

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ana M. Borojević

**KARAKTERIZACIJA HUMANIH
MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA
POREKLOM IZ KOSNE SRŽI I UTICAJ
VITAMINA D3 NA NJIHOVA FUNKCIJSKA
SVOJSTVA**

doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Ana M. Borojević

**HUMAN BONE MARROW MESENCHYMAL
STEM CELLS CHARACTERIZATION AND
INFLUENCE OF VITAMIN D3 ON THEIR
FUNCTIONAL PROPERTIES**

Doctoral Dissertation

Beograd, 2022

ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

MENTOR:

dr Aleksandra Jauković, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu-Institut za medicinska istraživanja
-Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Dragana Vujić, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Medicinski fakultet

dr Aleksandra Korać, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu-Biološki fakultet

dr Diana Bugarski, naučni savetnik
Univerzitet u Beogradu-Institut za medicinska istraživanja
-Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju

Datum odbrane:

Ova doktorska disertacija urađena je zahvaljujući uzorcima prikupljenim na Odeljenju za transplantaciju kostne srži sa laboratorijom za kriobiologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čušić“ čiji je načelnik Prof. dr Dragana Vujić, uz saglasnost etičkog odbora Instituta (odluka zavedena pod del. br. 8/20). Eksperimentalni deo doktorske disertacije realizovan je u saradnji Laboratorije za eksperimentalnu hematologiju i matične ćelije Instituta za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu – Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju i Centra za elektronsku mikroskopiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

ZAHVALNICA

Najiskreniju zahvalnost za uspešnu realizaciju ove doktorske disertacije dugujem svojoj mentorki, dr Aleksandri Jauković, za predano zalaganje tokom celog procesa izrade ove teze. Od srca joj se zahvaljujem na prenesenom znanju, bezrezervnoj podršci, posvećenosti i iskrenim savetima, koji mi pružaju veliku inspiraciju za nastavak istraživačkog razvoja.

Posebno veliku zahvalnost dugujem prof. dr Dragani Vujić na neizmernoj podršci tokom celokupnog rada. Hvala na ukazanom poverenju i velikoj pomoći. Posebno veliko HVALA na prenesenom znanju iz oblasti transplantacije matičnih ćelja hematopoeze i omogućavanju da se usavršavam u svom poslu.

Iskreno se zahvaljujem dr Aleksandri Korać na znanju prenesenom tokom studija, sjajnim predavanjima koja su podstakla moju želju za bavljenje naučno-istraživačkim radom i velikoj podršci u ključnim trenucima izrade ove disertacije.

Zahvaljujem se dr Diani Bugraski što mi je omogućila da eksperimentalni deo disertacije uradim u okviru Instituta za medicinska istraživanja - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju i time obogatim svoja znanja.

Izuzetno veliku zahvalnost dugujem Tamari Kukulj na svim savetima i prenesenim iskustvima tokom eksperimentalog rada, dobronamernim i korisnim sugestijama i konstruktivnim predlozima za rešavanje mnogih problema tokom rada.

Veliku zahvalnost dugujem dr Drenki Trivanović za postavljanje adekvatnih osnova za izradu ove teze. Hvala dr Slavku Mojsiloviću na velikoj pomoći u tumačenju rezultata protočne citometrije. Hristini Obradović zahvaljujem na pomoći pruženoj prilikom izvođenja qPCR analiza.

Svim koleginicama i kolegama Odeljenja za transplantaciju kostne srži sa laboratorijom za kriobiologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „dr Vukan Čupić“ zahvaljujem na podršci i razumevanju tokom svih godina zajedničkog rada. Neizmerno se zahvaljujem dr Emiliji Lazić Ilić i Jeleni Tomić Ribić na pruženom znanju, velikom strpljenju i bezrezervnoj podršci, ne samo tokom poslovne saradnje već i u privatnom životu.

Najveću zahvalnost dugujem svojim roditeljima, baki, suprugu i društvu koji su uvek verovali u mene i pružali mi neizmernu ljubav i podršku.

Karakterizacija humanih mezenhimalskih matičnih ćelija poreklom iz kosne srži i uticaj vitamina D3 na njihova funkcijska svojstva

SAŽETAK

Jedan od glavnih izazova sa kojima se savremeno društvo susreće odnosi se na potrebu za poboljšanjem postojećih i uspostavljanjem novih terapijskih pristupa sa ciljem regeneracije oštećenih tkiva i organa nastalih usled traumatskih povreda ili starenja organizma. Pre više od pola veka ustanovljeno je da se u kosnoj srži, pored matičnih ćelija hematopoeze, nalaze i mezenhimalske matične ćelije (MMC), a u periodu koji je sledio MMC su uspešno izolovane iz skoro svih perinatalnih i postnatalnih tkiva. Intenzivnim istraživanjima MMC ustanovljeno je da svojstva koja čine MMC optimalnim kandidatima za primenu u regenerativnoj medicini uključuju njihovu sposobnost diferencijacije u ciljne ćelije različitih tkiva, sposobnost migriranja na oštećena mesta u tkivu, parakrinu sekreciju brojnih signalnih molekula, poput citokina i faktora rasta, imunomodulatorni kapacitet uz odsustvo imunogenosti, kao i sposobnost samoobnavljanja. Dugogodišnji rad na optimizaciji metoda izolacije, kultivacije i diferencijacije MMC omogućio je da istraživanja ovih ćelija napreduju ka njihovoj potencijalnoj primeni za lečenje različitih bolesti i rekonstrukciju oštećenih tkiva. Međutim, na polju kliničke primene MMC još uvek postoje prepreke. Heterogenost MMC predstavlja glavni kamen spoticanja u boljem razumevanju i preciznijem definisanju bioloških osobina ovih ćelija. Uprkos ispunjavanju svih minimalnih kriterijuma za karakterizaciju koje je definisao Komitet za mezenhimalske i tkivne matične ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju, u literaturi se mogu naći raznovrsni podaci o potencijalu diferencijacije i proliferacije MMC, kao i njihovim imunomodulatornim sposobnostima. Heterogenost je uočena ne samo između MMC različitih organizama i tkiva iz kog su izolovane (kosna srž, masno tkivo ili zubna pulpa), već i između MMC poreklom iz istog tkiva različitih davalaca, pa čak i između klonova i pojedinačnih ćelija u okviru populacije tkivno-specifičnih MMC jednog davaoca. Dodatno otežano poređenje rezultata različitih istraživačkih grupa uslovljeno je i različitim metodološkim pristupima, odnosno odsustvom standardizacije metoda za izolovanje i kultivisanje MMC. Takođe, još uvek nisu u potpunosti poznati i definisani jedinstveni markeri na osnovu čije ekspresije bi se mogla izvršiti selekcija MMC pogodnih za terapijsku primenu. Zbog toga je veoma značajno detaljno uvrđiti razlike koje postoje kod MMC zdravih davalaca i najbolji metodološki pristup za što efikasniji način procene istih. Ti podaci bi mogli da doprinesu razvoju personalizovane medicine, omogućavajući donošenje odluke o izboru adekvatnog uzorka za potencijalnu terapijsku primenu. Zbog relativno niske zastupljenosti MMC u tkivima, za potrebe istraživanja neophodna je *in vitro* kultivacija izolovanih ćelija koja takođe može uticati na njihova funkcijska svojstva. Jedan od problema koji se javlja pri gajenju ćelija u kulturi je ćelijsko starenje, zbog čega su aktuelna brojna ispitivanja koja za cilj imaju „produžavanje života“ MMC *in vitro*. Optimizacija uslova kultivacije i modifikovanje ključnih signalnih puteva (genetičkim inženjerstvom ili primenom hemijskih aktivatora/inhibitora) su glavne strategije koje istraživači koriste kako bi usporili proces ćelijskog starenja i podstakli sposobnosti proliferacije i diferencijacije MMC. Ispitivanja u kojima su korišćeni aktivni metaboliti vitamina D3 ukazuju na njihovu potencijalnu ulogu u procesu osteogene diferencijacije KS-MMC. Vitamin D3 (holekalCIFerol) neophodan je za pravilnu regulaciju metabolizma kalcijuma i fosfora čime doprinosi održavanju homeostaze i čvrstine kostiju, a poznato je i da ovaj vitamin stimuliše ekspresiju specifičnih hormona i

faktora rasta, diferencijaciju i proliferaciju osteoblasta, kao i da utiče na regulaciju imunskog sistema. Studije u kojima je holekalciferol korišćen u sklopu hibridnih bionosača ukazuju da ovaj vitamin može poboljšati regenerativni potencijal KS-MMĆ. Međutim, da li i u kojoj meri vitamin D3 u formi holekalciferola može uticati na karakteristike KS-MMĆ, kao i koji se mehanizmi mogu nalaziti u osnovi njegovog dejstva, još uvek nije dovoljno ispitano.

Ispitivanja sprovedena u okviru ove disertacije imala su za cilj da utvrde potencijalne razlike u osobinama i funkcijama KS-MMĆ zdravih davalaca uzrasta 2-12 godina, kao i da ispituju uticaj vitamina D3 u formi holekalciferola (VD3) na funkcijska svojstva KS-MMĆ povezana sa njihovim regenerativnim potencijalom. Sličnosti i razlike KS-MMĆ između davaoca utvrđivane su uporednom analizom morfologije, fenotipa, potencijala diferencijacije i proliferacije, klonogenog potencijala, nivoa ćelijskog starenja, kao i ekspresije markera proliferacije (Ki67), pluripotentnosti (NANOG, SOX2, OCT-4) i regulatora ćelijskog starenja (p53) u ovim ćelijama. U drugom delu istraživanja određivan je uticaj VD3 na regenerativni potencijal KS-MMĆ na osnovu analiza promena proliferacije, klonogenog kapaciteta, potencijala osteogene i adipogene diferencijacije, procesa ćelijskog starenja, uz paralelno određivanje ekspresije markera proliferacije (Ki67), pluripotentnosti (NANOG, SOX2, OCT-4), osteogene (*ALP*, *RUNX2*, *OCN*) i adipogene (*Adiponektin*, *PPAR γ*) diferencijacije i ćelijskog starenja (p53). Sa ciljem ispitivanja molekularnih mehanizama koji se mogu nalaziti u osnovi dejstva VD3 na KS-MMĆ analizirana je aktivacija Sirtuin 1 (SIRT1) signalizacije primenom selektivnog farmakološkog inhibitora, EX-527.

Dobijeni rezultati su pokazali da MMĆ izolovane iz KS svih davalaca ispunjavaju minimalne kriterijume za definisanje MMĆ prema Komitetu za mezenhimske i tkivne matične ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju. Značajne razlike između KS-MMĆ različitih davalaca nisu primećene na nivou morfologije, imunofenotipa, sposobnosti za diferencijaciju u tri ćelijske loze (osteogenu, adipogenu i hondrogenu), kao i ekspresiji i lokalizaciji F-aktina. Pored toga, pokazan je sličan stepen vijabilnosti/metaboličke aktivnosti, proliferativnog kapaciteta, klonogenog potencijala i ćelijskog starenja kod KS-MMĆ različitih davalaca. S druge strane, primećene su blage razlike u ekspresiji Ki67 i p53 proteina, kao i ispitivanih markera pluripotentnosti (NANOG, SOX2 i OCT-4) kod KS-MMĆ različitih davalaca u pogledu intenziteta i subćelijske lokalizacije ovih proteina.

Rezultati ispitivanja uticaja VD3 su pokazali da ovaj vitamin deluje stimulatorno na vijabilnost i proliferativni kapacitet KS-MMĆ zdravih davalaca uzrasta 2-12 godina utičući na metaboličku aktivnost, ekspresiju markera proliferacije Ki67 i ćelijski ciklus ovih ćelija, pri čemu nije imao uticaja na njihov klonogeni kapacitet. Iako su dobijeni rezultati pokazali da VD3 aktivira SIRT1 signalni put u KS-MMĆ, ustanovljeno je da je stimulatorni efekat VD3 na proliferativni kapacitet KS-MMĆ nezavisan od SIRT1 signalizacije. Sposobnost VD3 da moduliše potencijal samoobnove KS-MMĆ praćen je analizom efekata ovog vitamina na ekspresiju markera pluripotentnosti (NANOG, SOX2 i OCT-4) na proteinskom i genskom nivou, pri čemu je pokazano da tretman sa VD3 povećava konstitutivnu ekspresiju sva tri ispitivana markera. Pored toga, ustanovljeno je da VD3 stimuliše ekspresiju OCT-4 transkripcionog faktora nezavisno od SIRT1 signalizacije, dok se njegov uticaj na ekspresiju NANOG i SOX2 ostvaruje posredstvom aktivacije ovog signalnog puta. Takođe je utvrđeno da tretman sa VD3 redukuje proces ćelijskog starenja KS-MMĆ smanjujući broj β -galaktozidaza pozitivnih ćelija nezavisno od SIRT1 signalizacije, iako nije primećen značajan uticaj na ekspresiju regulatora ćelijskog starenja, p53 proteina. U sklopu ispitivanja uticaja VD3 na diferencijacioni potencijal, dobijeni rezultati su pokazali da tretman sa VD3 tokom i pre indukcije diferencijacije stimuliše osteogenu diferencijaciju KS-MMĆ, kao i ekspresiju gena za osteogene markere (*ALP*, *RUNX2*, *OCN*) putem aktivacije SIRT1

signalnog puta. Pored toga, utvrđeno je da se inhibitorni uticaj VD3 na adipogenu diferencijaciju KS-MMĆ, pokazan pri tretmanu sa VD3 tokom i pre indukcije diferencijacije, odigrava nezavisno od SIRT1 signalizacije. Pri tome, promene u genskoj ekspresiji adipogenih markera (*Adiponektin*, *PPAR γ*) nisu uočene pod ispitivanim eksperimentalnim uslovima.

