanja hematopoeze aktivacijom primitivnih matičnih ćelija. Naime, Abkowitz i saradnici su nizom eksperimenata [3, 5, 6, 7] dali dokaz *teorije klonске sukcesije*, po kojoj hematopoezu održavaju populacija aktivnih matičnih ćelija i populacija ćelija u neaktivnoj fazi ćelijskog ciklusa – rezerva koja se povremeno aktivira. Suprotno gledište je da se samoobnovom određene populacije matičnih ćelija može da održava hematopoeza do kraja života. Tokom ovog ispitivanja korišćen je specifičan eksperimentalni model mačke na kome je, praćenjem odgovarajućih izotipova enzima, zaključeno da se hematopoeza održava zahvaljujući stohastičkom uključivanju pojedinih klonova matičnih ćelija u diferencijaciju ka zrelijim stadijumima. Isti autori su, takođe, na modelu mačke, došli do zaključka da mačka, miš i čovek imaju u organizmu isti broj matičnih ćelija, kao i da je ta karakteristika dobro konzervirana kroz evoluciju [2].

Velike sličnosti sa ljudima čine **majmune** značajnim eksperimentalnim životinjama u oblasti tehnologije genskog transfera i u pretkliničkim ispitivanjima različitih pristupa transplantacije matičnih ćelija hematopoeze i njihove *ex vivo* ekspanzije [15, 27, 30, 67]. Naime, iako je broj matičnih ćelija kod svih vrsta sisara isti, učestalost samoobnove i ulazak u ćelijski ciklus ovih ćelija je značajno različit u zavisnosti od veličine životinje i dužine njenog života [2]. Tako se PMČH miša mnogo češće dele i brže „troše” nego iste ćelije mačke, dok se ove ćelije mačke troše brže nego kod majmuna i ljudi. Usled ovakve razlike u aktivnosti matičnih ćelija, koja ima direktan uticaj i na tehnologiju genskog transfera i na njihovu transplantaciju, majmuni su mnogo prihvatljiviji model za rešavanje praktičnih aspekata pomenute problematike.

Što se tiče ispitivanja specifičnih oboljenja, i kod **majmuna** i kod **mačaka** su dokazana oboljenja izazvana retrovirusima koji dovode do patoloških promena analognih aplastičnoj anemiji i sindromu stečene imunodeficijencije ljudi (SIDA). Ispitivanje efekta navedenih virusa na hematopoezu ovih životinja, kao i ispitivanje različitih oblika terapije svakako može da ima značaj za analoge ovih oboljenja ljudi [1, 17, 25].

**Svinja** je danas široko prihvaćena eksperimentalna životinja u biomedicinskim istraživanjima. Iako su svinje u poređenju sa visokosrodnim sojevima miševa, genetski heterogena populacija, njihove fiziološke karakteristike kao što su veličina, dijetetske navike, funkcionisanje gastrointestinalnog sistema, kože, bubrega, struktura plućnog krvotoka, raspored koronarnih arterija i sklonost ka gojenju po kojima su slične ljudima, za istraživanja ih čine zanimljivijim od miševa i drugih eksperimentalnih životinja. [66]. Tokom niza godina istraživanja [20, 21, 22, 23], Emery i saradnici su na minijaturnim svinjama razvijali dva modela transplantacije matičnih ćelija hematopoeze koji bi bili pogodni za indukciju specifične tolerancije primaoca prema potencijalnom transplantatu.

Ipak u okviru hematoloških istraživanja, svinje su pretežno uključene u eksperimente u vezi sa anemijom nastalom usled deficita gvožđa [19]. Međutim, u dosadašnjoj literaturi hematopoeza svinje nije obrađena sa stanovišta *hematopoeze* i *specifične patologije* koja se odnosi na anemiju prasića nastalu usled deficita gvožđa. Regulacija metabolizma gvožđa i regulacija hematopoeze u uslovima njegovog deficita su oblasti koje još uvek nisu do kraja ispitane ni u humanoj patologiji. Anemija nastala usled deficita gvožđa još uvek predstavlja izuzetno rasprostranjen poremećaj i kod ljudi i kod životinja. Izučavanja ovog tipa anemije na eksperimentalnim modelima pokazala su da je gvožđe važno ne samo za sintezu hemoglobina, nego i za funkcionisanje regulatornih mehanizama na nivou „limfoidne” regulacije eritrocitopoeze [11, 69]. Takođe, veoma izražen deficit gvožđa može da poremeti elementarne metaboličke procese i tako dovede do zastoja u proliferaciji matičnih ćelija hematopoeze [34]. Reakcija kompletnog hematopoetskog sistema na nedostatak gvožđa još uvek nije u dovoljnoj meri izučena. Bannerman [10] naveo je pet genetski uzrokovanih sindroma poremećaja metabolizma gvožđa kod životinja i ljudi, čija su istraživanja dovela do novih saznanja. Među tim modelima se nalazi i beogradski anemični (b/b) pacov koji se pokazao pogodnim, ne samo za izučavanje eritrocitopoeze i hematopoeze [33, 36], već i za rešavanje fundamentalnih problema vezanih za sintezu eritropoetina [34].

Saradnjom Fakulteta veterinarske medicine i Instituta za medicinska istraživanja u Beogradu razvijena je metodologija kultivacije opredeljenih matičnih ćelija iz krvi i kostne srži svinje [41]. Dobijeni rezultati pokazuju da su broj opredeljenih matičnih ćelija za eritrocitopoezu i granulo-monocitopoezu u krvi i kostnoj srži svinje istog reda veličine kao i kod drugih ispitivanih životinja i kod ljudi [42, 43]. Takođe, procenat opredeljenih matičnih ćelija koje se nalaze u aktivnoj fazi ćelijskog ciklusa odgovara ovom parametru kod drugih vrsta sisara, što ukazuje da je ustrojstvo hematopoetskog sistema konzervirano kroz evoluciju [44]. Primenom utvrđene metodologije [45] dobijene su i informacije o matičnom odeljku hematopoeze i njenoj humoralnoj regulaciji kod prasića sa anemijom izazvanom nedostatkom gvožđa, koje ukazuju na kvalitativne poremećaje u odeljku opredeljenih matičnih ćelija (neobjavljeni rezultati – Kovačević). Dalja istraživanja na ovom planu mogla bi da upotpune dosadašnja saznanja stečena

izučavanjem sličnih anemija čoveka i životinja. Uz to bi, ovakav metodološki pristup ispitivanju matičnog odeljka hematopoeze svinja omogućio, sam za sebe, kvalitativno nov pomak u izučavanju patofiziologije ove životinje.

#### **Zaključak / Conclusion**

Do mnogobrojnih otkrića u hematologiji došlo se zahvaljujući eksperimentima na različitim vrstama životinja. Potreba za neprekidnim definisanjem i uspostavljanjem novih eksperimentalnih modela je opravdana, jer se samo sagledavanjem nekog problema iz različitih uglova može doći do njegovog pravog rešenja. Zato može da se kaže da je uvođenje u istraživanja „velikih” eksperimentalnih životinja, poput svinja, ovaca, mačaka, pasa i majmuna, neophodno, kako sa stanovišta rešavanja specifične problematike određene vrste, tako i u sagledavanju opštih zakonitosti u živom svetu. Nesumljivo krajnji motiv svih istraživanja je primena dobijenih rezultata radi unapređenja terapije, kako u humanoj, tako i u veterinarskoj medicini.