Imajući u vidu navedene rezultate može se zaključiti da na osnovu primenjenih uporednih analiza nisu uočene značajne razlike svojstva i funkcija KS-MMĆ različitih davalaca. Osetljivije metode koje bi se zasnivale na analizi pojedinačnih ćelija mogle bi doprineti boljem i preciznijem definisanju potencijalnih razlika između KS-MMĆ. Pored toga, pokazani stimulatorni efekti VD3 na funkcije KS-MMĆ povezane sa regenerativnim potencijalom su ukazali na sposobnost KS-MMĆ mlađih davalaca da reaguju na vitamin D3 u formi holekalciferola. Značaj navedenih rezultata ogleda se u mogućnosti primene VD3 kao faktora prekondicioniranja/pretretmana KS-MMĆ u potencijalnim transplantacijskim protokolima.

KLJUČNE REČI: Mezenhimske matične ćelije, kosna srž, heterogenost, regenerativni potencijal, vitamin D3, SIRT1.

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Biologija ćelija i tkiva

UDK broj:

Human bone marrow mesenchymal stem cells characterization and influence of vitamin D3 on their functional properties

ABSTRACT

One of the main challenges facing modern society considers the need to improve existing and establish new therapeutic approaches to regenerate damaged tissues and organs caused by traumatic injuries or aging. More than half a century ago, it was found that the bone marrow represents residing site not only to hematopoietic stem cells, but to mesenchymal stem cells (MSCs) as well. During the period that followed, MSCs were successfully isolated from almost all perinatal and postnatal tissues. Intensive research of MSCs has shown that these cells have properties that make them optimal candidates for use in regenerative medicine. Those characteristics include their ability to differentiate into target cells of different tissues, ability to migrate to damaged tissue sites, paracrine secretion of numerous signaling molecules such as cytokines and growth factors, immunomodulatory capacity and lack of immunogenicity, as well as the ability to self-renew. Extensive work on optimizing the methodologies for MSCs isolation, cultivation and differentiation have enabled the research process to progress towards their potential application for the treatment of various diseases and the reconstruction of damaged tissues. However, there are still obstacles in the field of clinical application of MSCs. The heterogeneity of MSCs is a major limitation for better understanding and more precise definition of their biological properties. Despite meeting all the minimum criteria for characterization defined by the Committee for Mesenchymal and Tissue Stem Cells of the International Society for Cell Therapy, variable data can be found in the literature regarding the MSCs differentiation potential and proliferation, as well as their immunomodulatory properties. Heterogeneity was observed not only between MSCs of different organisms and diverse tissues from which they were isolated (for example bone marrow, adipose tissue or dental pulp), but also among MSCs originating from the same tissue of different donors, and even amongst clones and individual cells within a population of tissue-specific MSCs of one donor. It is additionally difficult to compare the results of different research groups due to different methodological approaches, and lacking of standardized procedures for MSCs isolation and cultivation. Also, unique markers for the selection of MSCs suitable for therapeutic use are not yet fully known and defined. Therefore, it is very important to determine in detail the differences of healthy donors MSCs and the best methodological approach for the most efficient way to evaluate them. These data could contribute to the development of personalized medicine, enabling the decision to select an adequate sample for potential therapeutic use. Due to the relatively low presence of MSCs in tissues, *in vitro* cultivation of isolated cells is necessary for research purposes. However, *ex vivo* expansion can also affect functional properties of these cells. One of the problems related to cells cultivation is cell aging, which propelled the numerous studies aimed to "prolonging the life" of MSCs *in vitro*. Optimizing cultivation conditions and modifying key signaling pathways (by genetic engineering or by the use of chemical activators/inhibitors) are the main strategies that researchers use to slow the cellular aging process and enhance the ability of MSCs to proliferate and differentiate. Studies using active metabolites of vitamin D3 indicated their potential role in the process of bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) osteogenic differentiation. Vitamin D3 (cholecalciferol) is necessary for the proper regulation of calcium and phosphorus metabolism, which contributes to

maintenance of bone homeostasis and strength. Also, this vitamin is known to stimulate the expression of specific hormones and growth factors, as well as to affect osteoblast differentiation and proliferation, along with immune response regulation. Studies in which cholecalciferol has been used as part of hybrid biomaterial matrices or 3D scaffolds indicated that this vitamin may improve the regenerative potential of BM-MSCs. However, whether and to what extent vitamin D3 in the form of cholecalciferol can affect BM-MSCs functional properties, as well as what underlying mechanisms may be involved in its action, has not been sufficiently investigated.

The research conducted within this dissertation aimed to determine potential differences in the properties and functions of BM-MSCs from healthy donors aged 2-12 years, as well as to examine the effects of vitamin D3 in the form of cholecalciferol (VD3) on the functional properties of BM-MSCs associated with their regenerative potential. Similarities and differences of BM-MSCs among donors were determined by comparative analysis of morphology, phenotype, differentiation and proliferation potential, clonogenic potential, cell aging, as well as the expression of markers associated with proliferation (Ki67), pluripotency (NANOG, SOX2, OCT-4) and cell aging regulation (p53) in these cells. Within the second part of the research, the influence of VD3 on the regenerative potential of BM-MSCs was determined through the analyzes of proliferation, clonogenic capacity, osteogenic and adipogenic differentiation potential, and cell aging process. In parallel, expression of proliferation (Ki67), pluripotency (NANOG, SOX2, OCT-4), osteogenic (*ALP*, *RUNX2*, *OCN*) and adipogenic (*Adiponectin*, *PPAR γ*) differentiation markers, as well as of cell aging regulator (p53), was evaluated in VD3-treated BM-MSCs. In order to investigate the molecular mechanisms underlying the effects of VD3 on BM-MSCs, the activation of Sirtuin 1 (SIRT1) signaling pathway was analyzed using a selective pharmacological inhibitor, EX-527.

The obtained results showed that MSCs isolated from BM of all donors meet the minimum criteria for defining MSCs according to the Committee for Mesenchymal and Tissue Stem Cells of the International Society for Cell Therapy. Significant differences between BM-MSCs of different donors were not observed at the level of morphology, immunophenotype, ability to differentiate into three cell lineages (osteogenic, adipogenic and chondrogenic) and expression and localization of F-actin. In addition, a similar degree of viability / metabolic activity, proliferative capacity, clonogenic potential, as well as cell aging, was shown for BM-MSCs of different donors. On the other hand, slight differences in the expression pattern of Ki67 and p53 proteins, as well as of pluripotency markers (NANOG, SOX2 and OCT-4), were observed in BM-MSCs of different donors in terms of intensity and subcellular localization.

The results of VD3 effects evaluation showed that this vitamin stimulates the viability and proliferative capacity of BM-MSCs of healthy donors aged 2-12 years, affecting metabolic activity, expression of Ki67 proliferation markers and cell cycle of these cells, without influencing their clonogenic capacity. Although the obtained results evidenced that VD3 activates the SIRT1 signaling pathway in BM-MSCs, it was found that the stimulatory effect of VD3 on the BM-MSCs proliferative capacity is independent of SIRT1 signaling. The investigations of VD3 ability to modulate BM-MSCs self-renewal potential conducted through analyzes of its effect on the pluripotency markers (NANOG, SOX2 and OCT-4) expression at protein and gene levels, showed stimulatory effect of VD3 treatment on constitutive expression of all examined markers. In addition, VD3 was found to stimulate OCT-4 transcription factor expression independently of SIRT1 signaling, while its effect on NANOG and SOX2 expression was mediated by activation of this signaling pathway. It was

also observed that treatment with VD3 reduces the process of cellular aging of BM-MSCs decreasing the number of β -galactosidase positive cells independently of SIRT1 signaling. However, no significant effect of VD3 treatment on the expression of the cellular aging regulator, p53 protein, was observed. As for the evaluation of VD3 effects on BM-MSCs differentiation potential, the obtained results showed that treatment with VD3, during and before induction of differentiation, stimulates BM-MSCs osteogenic differentiation, as well as gene expression of osteogenic markers (*ALP*, *RUNX2*, *OCN*) by activating SIRT1 signaling pathway. On the other hand, it was found that the inhibitory effect of VD3 on BM-MSCs adipogenic differentiation, shown upon treatment with VD3 during and before induction of differentiation, occurs independently of SIRT1 signaling. Changes in the gene expression of adipogenic markers (*Adiponectin*, *PPAR γ*) were not observed under the tested experimental conditions.

Considering obtained results, it can be concluded that through the applied comparative analyzes, no significant differences in the properties and functions of BM-MSCs of different donors were observed. More sensitive methods based on the analysis of individual cells could contribute to a better and more precise definition of potential differences between BM-MSCs. In addition, the shown stimulatory effects of VD3 on BM-MSCs functions associated with regenerative potential indicated the ability of BM-MSCs of younger donors to respond to vitamin D3 in the form of cholecalciferol. The significance of these results is reflected in the possibility of using VD3 as a preconditioning / pretreatment factor for BM-MSCs in potential transplantation protocols.

KEY WORDS: Mesenchymal stem cells, bone marrow, heterogeneity, regenerative potential, vitamin D3, SIRT1.

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SCIENTIFIC SUBFIELD: Cell and Tissue Biology

UDC number:

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1 MATIČNE ĆELIJE - ISTORIЈAT	1
1.2. PODELA MATIČNIH ĆELIJA	2
1.3. ADULTNE (SOMATSKE) MATIČNE ĆELIJE	4
1.4. MATIČNE ĆELIJE HEMATOPOEZE (MĆH).....	4
1.5. MEZENHIMSKE MATIČNE ĆELIJE (MMĆ)	6
1.5.1. Karakterizacija MMĆ	10
1.5.2. Regenerativni potencijal MMĆ	11
1.5.3. Heterogenost mezenhimskih matičnih ćelija kosne srži (KS-MMĆ)	13
1.5.3.1. Uticaj niše kosne srži na heterogenost KS-MMĆ.....	13
1.5.3.2. Uticaj uzrasta davaoca na svojstva KS-MMĆ	15
1.5.3.3. Uticaj dugotrajne kultivacije na heterogenost KS-MMĆ.....	17
1.5.4. KS-MMĆ u prekliničkim i kliničkim studijama	21
1.6. VITAMIN D3.....	26
1.7. SIRTUIN 1 (SIRT1)	29
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	32
3. MATERIJAL I METODI	34
3.1. MEDIJUMI I PUFERI	34
3.2. REAGENSI I ANTITELA	34
3.3. HUMANI MATERIJAL	36
3.3.1. Prikupljanje uzoraka kosne srži.....	36
3.3.2. Izolacija monojedarnih ćelija (MNC) iz svežih uzoraka kosne srži	37
3.3.3. Kultivacija i pasažiranje KS-MMĆ	37
3.3.4. Krioprezervacija KS-MMĆ	38
3.4. EKSPERIMENTALNI DIZAJN	38
3.4.1. Uporedna analiza svojstava i funkcija KS-MMĆ različitih davalaca	38
3.4.2. Ispitivanje potencijala vitamina D3 da moduliše funkcije i signalizaciju KS-MMĆ povezanu sa regenerativnim potencijalom	39
3.4.3. Ispitivanje učešća SIRT1 signalizacije u delovanju vitamina D3 na funkcije KS-MMĆ povezane sa regenerativnim potencijalom	40
3.5. PRIMENJENI METODI	41
3.5.1. Priprema uzoraka za elektronsku i svetlosnu mikroskopiju	41
3.5.2. Određivanje diferencijalnog sastava ćelija kosne srži.....	42