#### **Literatura / References**

1. Abkowitz J. L.: Retrovirus-induced feline pure red blood cell aplasia: pathogenesis and response to suramin. *Blood*, 77, 1442-1451, 1991. - 2. Abkowitz J. L., Catlin S. N., McCallie T. M., Gutter P.: Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood*, 100, 2665-2667, 2002. - 3. Abkowitz J. L., Cattlin S. N., Gutter P.: Evidence that hematopoiesis may be stochastic *in vivo*. *Nat. Med.*, 2, 190-197, 1996. - 4. Abkowitz J. L., Holly R. D., Hammond W. P.: Cyclic hematopoiesis in dogs: studies of erythroid burst forming cells confirm an early stem cell defect. *Exp. Hematol*, 16, 941-945, 1988. - 5. Abkowitz J. L., Linenberger M. L., Newton M. A., Shelton G. H., Ott R. L., Gutter P.: Evidence for the maintenance of hematopoiesis in a large animal by the sequential activation of stem cell clones, 87, 9062-9066, 1990. - 6. Abkowitz J. L., Ott R. M., Holly R. D., Adamson J. W.: Clonal evolution following chemotherapy-induced stem cell depletion in cats heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood*, 71, 1687-1692, 1988. - 7. Abkowitz J. L., Persik M. T., Shelton G. H.: The behaviour of hematopoietic stem cells in large animal. *Proc Natl Acad Sci*, 92, 2031-2035, 1995. - 8. Almeida-Porada G., Zanjan E. D.: A large animal noninjury model for study of human stem cell plasticity. *Blood Cells, Molecules and Disease*, 32, 77-81, 2004. - 9. Balint B., Ivanović Z.: Transplantacija matičnih ćelija mobilisanih u perifernu krv. *Bilten za transfuziologiju*, 23, 5-11, 1995. - 10. Bannerman R. M.: Genetic defects of iron transport. *Fed. Proc*, 35, 2281-2285, 1976. - 11. Bazarnyi V. V., Iastrebov A. P.: Disordered lymphoid regulation of hematopoiesis in iron-deficiency anemia. *Patol. Fiziol. Eksp. Ter*, 3, 34-36, 1991. - 12. Biljanović-Paunović L., Clemons G. K., Ivanović Z., Pavlović-Kentera V.: Erythropoietin and erythroid progenitors in rats exposed to chronic hypoxia. *Indian J. Med. Res*, 104, 304-310, 1996. - 13. Božić Tatjana, Stevanović Jelka, Kovačević Milica, Jović S., Lukić S., Petakov M., Borozan Sunčica, Mijačević Zora, Knežević Milijana, Bulajić S.: Toluene mediated oxidative stress and granulomonocytopenia. *Acta Vet*, 53, 201-211, 2003. - 14. Božić Tatjana, Stevanović Jelka, Kovačević-Filipović Milica, Jović S., Popović D., Todorović D.: Possible effects of depleted uranium (DU) on peripheral blood and biochemical parameters in cattle. 5<sup>th</sup> Regional Conference on Environment and Food Quality, 4-5 September, Book of Abstracts, 25, 2003. - 15. Brandt J. E., Bartholomew A. M., Fortman J. D., Nelson M. C., Bruno E., Chen L. M., Turian



- J. V., Davis T. A., Chute J. P., Hoffman R.: Ex Vivo Expansion of Autologous Bone Marrow CD34<sup>+</sup> Cells With Porcine Microvascular Endothelial Cells Results in a Graft Capable of Rescuing Lethally Irradiated Baboons Blood, 94, 106-113, 1999. - 16. Cowall D. E., MacVittie T. J., Parker G. A., Weinberg S. R.: Effects of low-dose total-body irradiation on canine bone marrow function and canine lymphoma. *Exp.Hematol*, 9, 581-587, 1981. - 17. Dornis R. E., Gasper P. W., Mullins J. I., Hoover E. A.: *In vitro* erythrocytopathic activity of an aplastic anemia-inducing feline retrovirus. *Exp. Hematol*, 17, 138-144, 1989. - 18. Duchez P., Dazey B., Douay L., Vezon G., Ivanovic Z.: An efficient large-scale thawing procedure for cord blood cells destined for selection and ex vivo expansion of CD34<sup>+</sup> cells. *J Hematother Stem Cell Res*, 12, 587-589, 2003. - 19. Egeli A. K., Framstad T.: An evaluation of iron-dextran supplementation in piglets administered by injection on the first, third or fourth day after birth. *Res Vet Sci*, 66, 179-184, 1999. - 20. Emery D. W., Shafer E. M., Karson E. M., Sachs D. H., Leguern C.: Expression of allogeneic Class II cDNA in swine bone marrow cells transduced with a recombinant retrovirus. *Transplantation Proc*, 24, 468-69, 1992. - 21. Emery D. W., Sablinski T., Arn J. S., LeGuern C., Sachs D. H.: Bone marrow culture and transduction of stem cells in miniature swine model. *Blood Cells*, 20, 498-503, 1994. - 22. Emery D. W., Sach D. H., LeGuern C.: Culture and characterization of hematopoietic progenitor cells from miniature swine. *Exp. Hematol*, 24, 927-935, 1996. - 23. Emery D. W., Shafer E. M., Karson E. M., Sachs D. H., Leguern C.: Retrovirus mediated transfer and expression of allogeneic major histocompatibility complex class II DRB cDNA in swine bone marrow cultures. *Blood*, 81, 2460-2465, 1993. - 24. Flake A. W., Zanjani E. D.: In utero Hematopoietic Stem Cell Transplantation: Ontogenic Opportunities and Biologic Barriers. *Blood*, 99, 2179-2191, 1999. - 25. Franchini G.: Modeling immune intervention strategies for HIV-1 infection of humans in the macaque model The introduction of potent antiretroviral therapy (ART) has generated hope and prospects in the management of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, 3, 289-306, 2003. - 26. Frimberger A. E., Moore A. S., Quinsberry P. J.: Bone Marrow Transplantation-Based Experimental Therapies for Canine. In *Gene, Dogs and Cancer: Emergeng Concepts in Molecular Diagnosis and Therapy*, J. F. Modiano (ed). International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA, 2001. - 27. Geissler K., Mayer P., Liehl E., Hinerberger W., Lechner K., Bettelheim P.: Recombinant human IL-3 expands the pool of circulating hematopoietic progenitor cells in primates-sinergism with recombinant human granulocyte/macrophage colony stimulating factor. *Blood*, 75, 2305-2310, 1990. - 28. Gvozdić D., Božić T., Ivanović Z., Stefanović J., Jelkmann W.: Thyroid gland function in the Belgrade laboratory (b/b) rat. *Acta Vet*, 47, 277-282, 1997. - 29. Hammond W. P., Csiba E., Canin A., Hockman H., Souza L., Layton J. E., Dale D. C.: Chronic neutropenia-A new canine model induced by humane granulocyte colony-stimulating factor. *J Clin Invest*, 87, 704-710, 1991. - 30. Hanazono Y., Terao K., Ozawa K.: Gene transfer into nonhuman primates hematopoietic stem cells: implications for gene therapy. *Stem Cells*, 19, 12-23, 2001. - 31. Heike T., Nakahata T.: *Ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells by cytokines, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1592, 313-321, 2002. - 32. Hodgson G. S., Bradley T. R.: Properties of haemopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell? *Nature*, 281-381, 1979. - 33. Ivanović Z., Milenković P.: The seeding efficiency of normal and hereditarily anemic (b/b) rat bone marrow colony forming units-Spleen as determined in a „rat to mouse” assay. *Stem Cells*, 13, 666-670, 1995. - 34. Ivanović Z.: Hematopoietic stem cell proliferation in Belgrade rats: to complete the parable. 39, 307-316, 1997. - 35. Ivanović Z., Belloc F., Faucher J. L., Cipolleschi M. G., Praloran V., Dello Sbarba P.: Hypoxia maintains and interleukin-3 reduces the pre-colony-forming cell potential of dividing CD34(+) murine bone marrow cells. *Exp Hematol*, 30, 67-73, 2002. - 36. Ivanović Z., Milenković P., Vasilijevska M., Dekić M.: Hematopoietic stem cells in the hereditary anemic Belgrade laboratory (b/b) rat. *Exp.Hematol*, 23, 1218-1223, 1995. - 37. Ivanović Z.: Regulacija proliferacije pluripotentnih matičnih ćelija u toku sterilne inflamacije. Magistarska teza, 1992. - 38. Jones