3.5.3. Određivanje broja i vijabilnosti ćelija.....	42
3.5.3.1. Određivanje broja ćelija bojenjem u Türk rastvoru.....	42
3.5.3.2. Određivanje vijabilnosti ćelija primenom boje Tripan plavo.....	43
3.5.4. Proliferacija KS-MMĆ.....	43
3.5.4.1. Procena vremena potrebnog za udvajanje populacije KS-MMĆ.....	43
3.5.4.2. Određivanje vijabilnosti/metaboličke aktivnosti KS-MMĆ primenom MTT testa.....	44
3.5.4.3. Određivanje klonogenog kapaciteta KS-MMĆ.....	44
3.5.4.4. Analiza ćelijskog ciklusa KS-MMĆ.....	45
3.5.4.5. Analiza procesa starenja KS-MMĆ.....	45
3.5.5. Multipotentna diferencijacija.....	46
3.5.5.1. Osteogena diferencijacija.....	46
3.5.5.2. Hondrogena diferencijacija.....	47
3.5.5.3. Adipogena diferencijacija.....	47
3.5.6. Analiza ćelijskih proteina imunofluorescentnim obeležavanjem ćelija.....	47
3.5.6.1. Analiza površinskih antigena protočnom citometrijom.....	48
3.5.6.2. Analiza ekspresije markera proliferacije Ki67 protočnom citometrijom.....	48
3.5.6.3. Ispitivanje ekspresije i lokalizacije proteina epifluorescentnim mikroskopom.....	49
3.5.7. Genska ekspresija.....	49
3.5.7.1. Izolacija ukupne RNK.....	49
3.5.7.2. Reverzna transkripcija.....	50
3.5.7.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (Real time-PCR, qPCR).....	50
3.5.8. Statistička analiza rezultata.....	51
4. REZULTATI.....	53
4.1. IZOLOVANJE I KULTIVACIJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA IZ KOSNE SRŽI.....	53
4.2. KARAKTERIZACIJA I UPOREDNA ANALIZA MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA IZOLOVANIH IZ KS RAZLIČITIH DAVALACA.....	54
4.2.1. Morfološke karakteristike KS-MMĆ zdravih davalaca.....	54
4.2.2. Imunofenotip KS-MMĆ zdravih davalaca.....	55
4.2.3. Diferencijacioni potencijal KS-MMĆ zdravih davalaca.....	56
4.2.4. Proliferativni kapacitet KS-MMĆ zdravih davalaca.....	57
4.2.5. Klonogeni potencijal KS-MMĆ zdravih davalaca.....	60
4.2.6. Ekspesija markera pluripotentnosti u KS-MMĆ zdravih davalaca.....	61
4.3. UTICAJ VITAMINA D3 NA FUNKCIJE I SIGNALIZACIJU KS-MMĆ POVEZANU SA REGENERATIVNIM POTENCIJALOM.....	62

4.3.1. Uticaj VD3 na vijabilnost/metaboličku aktivnost KS-MMĆ.....	62
4.3.2. Uticaj VD3 na klonogeni kapacitet KS-MMĆ.....	63
4.3.3. Uticaj VD3 na osteogeni i adipogeni potencijal diferencijacije KS-MMĆ	64
4.3.4. Uticaj VD3 na aktivaciju SIRT1-FoxO3 signalizacije u KS-MMĆ	66
4.4. ULOGA SIRT1 SIGNALIZACIJE U DELOVANJU VD3 NA FUNKCIJE KS-MMĆ POVEZANE SA REGENERATIVNIM POTENCIJALOM.....	67
4.4.1. Uloga SIRT1 signalizacije u delovanju VD3 na proliferativni kapacitet KS-MMĆ	67
4.4.2. Uloga SIRT1 signalizacije u stimulatornom delovanju VD3 na ekspresiju faktora pluripotentnosti u KS-MMĆ	71
4.4.3. Uloga SIRT1 signalizacije u stimulatornom delovanju VD3 na osteogenu diferencijaciju KS-MMĆ.....	74
4.4.4. Uloga SIRT1 signalizacije u inhibitornom delovanju VD3 na adipogenu diferencijaciju KS-MMĆ.....	76
4.4.5. Uloga SIRT1 signalizacije u delovanju VD3 na ćelijsko starenje KS-MMĆ.....	78
4.4.6. Uticaj VD3 i SIRT1 signalizacije na ekspresiju p53 proteina u KS-MMĆ.....	78
5. DISKUSIJA	80
6. ZAKLJUČCI.....	93
7. LITERATURA.....	95

1. UVOD

1.1 MATIČNE ĆELIJE - ISTORIJAT

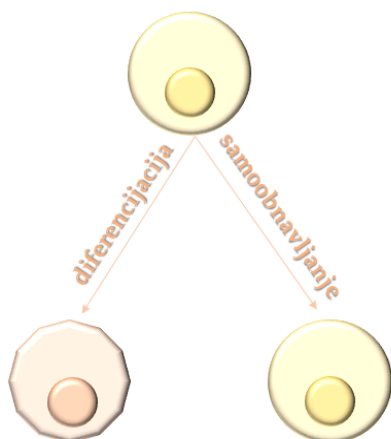
Pojam „matična ćelija“ (od nemačkog *Stammzelle*) pojavljuje se u naučim krugovima sredinom XIX veka zaslugom nemačkog biologa Ernst Haeckel-a. On je ovaj pojam najpre upotrebio da bi označio jednoćelijskog pretka svih višećelijskih organizama (Haeckel, 1868), da bi kasnije ovim pojmom opisao i oplođenu jajnu ćeliju čijom deobom nastaju sve ćelije u višećelijskom organizmu (Haeckel, 1877). Tokom godina koje su sledile upotreba termina „matična ćelija“, kako bi se označila posebna ćelija u embrionu sposobna da produkuje specijalizovanije ćelije, postaje sve učestalija u naučnoj literaturi. Za podelu ćelija u organizmu na specijalizovane (polne) ćelije od kojih mogu nastati druge ćelije i na ostale, „telesne“ ćelije organizma (somatske ćelije), zaslužan je August Weismann (Weismann, 1885). Veliki doprinos daljim istraživanjima na ovom polju pružili su Theodor Boveri i Valentin Hacker, koji su, inspirisani Weismann-ovom teorijom pokazali da se hromatin koji se nalazi u polnim ćelijama prenosi na naredne generacije, a takođe i da se kod oplođenih jajnih ćelija i polnih ćelija mogu primetiti asimetrične deobe (Boveri, 1892; Haecker, 1892). U ovim ranim studijama, termin „matična ćelija“ uglavnom je korišćen kako bi se označila nediferencirana, „majka“ ćelija, čijom deobom nastaju polne ćelije. Otprilike u isto vreme, u istraživanjima koja su izučavala razvoj i regeneraciju hematopoetskog sistema razdvojila su se dva pravca mišljenja, odnosno paralelno su postavljene unitaristička i dualistička hipoteza. Istraživači su imali različito stanovište o pitanju postojanja zajedničkog prethodnika svih ćelija krvi. Prema dualistima, prethodnici različitih krvnih loza se razlikuju, dok po unitarističkom modelu hematopoeze postoji prekursora ćelija koja predstavlja zajedničkog prethodnika eritrocita, limfocita i granulocita. Unitaristi su stoga tražili pojam kojim bi mogli opisati zajedničkog prethodnika hematopoetskog sistema, a predlagani su brojni termini (Saxer, 1896; Pappenheim, 1907, Maximow, 1908). Izraz „matična ćelija“, kako bi opisao ćeliju prekursora crvenih i belih krvnih zrnaca prvi je upotrebio Pappenheim 1896. godine (Pappenheim, 1896), Ovaj termin se krajem prve decenije XX veka počeo sve češće koristiti za označavanje zajedničkih prethodnika hematopoetskih ćelija (Dantschakoff, 1908; Maximow, 1909).

Zbog ograničenih metoda koje su bile dostupne u to vreme, debata o postojanju zajedničke hematopoetske matične ćelije nastavljena je sve do druge polovine XX veka kada su istraživanja dokazala postojanje ovih ćelija (Till & McCulloch, 1961; Becker et al., 1963; Till et al., 1964). Naime, Ernest McCulloch i James Till su 1961. godine, kroz seriju eksperimenata u kojima su letalno ozračenim miševima intravenski ubrizgavali ćelije zdrave kosne srži (KS) miša, uočili da se na slezini ovako tretiranih životinja formiraju kolonije ćelija vidljive golim okom nalik „čvorićima“. Takođe su primetili i postojanje linearne zavisnosti broja nastalih „čvorića“ od broja ubrizganih ćelija KS. Ćelije koje imaju sposobnost da formiraju ove „čvoriće“ nazvali su jedinicama koje formiraju kolonije (eng. *Spleen Colony-Forming Unit*, CFU-S). U kasnijim eksperimentima je ustanovljeno da svaka od kolonija nastaje od pojedinačne ubrizgane ćelije KS. Pošto se većina nastalih kolonija sastojala od zrelih ćelija različitih loza, pretpostavljeno je da je izvorna ćelija imala kapacitet diferencijacije u više ćelijskih linija. Takođe, u slučaju transplantacije ovako nastalih kolonija primećeno je da se formiraju nove CFU-S, na osnovu čega je zaključeno da se u kolonijama nalaze matične ćelije od kojih nastaju sekundarne kolonije (Siminovitch et al., 1963).

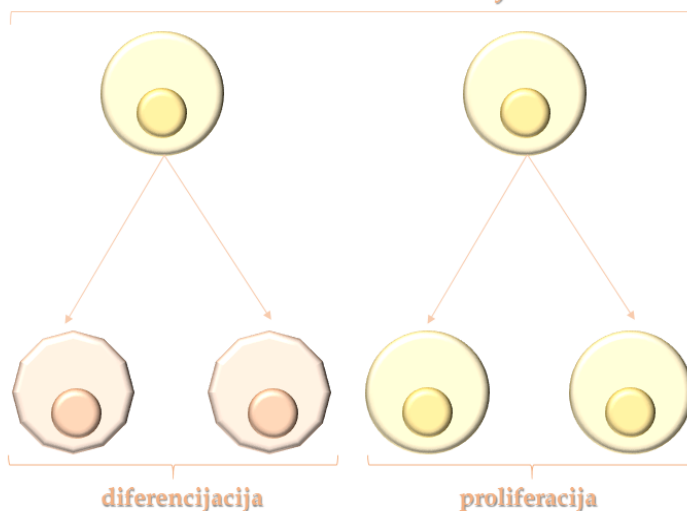
Danas se termin „matične ćelije“ koristi kako bi se opisale ćelije koje imaju sposobnost samoobnavljanja, proliferacije i diferencijacije. Iako se ovaj termin više ne koristi za primordijalne polne ćelije kao što je to bio slučaj u XIX veku, primenjuje se i dalje u slučaju matičnih ćelija polne loze (npr. spermatogonije). Deoba matičnih ćelija može biti simetrična ili asimetrična. U slučaju asimetrične deobe jedna ćelija zadržava svojstva „majke“ ćelije (sposobnost samoobnavljanja), dok druga postaje specijalizovanija (sposobnost diferencijacije). Prilikom simetrične deobe matične ćelije obe „ćerke“ ćelije zadržavaju svojstva „majke“ ćelije (sposobnost proliferacije) ili obe postaju specijalizovanije (Slika 1). Regulacija ćelijskog ciklusa ima ključnu ulogu u održavanju pula matičnih ćelija tokom života jedinke (Orford & Scadden, 2008).

Matične ćelije ne prestaju da fasciniraju naučnu zajednicu. One pružaju priliku za istraživanje mehanizama koji regulišu razvoj embriona, ćelijsku diferencijaciju i regeneraciju tkiva i organa. S obzirom na njihovu sposobnost proliferacije i diferencijacije, matične ćelije imaju veliki potencijal za primenu u različitim aspektima ćelijske terapije (Zhou et al., 2021). Pored toga, naučne studije sugerišu da poremećaj u regulaciji svojstava matičnih ćelija može biti uzrok određenih vrsta tumora (Afify & Seno, 2019).

ASIMETRIČNA ĆELIJSKA DEOBA MATIČNIH ĆELIJA



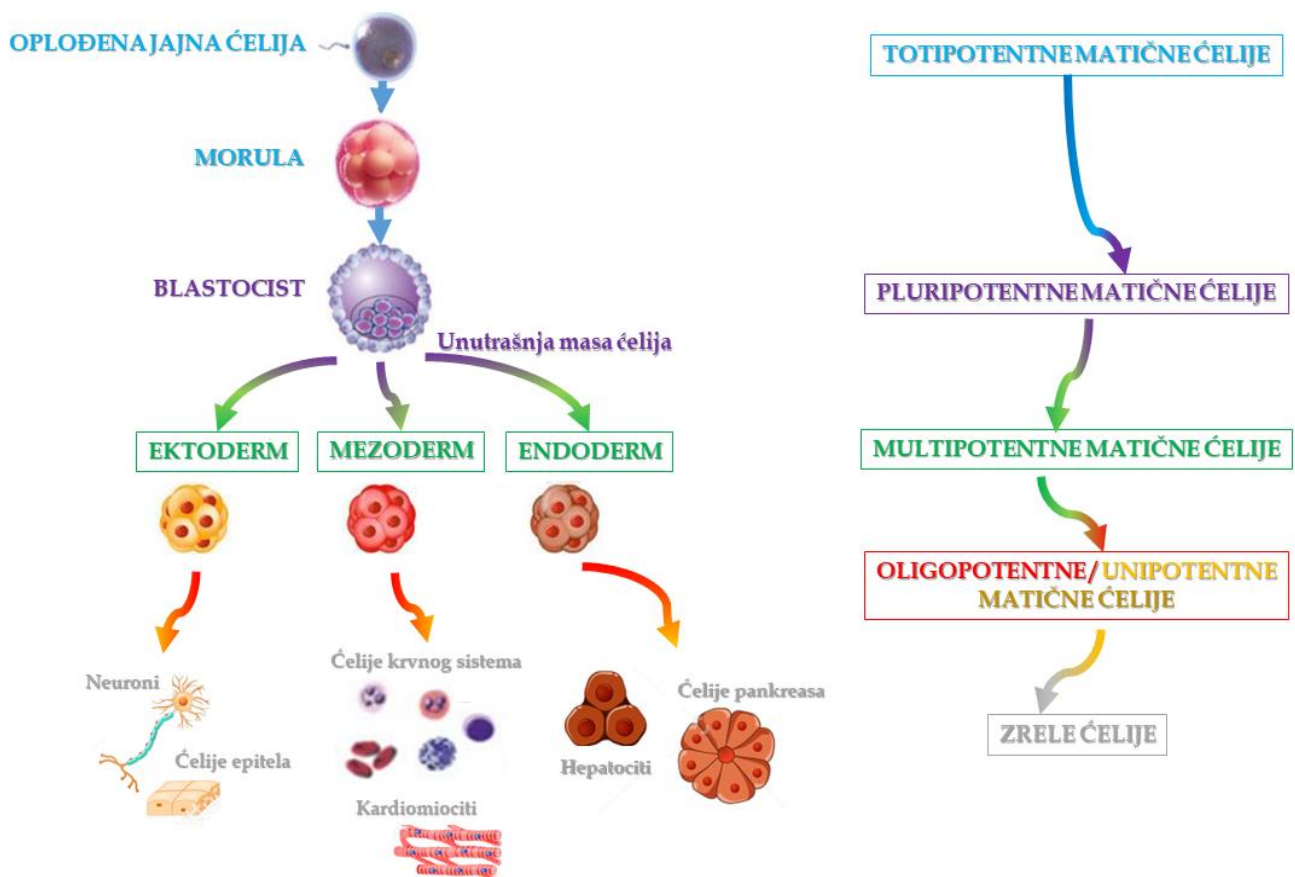
SIMETRIČNA ĆELIJSKA DEOBA MATIČNIH ĆELIJA



Slika 1. Asimetrična i simetrična deoba matičnih ćelija. Pri asimetričnoj deobi jedna „ćerka“ ćelija zadržava svojstva „majke“ ćelije dok druga postaje specijalizovanija. U slučaju simetrične deobe obe „ćerke“ ćelije postaju specijalizovanije ili obe zadržavaju odlike „majke“ ćelije.

1.2. PODELA MATIČNIH ĆELIJA

Glavne odlike matičnih ćelija po kojima se one razlikuju od drugih ćelija u organizmu su sposobnost samoobnavljanja i sposobnost diferenciranja, pri čemu se i same matične ćelije mogu razlikovati po potencijalu ovih osobina (Slika 2).



Slika 2. Podela matičnih ćelija po potencijalu diferencijacije. Preuzeto i modifikovano prema Raynaud i sar. (Raynaud et al., 2014).

Tokom ontogenetskog razvoja potencijal diferencijacije matičnih ćelija postepeno se smanjuje. Oplođena jajna ćelija (zigot) i blastomere koje nastaju tokom prvih deoba zigota imaju totipotentni potencijal diferencijacije. Tokom ranih faza razvića od totipotentnih matičnih ćelija mogu nastati svi tipovi ćelija koji sačinjavaju embrion i ekstraembrionalna tkiva, odnosno može se formirati kompletan organizam. Pluripotentne matične ćelije koje nastaju deobom totipotentnih matičnih ćelija nalaze se u unutrašnjoj masi blastocista i predstavljaju ćelije embriona od kojih mogu nastati ćelije sva tri klicina lista (ektoderm, mezoderm i endoderm), ali ne i placenta. Tokom daljeg razvoja organizma diferencijacioni potencijal se smanjuje. Multipotentne, tkivno specifične matične ćelije odlikuje sposobnost samoobnove i diferenciranja u ograničen broj ćelija u okviru jednog klicinog lista. Ovoj grupi fetalnih i adultnih matičnih ćelija pripadaju npr. matične ćelije hematopoeze (MČH) i mezenhimske matične ćelije (MMC). U fetalnim i adultnim tkivima i organima prisutne su i oligopotentne matične ćelije od kojih nastaje samo nekoliko tipova ćelija (npr. limfoidne i mijeloidne matične ćelije) i unipotentne matične ćelije. Unipotentne matične ćelije zadržavaju sposobnost samoobnavljanja, ali njihovom diferencijacijom nastaje samo jedan tip ćelija (npr. matične ćelije kože, hepatociti i mišićne matične ćelije) (Zakrzewski et al., 2019).

Pluripotentne embrionalne matične ćelije (EMĆ) prvi put su izolovane 1981. godine iz unutrašnje mase blastocista miša (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). Dve decenije kasnije, iz embriona koje su donirali parovi nakon *in vitro* fertilizacije, izolovane su humane EMĆ (Thomson et al., 1998). De Migel i saradnici su 2009. godine ustanovili da i

primordijalne germinativne ćelije mogu biti izvor EMĆ (De Miguel et al., 2009). Uspešna izolacija EMĆ izazvala je veliki entuzijazam među istraživačima, prvenstveno zbog velike mogućnosti za potencijalnu terapijsku primenu. Međutim, etičke dileme koje je pokrenuo ovakav način dobijanja EMĆ dovela su do usvajanja restriktivnih zakonskih regulativa u mnogim državama, odnosno do ograničavanja korišćenja EMĆ kako u naučnim istraživanjima, tako i u kliničkim studijama (Yim, 2005; Simonson et al., 2015).

Da je pluripotentne matične ćelije moguće uspešno generisati u laboratorijskim uslovima ustanovili su Takahashi i Yamanaka (Takahashi & Yamanaka, 2006) koji su za svoje otkriće dobili Nobelovu nagradu 2012. godine. Oni su aktivacijom gena 4 embrionalna transkripciona faktora (gen *POU5F1* (eng. POU class 5 homeobox 1, sinonimi *Oct3/4* i *OCT-4*), gen *SOX2* (eng. SRY-box transcription factor 2), gen *MYC* (eng. MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor, sinonim *c-Myc*) i gen *KLF4* (eng. Kruppel like factor 4)) uspešno reprogramirali zrele somatske ćelije (fibrocite) miša. Ćelije koje su na ovaj način „vraćene“ u stanje matičnosti nazvane su indukovane pluripotentne matične ćelije (eng. *Induced Pluripotent Stem Cell*, iPSC). Zbog nepostojanja etičkih dilema iPSC su prepoznate kao pogodniji izvor pluripotentnih matičnih ćelija. Međutim, njihova potencijalna upotreba u medicini je obustavljena, jer je u naučnim istraživanjima primećena sklonost ka formiranju teratoma, kao i izražena genetička nestabilnost (Yoshihara et al., 2017; Zakrzewski et al., 2019).

Zbog nepostojanja etičkih dilema, lakoće sa kojom se mogu prikupiti i jednostavnosti procedura kultivacije i ekspanzije *ex vivo*, kao najadekvatniji izvor matičnih ćelija sa širokim opsegom potencijalne terapijske primene izdvajaju se adultne, tkivno-specifične matične ćelije.

1.3. ADULTNE (SOMATSKE) MATIČNE ĆELIJE

Adultne matične ćelije karakteriše sposobnost samoobnavljanja i multipotentni potencijal diferencijacije. Mogu se naći u skoro svim tkivima i organima nakon rođenja, ali i u postnatalnim tkivima, zbog čega se prikladnijim izrazom smatra - „somatske“ matične ćelije. Adultne (somatske) matične ćelije prvi put su izolovane iz kosne srži (KS) (Ullah et al., 2015). U njoj su opisana dva tipa matičnih ćelija - matične ćelije hematopoeze (MĆH) i mezenhimske matične ćelije (MMĆ). Brojna istraživanja MĆH omogućila su da se one danas uspešno koriste za lečenje hematoloških malignih i nemalignih oboljenja i pojedinih bolesti imunskog sistema. MĆH su jedini tip matičnih ćelija koji se za sada širom sveta primenjuje kao standardna terapija. Za transplantaciju MĆH postoje strogo definisane medicinske indikacije (Vujić i sar., 2012).

1.4. MATIČNE ĆELIJE HEMATOPOEZE (MĆH)

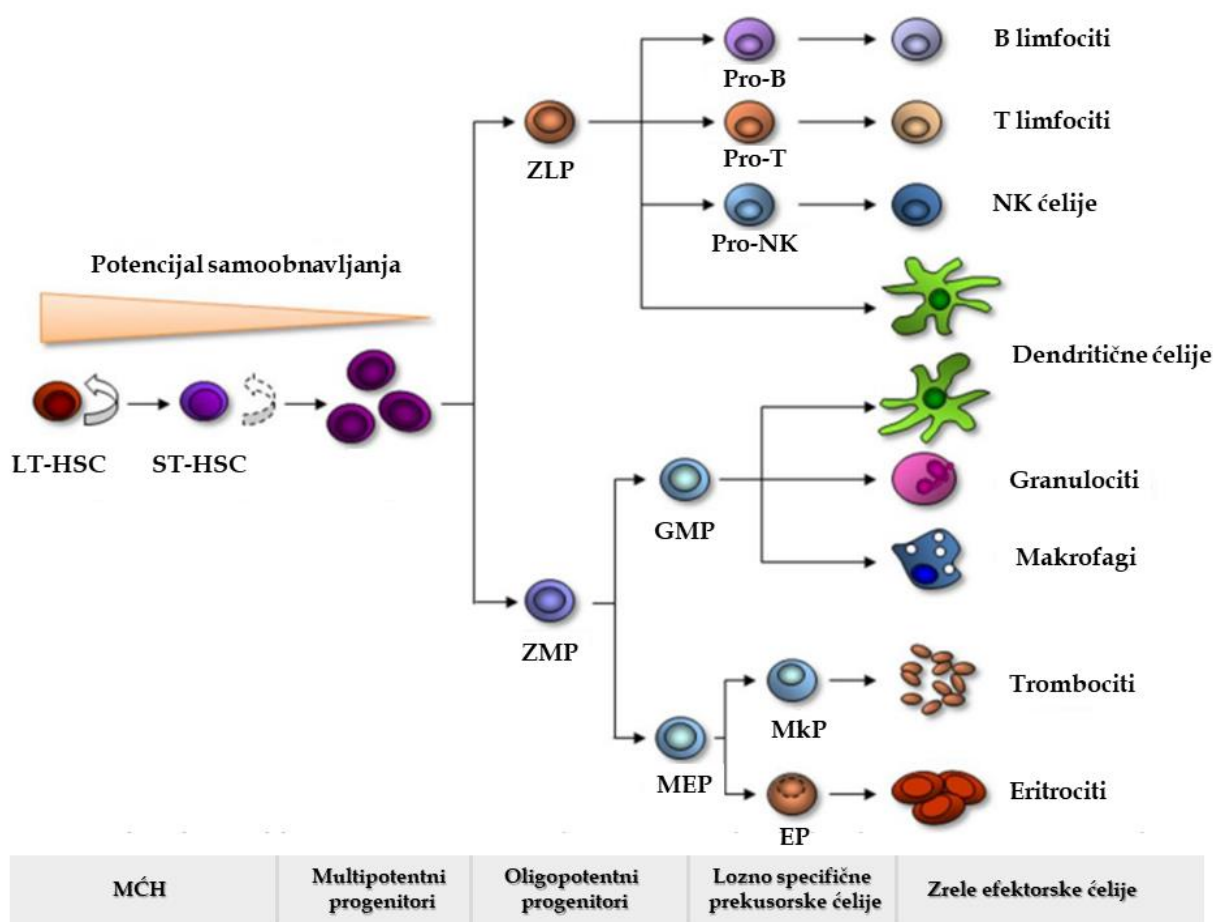
Otkriće matičnih ćelija hematopoeze (MĆH) vezano je za period neposredno nakon Drugog svetskog rata. Prva detonacija nuklearnog uređaja u Novom Meksiku 1945. godine, kao i naknadni efekti koje je atomska bomba imala na stanovništvo Hirošime i Nagasakija izazvali su veliko interesovanje za ispitivanje uticaja zračenja i razvijanje metoda za lečenje njegovih posledica. Proučavajući efekte smrtonosnog zračenja kod miševa, Jacobson i saradnici su otkrili da se zaštitom slezine, kao i zaštitom femura mogu delimično smanjiti štetni efekti zračenja (Jacobson et al., 1951), dok su istraživanja Lorenc i saradnika pokazala da se zaštitini efekat može postići intravenskom infuzijom kosne srži (KS) (Lorenz et al.,