M., Ibels L., Schenkel B., Zagari M.: Impact of epoetin alfa on clinical end points in patients with chronic renal failure: A meta-analysis. *Kidney Int*, 6, 757-67, 2004. - 39. Jovčić G., Ivanović Z., Biljanović-Paunović L., Bugarski D., Stošić-Grujičić S., Milenković P.: *In vivo* effects of interleukin-1, receptor antagonist on hematopoietic bone marrow progenitor cells in normal mice. *Eur. Cytokine. Netw.*, 7, 71-74, 1996. - 40. Kiem H. P., Sellers S., Thomasson B., Morris J. C., Tisdale J. F., Horn P. A., Hematti P., Adler R., Kuramoto K., Calmels B., Bonifacino A., Hu J., von Kalle K., Schmidt M., Sorrentino M., Nienhuis A., Blau A. C., Andrews R. G., Donahue R. E., Dunbar C. E.: Long-Term Clinical and Molecular Follow-up of Large Animals Receiving Retrovirally Transduced Stem and Progenitor Cells: No Progression to Clonal Hematopoiesis or Leukemia. *Molecular Therapy*, 1525-0016(03)00408-8, 2004. - 41. Kovačević Milica: Kultivisanje matičnih ćelija hematopoeze iz krvi i kostne srži svinje. *Magistarska teza*, 1998. - 42. Kovačević Milica, Božić Tatjana, Ivanović Z.: Erythroid progenitor cells from pig bone marrow and peripheral blood. *Veterinary Journal*, 158, 196-203, 1999. - 43. Kovačević Milica, Božić Tatjana, Jovčić G., Petakov M., Bugarski D., Stanković J., Ivanović Z.: Pig bone marrow and peripheral blood granulocyte-macrophage progenitor cells. *Acta Veterinaria* 51, 15-26, 2001. - 44. Kovačević Milica, Božić Tatjana, Pavlović V., Petakov M., Bugarski D., Jovčić G., Ivanović Z.: Pig bone marrow and peripheral blood erythroid progenitor cells in S phase of the cell cycle. *Acta Veterinaria* 50, 207-214, 2000. - 45. Kovačević M., Jovčić G., Božić T., Petakov M., Pavlović V.: Metod kultivacije matičnih ćelija hematopoeze iz kostne srži svinje i deo - matične ćelije određene za eritropoezu. *Veterinarski glasnik*, 1999. - 46. Kreja L., Weinsheimer W., Northdurff W.: *In vitro* studies on the radiosensitivity of multipotent hemopoietic progenitors in canine bone marrow. *Exp. Hematol.*, 19, 755-775, 1991. - 47. Liu J. M., Bignon J., Lawrence F., Meric P., Kovacevic M., Papadimitriou E., Katsoris P., Fromes Y., Wdzieczak-Bakala J.: The tetrapeptide AcSDKP, an inhibitor of primitive hematopoietic cell proliferation, controls normal and pathological angiogenesis 32. *Annual Meeting of Experimental Hematology 3-8 July*. *Experimental Hematology* 31 supplement 215, 2003. - 48. Liu J. M., Lawrence F., Kovačević M., Bignon J., Papadimitriou E., Lallemand J. Y., Katsoris P., Potier P., Fromes Y., Wdzieczak-Bakala J.: The tetrapeptide AcSDKP, an inhibitor of primitive hematopoietic cell proliferation, induces angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, 10, 3014-3020, 2003. - 49. Lord B. I.: Biology of the haemopoietic stem cell. *Stem Cells*, 401-422, 1997. - 50. McCulloch E. A., Till J. E.: The radiation sensitivity at normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Rad. Res*, 13, 115-125, 1960. - 51. McNiece I. K., Bertoncello I., Kriegler A. B., Quesenberry P. J.: Colony forming cells with high proliferative potential (Hpp-CFC). *Int. J. Cell. Cloning*, 8, 146-160, 1990. - 52. Metcalf D.: Some general aspects of hematopoietic cell development. In *Hematopoiesis: A Developmental Approach* (Zon, L.I. ed) Oxford University Press. 136, 2001. - 53. Migliaccio G., Migliaccio A. R., Visser J. W. M.: Synergism between erythropoietin and IL-3 in the induction of hematopoietic stem cell proliferation and erythroid burst colony formation. *Blood*, 72, 944-951, 1988. - 54. Milenković P., Ivanović Z., Lukić M. L., Kataranovski M., Lord B. I.: Stimulator of proliferation of spleen colony forming cells in acute inflammation. *Cell. Prolif.* 26, 503, 1993. - 55. Mishu L., Callahan G., Allebban Z., Maddux J. M., Boone T. C., Souza L. M., Lothrop C. D.: Effects of recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor on white blood cell production in clinically normal and neutropenic dogs. *JAVMA* 200, 1957-1964, 1992. - 56. Paukovits W. R., Laerum O. D.: Isolation and synthesis of a hemoregulatory peptide. *Z Naturforsch.* 37, 1297, 1982. - 57. Pavlović-Kentera V., Đurić O., Sušić S.: Sex hormones status and erythropoietin production in rats. *Endocrin. Exp.* 13, 163-68, 1979. - 58. Pavlović-Kentera V., Hall D. P., Bragassa C., Lange R.: Unilateral renal hypoxia and production of erythropoietin. *J. Lab. Clin. Med.*, 65, 577-587, 1965. - 59. Petakov M., Biljanovic-Paunovic L., Jovcic G., Stojanovic N., Todorovic V., Jelkmann W.: The influence of acute sterile inflammation on erythropoiesis in rats. *Exp Hematol.*, 26, 222-227, 1998. - 60. Petakov M., Kovačević M., Jovčić G., Bugarski D., Milenković P., Stojanović N., Praloran V., Ivanović Z.:

Uticaj IL-6 na primitivne matične ćelije hematopoeze u uslovima hipoksije. 9. kongres hematologa Jugoslavije, Beograd 16-19. novembar, 2002. - 61. Randolph J. E., Scarlett J., Stokol T., MacLeod J. N.: Clinical efficacy and safety of recombinant canine erythropoietin in dogs with anemia of chronic renal failure and dogs with recombinant human erythropoietin-induced red cell aplasia. *J Vet Intern Med.* 18, 81-89, 2004. - 62. Srour E. F., Zanjani E. D., Brandt J. E., Leemhuis T., Briddell R. A., Heerema N. A., Hoffman R.: Sustained Human Hematopoiesis in sheep transplanted in utero during early gestation with fractionated adult bone marrow cell. *Blood*, 79, 1404-1412, 1992. - 63. Storb R., Thomas E. D.: Graft-versus-host diseases in dog and man: The Seattle experience, in Moller G (ed): *Immunological Reviews* No 88. Copenhagen, Denmark, Munksgaard, 215, 1985. - 64. Till J. E., McCulloch E. A.: A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Rad Res*, 14, 213, 1961. - 65. Till J. E., McCulloch E. A., Siminovich D.: A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony forming cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 5, 29-36, 1964. - 66. Tumbleson i Schook: *Advances in Swine Biomedical Research*. ed Tumblesone and Schook, Plenum Press, New York, 1, 1996. - 67. van Beuscechem, Kukler V. W., Heidt P. J.: Long-term expression of human adenosine deaminase in rhesus monkey transplanted with retrovirus-infected bone-marrow cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 7640, 1992. - 68. Wdzieczak-Bakala J., Guignon M., Lenfant M., Friendel E.: Further purification of a CFU-S inhibitor: *in vivo* effects after cytosine arabinoside treatment. *Biomed Pharmacother*, 37, 467, 1983. - 69. Weiss G., Wachter H., Fuchs D.: Linkage of cell-mediated immunity to iron metabolism. *Immunol. Today*, 16, 495-499, 1995. - 70. Whitwam T., Haskins M. E., Henthorn P. S., Kraszevski J. N., Kleiman S. E., Seidel N. E., Bodine D. M., Puck J. M.: Retroviral Marking of Canine Bone Marrow: Long-Term High Level Expression of Human Interleukin-2 Receptor Common Gamma Chain in canine Lymphocytes. *Blood*, 92, 1565-1575, 1998. - 71. Zanjani E. D., Singer-Weinberg R., Nomdedeu B., Kaplan M. E., Wasserman L. R.: *In vitro* assessment of similarities between erythroid precursors of fetal sheep and patients with polycythemia vera. In *In Vitro Aspects of Erythropoiesis* eds. Murphy M. J., 118-122, 1978. - 72. Zanjani E. D., Almeida-Porada G., Flake A. W.: Retention and multilineage expression of human hematopoietic stem cells in human-sheep chimeras. *Stem Cells*, 13, 101-111, 1995. - 73. Zanjani E. D., Flake A. W., Almeida-Porada G., Tran N., Papayannopoulou T.: Homing of human cells in the fetal sheep model: modulation by antibodies activating or inhibiting very late activation antigen-4-dependent function. *Blood*, 94, 2515-22, 1999.