1951). U početku se smatralo da su humoralni elementi prisutni u singenoj KS odgovorni za ublažavanje posledica zračenja, ali su istraživači ustanovili da su za ovaj efekat ipak zaslužne ćelije davaoca koje su se uspešno nastanjivale u ozračenoj KS. Životinja čiji hematopoetski sistem potiče od druge životinje nazvana je „radijaciona himera“ (Ford et al., 1956). Kada se 1958. godine dogodila radijaciona nesreća u Vinči, kod šest fizičara razvila se aplazija KS izazvana zračenjem. Oni su podvrgnuti pionirskoj transplantaciji alogene KS. Jedan od obolelih fizičara je umro, ali je kod preostalih pet transplantacija KS bila uspešna, što se pokazano prolaznim usađivanjem ćelija davaoca na osnovu analiza antigena eritrocita (Mathe et al., 1965). Pretpostavlja se da je, iako je došlo do odbacivanja kalemata i oporavka autolognog hematopoeznog sistema, verovatno alogena KS pružila privremeni zaštitni efekat (Perry & Linch, 1996). Od tada se oblast transplantacione medicine konstantno razvija.

Mada je sposobnost samoobnavljanja ćelija prisutnih u krvi bila već veoma dobro poznata, prisustvo MČH u KS identifikovano je tek 1961. godine (Till & McCulloch, 1961). MČH su izolovane i iz svih tkiva u kojima se tokom razvoja organizma odvija proces hematopoeze (u embrionalnoj fazi razvoja – žumančana kesa, u fetalnoj fazi razvoja – jetra, timus i slezina, od petog meseca inrauterinog razvoja i nakon rođenja - KS). Odmah po rođenju MČH se mogu izolovati iz krvi pupčane vrpce i placente. KS je glavno tkivo u kom se odvija proces hematopoeze u postnatalnom životu (Eridani, 2014).

Iako MČH predstavljaju najbolje okarakterisane adultne matične ćelije, na polju preciznog definisanja njihovog fenotipa i molekulskih mehanizama uključenih u regulaciju procesa samoobnavljanja i diferencijacije još uvek postoje pitanja na koja istraživači nemaju konačan odgovor (Eaves, 2015). Zbog relativno niske zastupljenosti (otprilike 1 na 10 000 ćelija u KS, odnosno 1 na 100 000 ćelija u perifernoj krvi) (Hawley et al., 2006), ali i zbog nepostojanja preciznih morfoloških odlika, MČH je nemoguće razlikovati od ostalih mononuklearnih ćelija sličnih limfocitima. Međutim, moguće ih je detektovati na osnovu ekspresije specifičnih markera prisutnih na ćelijskoj membrani. Iako fenotip MČH još nije u potpunosti definisan, ustanovljeno je da MČH ne ekspimiraju antigene koji su specifični za zrele ćelije hematopoeze, zbog čega se označavaju kao Lin⁻ ćelije (eng. *Lineage specific*, Lin) (Mayani, 2016). Ključan marker za identifikaciju MČH, kako u naučnim istraživanjima, tako i pri terapijskoj primeni, jeste CD34 antigen (Hawley et al., 2006; Calloni et al., 2013). CD34 je integralni membranski glikoprotein čija je ekspresija karakteristična za hematopoetske i endotelske progenitore, dok ga zrele ćelije ne ekspimiraju (Sidney et al., 2014; Aqmasheh et al., 2017). Ustanovljeno je da se u populaciji MČH pored CD34⁺ ćelija može razlikovati i populacija ćelija koje ne ekspimiraju ovaj marker (CD34⁻ CD38⁻ Lin⁻), a istraživanja pokazuju da bi ove ćelije mogle biti na vrhu hijerarhije procesa hematopoeze (Mayani, 2016). S obzirom na relativno mali broj primitivnih MČH, čijom diferencijacijom mogu nastati sve ćelije limfo-hematopoeznog sistema, od izuzetnog je značaja precizna regulacija procesa hematopoeze putem mehanizama koji kontrolišu njihovu deobu (Bernitz et al., 2016). Na vrhu hijerarhijske lestvice procesa hematopoeze nalaze se MČH koje imaju sposobnost potpune rekonstrukcije hematopoeznog sistema. Istraživanja su pokazala da postoji određena heterogenost među MČH, odnosno da se mogu razlikovati različite kategorije ovih ćelija. Jednu čini populacija MČH koja se smatra primitivnijom, a koja tokom dužeg perioda zadržava sposobnost obnavljanja hematopoeznog sistema (eng. *Long-Term Hematopoietic Stem Cells*, LT-HSC). U drugu grupu svrstavaju se MČH koje su „manje primitivne“ odnosno „zrelije“, a čiji je potencijal za obnavljanje hematopoetskog sistema ograničeniji i kratkotrajniji (eng. *Short-Term Hematopoietic Stem Cells*, ST-HSC) (Eridani, 2014; Aqmasheh et al., 2017). Ove ćelije se diferenciraju u multipotentne progenitore koji gube

spodobnost samoobnavljanja, ali se takođe mogu diferencirati u sve hematopoetske ćelije. Od multipotentnih progenitora najpre nastaju oligopotentni progenitori (zajednički progenitor limfoidne loze, ZLP, odnosno zajednički progenitor mijeloidne loze, ZMP). Diferencijacijom ZMP nastaju eritrociti i ćelije prekursori koje daju granulocite i trombocite. Od ZLP nastaju prekursorske ćelije koje se dalje diferenciraju u ćelije prirodne ubice (eng. *Natural Killer*, NK), T i B limfocite. Dendritične ćelije mogu nastati od oba tipa oligopotentnih progenitora, odnosno i od ZMP i od ZLP (Reya et al., 2001; Seita & Weissman, 2010; Aqmasheh et al., 2017) (Slika 3). Važno svojstvo hematopoetskog sistema podrazumeva postepeno ograničavanje potencijala diferencijacije tokom sazrevanja progenitorskih i prekursorskih ćelija, uz paralelno povećanje proliferativnog kapaciteta. Na taj način nastaje veliki broj zrelih ćelija hematopoeze od relativno malog broja njihovih prethodnika (Bryder et al., 2006).



Slika 3. Hijerarhijski model procesa hematopoeze. MČH – matične ćelije hematopoeze; LT-HSC – eng. *Long-Term Hematopoietic Stem Cells*, MČH sa većim potencijalom samoobnavljanja; ST-HSC – eng. *Short-Term Hematopoietic Stem Cells*, MČH sa manjim potencijalom samoobnavljanja; ZLP – zajednički limfoidni progenitor; ZMP – zajednički mijeloidni progenitor; GMP – granulocitno-monocitni progenitori; MEP – megakariocitni-eritrocitni progenitori; Mkp – megakariocitni prekursori; GP – granulocitni prekursori; Pro-B – progenitori B limfocita; Pro-T – progenitori T limfocita; Pro-NK – progenitori NK ćelija. Preuzeto i izmenjeno prema Reya i sar. (Reya et al., 2001).

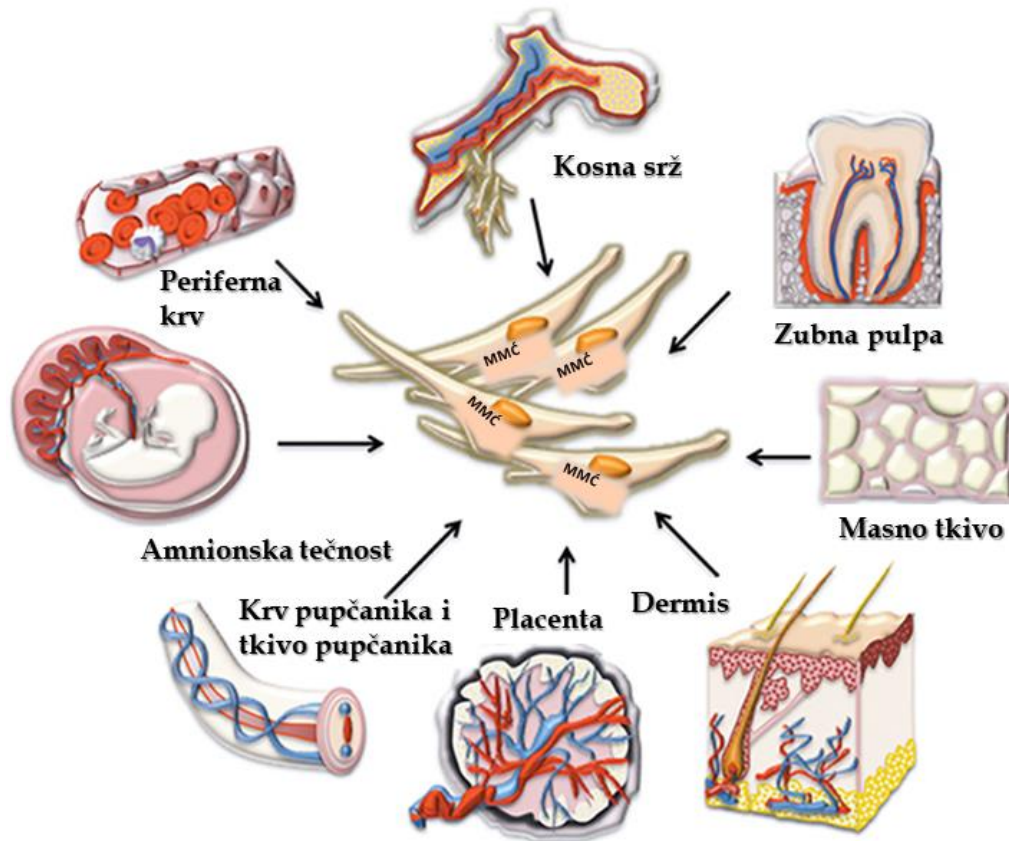
1.5. MEZENHIMSKE MATIČNE ĆELIJE (MMC)

Za otkriće prisustva nehematopoetskih matičnih ćelija u KS najzaslužniji su Friedenstien i saradnici. U eksperimentima koje su izvodili tokom 60-ih i 70-ih godina

prošlog veka oni su dokazali da u KS postoje ćelije koje mogu da se diferenciraju u osteogenom pravcu. Tokom eksperimenata u kojima su kao model-sistem koristili miševе, najpre su primetili da posle transplantacije KS novoformirano koštano tkivo vodi poreklo od davaoca (Friedenstein et al., 1968). Do sličnog zaključka došli su i Tavassoli i Crosby (Tavassoli & Crosby, 1968). U navedenim istaživanjima primećeno je da se prilikom transplantacije KS u bubrežne kapsule miševa u njima formira ektopična kost. Ova zapažanja ukazala su na to da u KS pored hematopoetskih ćelija postoje i matične ćelije od kojih mogu nastati prekursori koštanog tkiva (Friedenstein et al., 1968). Nekoliko godina kasnije, Friedenstein i saradnicu su tokom eksperimenata u kojima su zasejavali ćelije izolovane iz KS miša na plastičnu podlogu identifikovali ćelije koje, za razliku od hematopoetskih ćelija, imaju sposobnost adhezije za plastičnu podlogu. Ove ćelije imale su vretenast oblik, a označene su kao CFU koje stvaraju CFU-F, jer prilikom njihove kultivacije nastaju pojedinačne kolonije koje se sastoje od ćelija koje podsećaju na fibroblaste (Friedenstein et al., 1970). Kasnija istraživanja ustanovila su da se i iz aspirata humane KS mogu izolovati ćelije sličnih karakteristika (Castro-Malaspina et al., 1980; Gartner & Kaplan, 1980). Da od stromalnih ćelija KS mogu nastati koštano i hrskavičavo tkivo ustanovili su takođe Friedenstein i saradnici 1987. godine (Friedenstein et al., 1987). Za ćelije koje poseduju navedene sposobnosti Friedenstein i Owen su upotrebili termin „osteogene matične ćelije“, odnosno „stromalne matične ćelije kosne srži“ (Owen & Friedenstein, 1988). Pojam „mezenhimske matične ćelije“ (eng. *Mesenchymal Stem Cells*) uveo je u naučnu literaturu 1991. godine Arnold Caplan. On je ovim pojmom označio ćelije prisutne u KS koje mogu da se izoluju na osnovu adhezivne sposobnosti, da se umnože u kulturi i diferenciraju u različite ćelije tkiva koja imaju mezodermalno poreklo (Caplan, 1991). Iako je naziv „mezenhimske matične ćelije“ veoma popularan i najčešće se koristi, preporuka Komiteta za mezenhimske i tkivne matične ćelije Međunarodnog udruženja za ćelijsku terapiju (eng. *International Society for Cellular Therapy*, ISCT, sinonim Komitet) je da se iz naziva izostavi obeležje „matične“ (Dominici et al., 2006). Razlog za i dalje aktuelnu dilemu oko adekvatnog naziva ovih ćelija proističe iz njihove heterogenosti i nemogućnosti da se sa sigurnošću potvrdi da sve ćelije izolovane na ovaj način ispunjavaju uslove matičnosti u potpunosti, odnosno da tokom dužeg vremenskog perioda zadržavaju sposobnost samoobnavljanja i diferencijacije u različite tipove ćelija *in vivo*. Iako Komitet ne dovodi u pitanje da u populaciji adherentnih ćelija zaista postoji frakcija istinski matičnih ćelija, ipak predlaže da se za ovu heterogenu populaciju ćelija koristi naziv „multipotentne mezenhimske stromalne ćelije“ (Dominici et al., 2006). Predloženi naziv oslikava sve karakteristike ovih ćelija, dok se sporna implikacija njihove matičnosti izbegava. Prema mišljenju Komiteta, terminom „mezenhimske matične ćelije“ treba označavati isključivo ćelije za koje je funkcijskim testovima potvrđeno da ispunjavaju uslov matičnosti. Pored termina koji je predložio Komitet, u literaturi se mogu naći i drugi nazivi za istu ćelijsku populaciju, npr. multipotentne stromalne ćelije (eng. *Multipotent Stromal Cells*) (Soliman et al., 2021), mezodermalne matične ćelije (eng. *Mesodermal Stem Cells*) (Gojo & Kyo, 2002), mezenhimske stromalne ćelije (eng. *Mesenchymal Stromal Cells*) (Horwitz et al., 2005). Caplan, koji je zaslužan za uvođenje termina „mezenhimske matične ćelije“, u jednom od svojih najskorijih radova favorizuje naziv „medicinske signalne ćelije“ (eng. *Medicinal Signaling Cells*) zbog sekretorne uloge ovih ćelija *in vivo*, prvenstveno na mestima gde postoje oštećenja ili inflamacija tkiva i organa (Caplan, 2017). Može se primetiti da se za sve ove predložene termine na engleskom jeziku i dalje upotrebljava skraćenica „MSCs“ koja je već dugi niz godina prisutna u naučnoj literaturi i predstavlja ključni pojam za pretragu. Zbog mogućnosti korišćenja široko rasprostranjene skraćenice, bar donekle se izbegavaju

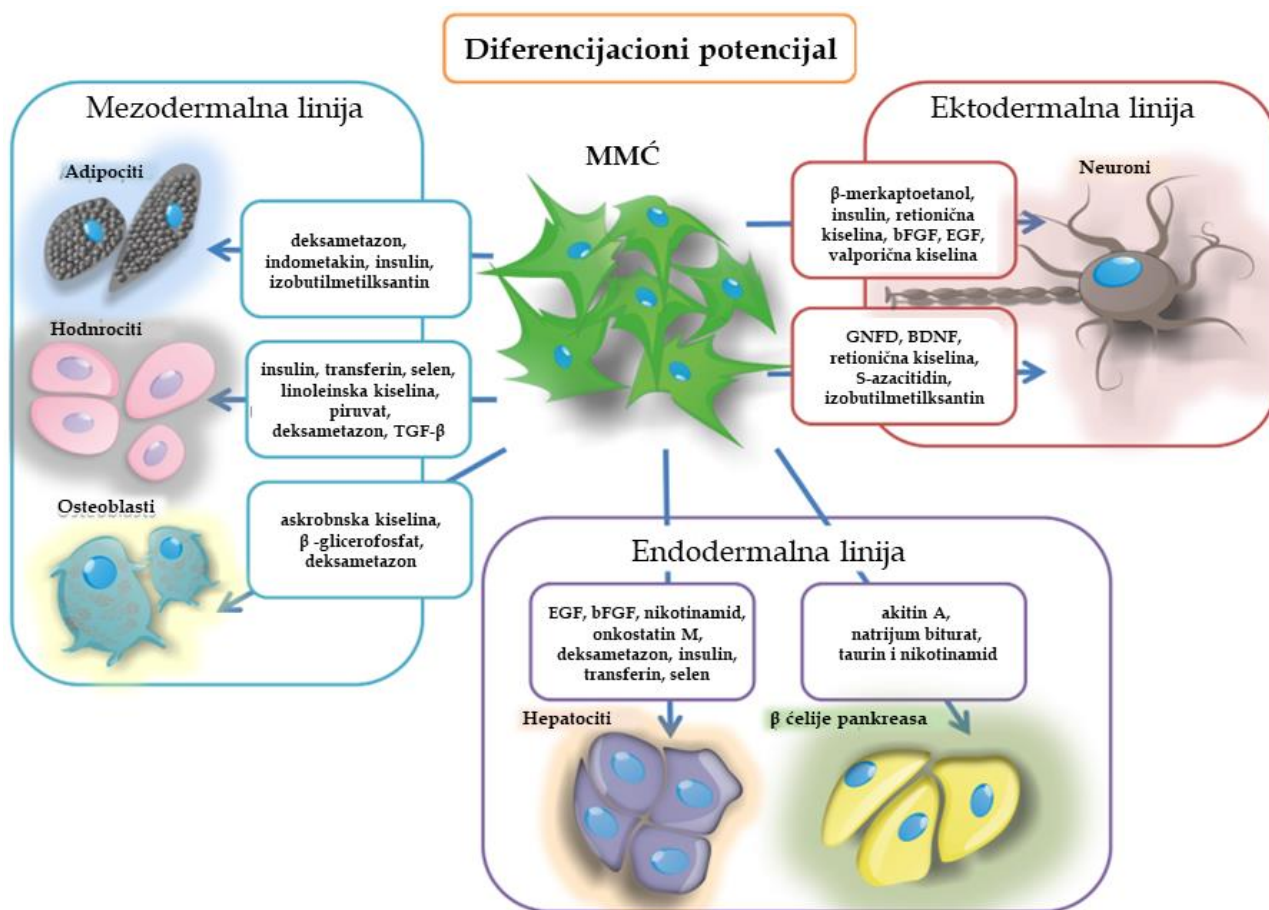
nesporazumi koji bi mogli nastati. Usled i dalje aktuelne neusaglašenosti oko najedakvatnijeg naziva, za potrebe ove disertacije koristiće se skraćenica MMĆ, jer je i dalje termin „mezenhimske matične ćelije“ najzastupljeniji u naučnoj literaturi.

Nakon identifikacije MMĆ u KS, tokom godina koje su usledile razvijene su brojne metode za uspešnu izolaciju i umnožavanje MMĆ *in vitro*, ne samo iz KS, već i iz drugih tkiva i organa. MMĆ su izolovane iz skoro svih perinatalnih i postnatalnih tkiva poput amniotske tečnosti i membrane, horionske membrane i resica, placentе, krvi pupčanika i samog tkiva pupčanika (Vartanova sluz), masnog tkiva, periferne krvi, zubne pulpe (Hass et al., 2011; Merino-González et al., 2016) (Slika 4).



Slika 4. Izvori MMĆ. Preuzeto i modifikovano prema Merino-Gonzales i sar. (Merino-González et al., 2016).

U ovim tkivima MMĆ učestvuju u održavanju tkivne homeostaze i procesima popravke oštećenih tkiva (Andrzejewska, Lukomska, et al., 2019). Pokazano je da MMĆ imaju veoma izraženo svojstvo plastičnosti, odnosno da se u odgovarajućim *in vitro* uslovima mogu diferencirati ne samo u ćelije mezodermalnog porekla (osteoblasti, hondrociti, adipociti, tenociti), već i u ćelije endodermalnog (endotelske ćelije, hepatociti, kardiomiociti) i ektodermalnog (neuroni) porekla (Ullah et al., 2015; Andrzejewska, Lukomska et al., 2019) (Slika 5).



Slika 5. Diferencijacioni potencijal MMĆ. Preuzeto i modifikovano prema Andrzejewska i sar. (Andrzejewska et al., 2019).

Plastičnost MMĆ ukazuje na njihov veliki regenerativni potencijal (Ullah et al., 2015). MMĆ učestvuju u procesu obnavljanja oštećenih tkiva putem produkcije biološki aktivnih molekula, kao i interakcijama sa ćelijama imunskog sistema i drugim ćelijama specifične mikrosredine. Specifično, MMĆ u kosnoj srži (KS-MMĆ) imaju veoma važnu ulogu u podržavanju procesa hematopoeze i održavanju funkcija hematopoetskih matičnih i progenitorskih ćelija (Fajardo-Orduña et al., 2015). Pokazano je da MMĆ aktivno učestvuju u modulaciji imunskog odgovora suprimirajući aktivaciju i proliferaciju T i B limfocita, dendritičnih ćelija i ćelija prirodnih ubica, (eng. *Natural Killer*, NK), ali i stimulišu nastajanje regulatornih T limfocita (Treg) (Ullah et al., 2015; Andrzejewska, Lukomska, et al., 2019). Sekretom KS-MMĆ čine brojni i raznoliki biološki aktivni faktori, koji imaju uticaj na proliferaciju, apoptozu, fibrozu, hemotaksu, kao i na procese imunomodulacije i angiogeneze u oštećenim tkivima. Neki od brojnih biološki aktivnih faktora koji čine sekretom KS-MMĆ imaju uticaj na proliferaciju i diferencijaciju ćelija – npr. bFGF (eng. Basic Fibroblast Growth Factor), IGF (eng. Insulin-like Growth Factor), SFRP1 (eng. Secreted frizzled-related protein-1), SFRP2 (eng. Secreted frizzled-related protein-2), STC1 (eng. Stanniocalcin-1), pojedine mikro RNK (miR-10b-5p, miR-22-3p, miR-191, miR-222, miR-21); neki učestvuju u remodeliranju vanćelijskog matriksa – matriksne metaloproteinaze (MMP-1, MMP-9), aktivator plazminogena (PA), faktor nekroze tumora alfa (TNF- α); neki regulišu proces angiogeneze – angiopietini (ANGs), faktor rasta fibroblasta-2 (FGF-2), transformišući faktor rasta beta (TGF- β), vaskularno endotelni faktor rasta (VEGF); dok pojedini imaju imunomodulatorna svojstva – faktor rasta hepatocita (HGF), indolamin-2,3-dioxygenaza (IDO), inducibilna sintaza azot oksida (iNOS), interleukin-6 (IL-6), interleukin

10 (IL-10), leukemija-inhibitorni faktor (LIF), prostaglandin E2 (PEG2), miR-143-3p (Chu et al., 2020). Istraživanja pokazuju da KS-MMĆ mogu sekretovati biološki aktivne faktore direktno u mikrookruženje, ili se oni mogu nalaziti u okviru ekstraćelijskih vezikula (EV) (Sheykhhasan, 2017). Pokazano je da MMĆ-EV mogu smanjiti upalu, promovisati zarastanje i poboljšati funkciju organa, što ih čini pogodnim kandidatima za potencijalnu terapijsku primenu, pri čemu bi se izbegli ograničavajući faktori koji postoje u slučaju primene ćelija. Ipak, ključno je najpre u prekliničkim i kliničkim studijama detaljno ispitati bezbednost i efikasnost primene MMĆ-EV (Tieu et al., 2020).