## ENGLISH

### SIGNIFICANCE OF DIFFERENT ANIMAL SPECIES IN EXPERIMENTAL MODELS FOR *IN VIVO* INVESTIGATIONS OF HEMATOPOIESIS

**Milica Kovačević-Filipović, Tatjana Božić, Jelka Stevanović**

Numerous discoveries in medicine are results of experiments on different animal species. The most frequently used animals in hematopoiesis investigations are laboratory mice and rats, but so-called big animals, such as pigs, sheep, cats, dogs, and monkeys, evolution-wise closer to humans, have a place in experimental hematology as well. The specific problematics of a certain animal specie can lead to fundamental knowledge on certain aspects of the process of hematopoiesis and the biology of stem cells in hematopoiesis. Furthermore, comparative investigations of certain phenomena in different species help in the recognition of the general rules in the living world. In the area of preclinical investi-

gations, animal models are an inevitable step in studies of transplantation biology of stem cells in hematopoiesis, as well as in studies of biologically active molecules which have an effect on the hematopoietic system. Knowledge acquired on animal models is applied in both human and veterinary medicine.

Key words: animals, experimental models, hematopoiesis

**РУССКИЙ**

### **ЗНАЧЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕМАТОПОЕЗА *IN VIVO***

**Милица Ковачевич-Филипович, Татьяна Божич, Елка Стеванович**

До многочисленных открытий в медицине пришлось, благодаря экспериментами на различных видах животных. Чаще всего использованные животные в испытаниях процесса гематопоеза лабораторные мыши и крысы, между тем и „большие„ животные, как свиней, овец, кошек, собак и обезьян эволюционно более близких людям, имеют своё место в экспериментальной гематологии. Специфическая проблематика определённого вида животных может привести до фундаментальных знаний о отдельных аспектах процесса гематопоеза и биологии материнских клеток гематопоеза. Также, сравнительное испытание некоторых феноменов у различных видов помогает в замечании общих закономерностей в живом мире. В области деятельности предклинических испытаний животные модели необходимый шаг в изучении трансплантационной биологии материнских клеток гематопоеза, словно и изучению биологически активных молекул с эффектом ан гематопоетическую систему. Узнания, полученные на животных моделях имеют своё применение и в гуманной и в ветеринарной медицине.

Ключевые слова: животные, экспериментальные модели, гематопоез