1.5.1. Karakterizacija MMĆ

Zbog raznovrsnosti tkiva iz kojih se mogu izolovati, kao i zbog drugačijih metodoloških pristupa različitih grupa, otežano je poređenje rezultata eksperimenata i donošenje definitivnih zaključaka o biološkim svojstvima MMĆ. To predstavlja veliki problem posebno u kontekstu njihove potencijalne upotrebe u terapiji različitih oboljenja. Zbog navedenih problema, Komitet za mezenhimske i tkivne matične ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju postavio je minimalne kriterijume za bolju standardizaciju i za preciznije definisanje MMĆ. Prema smernicama Komiteta, da bi se ćelije mogle okarakterisati kao MMĆ, neophodno je da pri kultivaciji *in vitro* ispoljavaju sledeće karakteristike (Dominici et al., 2006) (Slika 6):

- Sposobnost adhezije za plastiku;
- Pozitivnu ekspresiju ($\geq 95\%$) površinskih antigena za CD73, CD90 i CD105 antigene, uz negativnu ekspresiju ($\leq 2\%$) antigena za CD34 (marker primitivnih hematopoetskih progenitora i endotelnih ćelija), CD45 (panleukocitni marker), CD14 ili CD11b (markeri monocita i makrofaga), CD79 α ili CD19 (markeri B limfocita) i HLA-DR (eng. Humane Leukocyte Antigen DR isotype).
- Sposobnost diferencijacije u najmanje tri vrste ćelija mezodermalnog porekla – osteoblaste, hondroblaste i adipocite kultivacijom u odgovarajućim uslovima.



Slika 6. Kriterijumi za definisanje MMĆ prema Komitetu za mezenhimske i tkivne matične ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju. Preuzeto i modifikovano prema Garcia-Gomez i sar. (García-Gómez et al., 2010).

Navedene smernice, prihvaćene od strane naučne zajednice, postale su kriterijumi za definisanje MMC. Ovi kriterijumi se ne mogu uzimati u obzir pojedinačno, već svi moraju biti ispunjeni istovremeno. Odnosno, da bi se izolovane ćelije mogle okarakterisati kao MMC, neophodno je da poseduju zadovoljavajuće morfološke i funkcijske osobine, kao i ekspresiju odgovarajućih površinskih antigena, uz odsustvo ekspresije površinskih antigena karakterističnih za hematopoetske ćelije. Kako MMC imaju veliki potencijal ekspanzije tokom kultivacije *in vitro*, preporučeno je da se tokom različitih pasaža proverava da li ćelije zadržavaju sve navedene karakteristike tipične za MMC. Poželjno je tokom različitih pasaža vršiti i proveru kariotipa, jer tokom kultivacije može doći do transformacije u novu ćelijsku lozu, pa u tom slučaju ćelije više ne mogu biti označene kao MMC (Dominici et al., 2006).

Pored navedenih površinskih markera čija je ekspresija neophodna kako bi se zadovoljili minimalni kriterijumi za karakterizaciju MMC, pojedini istraživači favorizuju i prisustvo dodatnih markera, koji, prema njihovim rezultatima, odlikuju adherentne MMC sa većim klonogenim i multilinijskim diferencijacionim potencijalom *in vitro*. Neki od površinskih antigena koji se mogu koristiti kao dodatni markeri za uspešnu izolaciju MMC iz humane kosne srži (KS-MMC) su STRO-1 (eng. *Antigen of the Bone Marrow Stromal-1 Antigen*, površinski antigen eksprimiran na stromalnim ćelijama KS), CD106 (adhezioni molekul vaskularnih ćelija, eng. *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*) i CD146 (adhezioni molekul ćelija melanoma, eng. *Melanoma Cell Adhesion Molecule*) (Andrzejewska, Lukomska, et al., 2019). Takođe, istraživanja pokazuju da su markeri pluripotentnosti embrionalnih matičnih ćelija kojima pripadaju OCT-4, SOX2 i NANOG (eng. *Nanog homeobox*) eksprimirani i u MMC. Iako je ustanovljeno da ovi transkripcioni faktori u MMC učestvuju u regulaciji procesa samoobnavljanja, proliferacije i multipotentne diferencijacije, potrebno je preciznije ispitati njihovu ulogu u ovim ćelijama (Tsai et al., 2012; Seo et al., 2013; Heo et al., 2016; Malvicini et al., 2019).

1.5.2. Regenerativni potencijal MMC

Čovečanstvo odavno teži pronalazaženju načina za postizanje regeneracije oštećenih tkiva i organa kojom bi se povratile funkcije izgubljene tokom starenja ili usled traumatskih povreda. Istraživanja MMC koja se sprovode više od pola veka dovela su do značajnog napretka u oblasti tkivnog inženjerstva zasnovanog na primeni ovih ćelija. Konstantne optimizacije metoda ekstrakcije, kultivacije i diferencijacije omogućile su da istraživanja MMC napreduju ka njihovoj potencijalnoj kliničkoj primeni za terapiju različitih bolesti i rekonstrukciju oštećenih tkiva. Svojstva koje čine MMC optimalnim kandidatima za primenu u regeneraciji tkiva predstavljaju njihov imunomodulatorni kapacitet uz odsustvo imunogenosti, parakrina i/ili autokrina sekrecija različitih signalnih molekula, kao što su citokini i faktori rasta, sposobnost diferencijacije u ciljne ćelije različitih tkiva (Han et al., 2019), kao i sposobnost migriranja na oštećena mesta u tkivu (Murphy et al., 2013).

Takođe, veoma važnu karakteristiku MMC u kontekstu njihovog regenerativnog potencijala predstavlja sposobnost samoobnavljanja. Za sposobnost samoobnavljanja matičnih ćelija ključni su signalni putevi i mehanizmi koji održavaju nediferencirano stanje ovih ćelija. Pristup kojim su istraživači utvrdili koji geni kandidati učestvuju u održavanju stanja matičnosti doprineli su razumevanju procesa samoobnavljanja MMC (Song et al., 2006). Pokazano je da su geni *OCT-4*, *SOX2*, *REX1* (eng. *ZFP42 zinc finger protein*, sinonim *REX1*), *NANOG*, *MYC* i *KLF4* važni za regulaciju ovog procesa (Kolf et al., 2007; Niwa, 2007). Takođe, pokazano je da ekstraćelijski signalni faktori, uključujući faktore rasta i citokine,

promovišu i/ili održavaju samoobnavljanje MMC *in vitro*. Između ostalih faktora, u održavanju stanja matičnosti MMC važnu ulogu imaju leukemija inhibitorni faktor (LIF), faktori rasta fibroblasta (eng. *Fibroblast Growth Factors*, FGFs) i proteini koji pripadaju Wnt familiji proteina (eng. *Mammalian Homologues of Drosophila Wingless*, Wnts). Ovi faktori posebno su privukli pažnju naučne zajednice zbog pokazane uloge u samoobnavljanju drugih tipova matičnih ćelija, u održavanju embrionalnog mezenhinskog tkiva u nediferenciranom stanju, kao i u programima dediferencijacije ćelija, uključujući i tumorogenezu (Kolf et al., 2007).

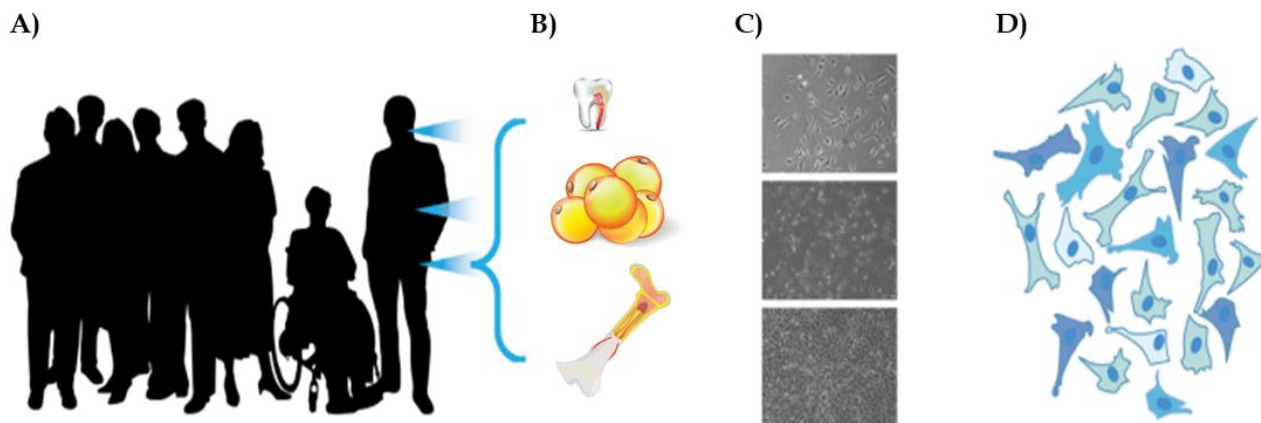
S druge strane, lozno-specifično opredeljivanje MMC odvija se kroz proces diferencijacije koji se pokreće kroz složene interakcije brojnih transkripcionih faktora koji utiču na modifikaciju strukture hromatina i koji dovode do inhibicije ekspresije gena odgovornih za održavanje stanja matičnosti, dok istovremeno aktiviraju ekspresiju gena neophodnih za diferencijaciju (Liu et al., 2007; Almalki & Agrawal, 2016). Složeni mehanizmi signalnih kaskada omogućuju da se u MMC pokrene ekspresija gena koji su karakteristični za jednu ćelijsku lozu, dok se istovremeno inhibira ekspresija gena koji su neophodni za usmeravanje diferencijacije u drugim pravcima (Benayahu et al., 2009). Pored toga što je diferencijacija MMC regulisana remodeliranjem hromatina i transkripcijom odgovarajućih gena, na ovaj proces utiču i brojni citokini i faktori rasta koji su karakteristični za odgovarajuću nišu MMC (Almalki & Agrawal, 2016). Za diferencijaciju MMC u osteogenom pravcu ključna je aktivacija transkripcionog faktora RUNX2 (eng. RUNX family transcription factor 2), a u regulaciju njegove aktivnosti uključeni su, između ostalog, BMPs (eng. Bone Morphogenetic Proteins) i faktor nekroze tumora alfa (eng. Tumor Necrosis Factor Alpha, TNF- α) (Kolf et al., 2007). Za potpunu diferencijaciju osteoblasta, pored ekspresije RUNX2, neophodna je i aktivacija Wnt, Hedgehog i NELL1 (eng. Protein kinase C-binding protein NELL1) signalizacije (Almalki & Agrawal, 2016). Geni čija je ekspresija povezana sa hondrogenom diferencijacijom kodiraju transkripcioni faktor SOX9 (eng. SRY-box transcription factor 9) i proteinske produkte kao što su kolagen tip II i IX, agrekan, biglikan (eng. *Byglican*), dekorin (eng. *Decorin*) i COMP (eng. Cartilage Oligomeric Matrix Protein) (Kolf et al., 2007). Pored toga, istraživanja ukazuju da faktor rasta tumora beta (eng. *Tumor Growth Factor Beta*, TGF- β) i BMPs, preko aktivacije unutarćelijskih proteina koji pripadaju familiji Smad i MAPK (eng. Major Mitogen-Activated Protein Kinase) signalnih puteva, mogu uticati na hondrogenu diferencijaciju (Goumans & Mummery, 2000; Kolf et al., 2007). Jedan od ključnih aktivatora adipogene diferencijacije je PPAR γ (eng. Nuclear Hormone Receptor Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ). PPAR γ promoviše adipogenezu MMC uz istovremeno inhibiranje osteogene diferencijacije (Nuttall & Gimble, 2004). Vezivanje PPAR γ za različite ligande, uključujući dugolančane masne kiseline i jedinjenja tiazolidindiona, indukuje njegovu posledičnu aktivaciju ili inhibiciju (Kolf et al., 2007).

Multipotentni potencijal diferencijacije jedna je od najkarakterističnijih odlika MMC, ali MMC izolovane iz različitih tkiva imaju varijabilnu sposobnost proliferacije i tendenciju diferencijacije ka određenim ćelijskim lozama (Andrzejewska, Lukomska, et al., 2019). U tom kontekstu, sve veći broj studija bavi se proučavanjem heterogenosti MMC. Ustanovljeno je da pri primeni standardnih protokola za diferencijaciju, KS-MMC imaju veći potencijal za osteogenu i hondrogenu nego za adipogenu diferencijaciju (Lin et al., 2019). Pojedina istraživanja ukazuju da MMC izolovane iz sinovijalne tečnosti imaju veći proliferativni kapacitet i sposobnost diferencijacije u hondrogenom pravcu nego MMC koje su izolovane iz masnog tkiva (Mochizuki et al., 2006). Istraživanja upućuju na to da MMC izolovane iz krvi pupčanika pokazuju određene prednosti u odnosu na druge izvore MMC.

Naime, ove ćelije se mogu kultivisati *in vitro* tokom dužeg perioda, odnosno imaju veću sposobnost dugotrajne ekspanzije, manji stepen ćelijskog starenja i veće antinflatatorne efekte (Jin et al., 2013). Brojna su istraživanja u kojima se ispituje mogućnost za potencijalnu primenu MMC u regenerativnoj medicini, naročito u rekonstrukciji mišićno-skeletnog sistema, nervnog sistema, miokarda, jetre, rožnjače, traheja i kože (Han et al., 2019). Za potencijalnu ćelijsku terapiju od velikog je značaja izabrati tip MMC u skladu sa specifičnom namenom.

1.5.3. Heterogenost mezenhimskih matičnih ćelija kosne srži (KS-MMC)

Istraživanjima je ustanovljeno da MMC imaju veoma heterogena svojstva. Naime, uprkos morfološkim, fenotipskim i funkcijskim sličnostima, kao i ispunjenosti svih kriterijuma za karakterizaciju MMC definisanim od Komiteta za mezenhimske i tkivne matične ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju, u literaturi se mogu naći podaci koji upućuju na razlike MMC u pogledu potencijala diferencijacije, proliferacije i imunomodulacije, kao i stepena ekspresije pojedinih površinskih antigena. Heterogenost MMC je uočena kako između MMC izolovanih iz različitih tkiva poput KS, masnog tkiva ili zubne pulpe, tako i između tkivno-specifičnih MMC različitih vrsta organizama. Pored toga, mnoga istraživanja ukazuju na razlike MMC izolovanih iz istog tkiva različitih davalaca zavisne od njihovog uzrasta i zdravstvenog statusa. Heterogenost je uočena čak između klonova i pojedinačnih ćelija u okviru populacije tkivno-specifičnih MMC jednog davaoca koje se mogu dovesti u vezu sa uticajem kultivacije *in vitro* (Andrzejewska, Lukomska et al., 2019; Costa et al., 2021; Zhang et al., 2021)(Slika 7).



Slika 7. Heterogenost MMC postoji na više nivoa. A) u zavisnosti od davaoca B) među MMC izolovanih iz različitih tkiva C) između klonova populacije tkivno-specifičnih MMC jednog davaoca D) na nivou pojedinačnih ćelija. Preuzeto i modifikovano prema (McLeod & Mauck, 2017).

1.5.3.1. Uticaj niše kosne srži na heterogenost KS-MMC

Od kako je prvi put uveden 1978. godine (Schofield, 1978), koncept „niše“ matičnih ćelija veoma intrigira mnoge članove naučne zajednice i podstiče brojna istraživanja. Pojam niše obuhvata kompleksnu mikrosredinu čija je lokalna arhitektura i sastav određen specifičnim tipovima ćelija koje se u njoj nalaze i direktno interaguju, kao i komponentama vanćelijskog matriksa i solubilnim molekulima. Svi ovi elementi deluju zajedno kako bi održali matične ćelije u njihovom nediferenciranom stanju, kao i da bi kompleksnim

interakcijama podsticali njihovu diferencijaciju u slučaju potrebe za regeneracijom i/ili repopulacijom tkiva (Kolf et al., 2007). Čelijsku komponentu niše KS čine stromalne ćelije (MMC, osteoblasti, endotelne ćelije, fibroblasti i adipociti) i imunske ćelije (npr. makrofagi i limfociti), koje interaguju sa MČH i utiču na proces hematopoeze (Reagan & Rosen, 2016).

Još 1970-ih godina, studije koje su ispitivale interakcije između stromalnih ćelija KS i MČH sugerisale su da osteoblasti imaju veoma važnu ulogu i u procesu hematopoeze (Patt & Maloney, 1972). Tokom godina koje su sledile ustanovljeno je da u KS postoji više različitih niša, čiju veoma važnu komponentu predstavljaju MMC. Endostealna niša se nalazi u blizini površine kosti, dok je vaskularna locirana u blizini arteriola i sinusoida (Mayani, 2016). Raznolika organizacija niša u KS utiče na regulaciju procesa hematopoeze, jer su MČH u različitim nišama izložene drugačijim međućelijskim kontaktima i signalnim molekulima (Boulais & Frenette, 2015). Heterogenost koja je primećena pri kultivaciji *in vitro* MMC može na neki način odražavati heterogenost *in vivo* populacija MMC iz različitih niša. Naime, MMC koje su locirane u perivaskularnoj niši mogu se značajno razlikovati po svojim funkcijskim svojstvima u odnosu na MMC koje se nalaze u endostealnoj niši. Čak u okviru niše koja se nalazi blizu površine kostiju uočene su razlike, imajući u vidu da su MMC u područjima remodeliranja kostiju okružene ćelijama koje nastaju njihovom diferencijacijom, aktivnim osteoblastima, dok osteoblasti u stanju mirovanja (eng. *Quiescent*) preovlađuju u područjima koja ne podležu remodeliranju (Jones & Schäfer, 2015). Pored toga što diferencijacijom MMC nastaju osteoblasti neophodni za regeneraciju kostiju, adhezivnim interakcijama i proizvodnjom citokina MMC regulišu samoobnavljanje, proliferaciju i diferencijaciju MČH, što ih čini ključnim faktorima za regulaciju procesa hematopoeze (Kfoury & Scadden, 2015). Istraživanja u kojima je ispitivana sposobnost humanih KS-MMC da podržavaju proces hematopoeze kod miševa ukazala su da CD146⁺ MMC izolovane iz zida sinusoida imaju navedenu sposobnost, veliki klonogeni kapacitet i sposobnost samoobnavljanja *in vivo*, kao i da CD271⁺ MMC lokalizovane u trabekularnom regionu KS imaju veliki kapacitet za formiranje CFU-F kolonija, sposobnost diferencijacije u zrele ćelijske loze mezodermalnog porekla *in vitro*, kao i uspostavljanja odgovarajućeg mikrookruženja potrebnog za odvijanje procesa hematopoeze nakon transplantacije. Takođe je pokazano da se CD271⁺ i CD271⁺/CD146^{-low} MMC nalaze u blizini površine kosti, gde vladaju hipoksični uslovi i gde su locirane primitivnije LT-MČH. Sa druge strane, CD146⁺ i CD271⁺/CD146⁺ MMC nalaze se u blizini sinusoida i u kontaktu su sa aktivnijim, brzoproliferišućim MČH. Međutim, postoji i dinamičniji koncept niše KS prema kojem su primitivne MČH u bliskom kontaktu sa MMC lokalizovane duž sinusoida sposobne da integrišu signale iz endostealne niše i po potrebi migriraju prema krvnim sudovima koji oblažu kosti (npr. nakon zračenja KS) (Crippa & Bernardo, 2018). Ustanovljeno je da bliska veza MMC i MČH postoji ne samo u KS, već tokom celokupnog razvoja organizma. Naime, tokom embrionalne faze razvoja humanih embriona, ispod hematopoetskog sloja u dorzalnoj aorti aorto-gonadalno-mezonefričkog regiona nalazi se stromalni sloj u kom su prisutne MMC. Pretpostavlja se da MMC, zajedno sa MČH, tokom fetalne faze razvoja migriraju u jetru, a zatim i u KS (Wang et al., 2008). Takođe se smatra da matične ćelije prisutne u embrionu sukcesivno nastanjuju mnoga adulta tkiva i organe u čijem obnavljanju i popravkama učestvuju tokom života jedinke (De Miguel et al., 2009).

Većina saznanja o MMC zasnivaju se na ispitivanjima KS-MMC (Wu et al., 2013). Za MMC koje su izolovane iz drugih tkiva karakteristično je da, pored velikih sličnosti sa KS-MMC, poseduju i određene tkivno-zavisne specifičnosti (Wagner et al., 2005; Taran et al., 2014; Choi et al., 2017). Naime, prema rezultatima pojedinih studija MMC izolovane iz masnog tkiva (MT-MMC) imaju veći proliferativni kapacitet od KS-MMC, dok je efikasnost

formiranja kolonija ovih tipova MMĆ slična (Li et al., 2015). Sličan klonogeni potencijal KS-MMĆ, MT-MMĆ, MMĆ izolovanih iz krvi pupčanika (KP-MMĆ) i placente (P-MMĆ) primetili su Heo i saradnici (Heo et al., 2016), mada podaci drugih istraživača pokazuju da najveću sposobnost formiranja CFU-F kolonija imaju KP-MMĆ, zatim KS-MMĆ, dok je klonogeni kapacitet MT-MMĆ najmanji (Jin et al., 2013). Takođe, primećena je veća sposobnost proliferacije KP-MMĆ u poređenju sa KS-MMĆ i MT-MMĆ (Amable et al., 2014), kao i mogućnost kultivisanja KP-MMĆ tokom većeg broja pasaža uz najmanje primetno ćelijsko starenje (Jin et al., 2013). Sa druge strane, u pojedinim istraživanjima zapaženo je da P-MMĆ mogu da se kultiviraju *in vitro* tokom dužeg perioda nego KS-MMĆ, MT-MMĆ i KP-MMĆ, ali i da KS-MMĆ i KP-MMĆ imaju veću sposobnost samoobnavljanja (Heo et al., 2016). I po pitanju multilinijske diferencijacije postoje različiti podaci. Iako je u pojedinim istraživanjima primećen sličan potencijal za multilinijsku diferencijaciju KS-MMĆ, MT-MMĆ i KP-MMĆ (Jin et al., 2013), rezultati drugih istraživačkih grupa ukazuju da KS-MMĆ i MT-MMĆ imaju veću tendenciju ka formiranju osteoblasta nego KP-MMĆ, a primećen je i slab potencijal adipogene diferencijacije KP-MMĆ (Kern et al., 2006; Heo et al., 2016). Sa druge strane, pokazano je da KP-MMĆ imaju izražen potencijal za hondrogenu diferencijaciju (Zhang et al., 2018), kao i da prilikom indukcije diferencijacije u neurone daju veći procenat neuron-specifičnih ćelija pozitivnih na enolazu u poređenju sa KS-MMĆ (Lu et al., 2006). MMĆ poreklom iz zubnih tkiva, poput zubne pulpe mlečnih i stalnih zuba, apikalne papile i periodoncijuma, mogu da se diferenciraju u osteoblaste, hondroците, vaskularne ćelije i funkcijski aktivne neurone (Potdar & Jethmalani, 2015). Prema pojedinim istraživačima, MT-MMĆ poseduju veći potencijal za angiogenezu i vaskulogenezu (Moseley et al., 2006), ali i veći imunomodulatorni potencijal od KS-MMĆ (Li et al., 2015). U drugim istraživanjima, tokom ko-kultivacije MMĆ sa LPS aktiviranim makrofagima, primećeno je da KP-MMĆ imaju jači anti-inflamatorni efekat nego KS-MMĆ i MT-MMĆ (Jin et al., 2013). Sa druge strane, kada su imunomodulatorna svojstva ispitivana na osnovu smanjenja proliferacije T limfocita pod uticajem različitih tipova MMĆ, pokazano je da KS-MMĆ i MT-MMĆ imaju bolja imunosupresivna svojstva nego KP-MMĆ i P-MMĆ (Heo et al., 2016). Navedeni podaci ukazuju na veliku varijabilnost u rezultatima, koja može biti posledica kako heterogenosti ćelijskih izvora tako i različitih uslova kultivacije, te je stoga primećene razlike potrebno detaljnije ispitati u standardizovanim okolnostima. Takođe, istraživanja specifičnih niša koje MMĆ nastanjuju u okviru različitih tkiva i organa može doprineti boljem razumevanju uočenih funkcijskih različitosti ovih ćelija.

1.5.3.2. Uticaj uzrasta davaoca na svojstva KS-MMĆ

Prema podacima u literaturi, karakteristike MMĆ mogu zavistiti od uzrasta davaoca. Najčešće upoređivani parametri na osnovu kojih se u istraživanjima procenjuje uticaj uzrasta davaoca na karakteristike MMĆ su potencijal proliferacije, sposobnost formiranja CFU-F kolonija, dužina telomera i potencijal diferencijacije u tri ćelijske loze (Boyette & Taun, 2014; Baker et al., 2015).

Većina istraživača ustanovila je da KS-MMĆ mlađih davalaca imaju veći potencijal proliferacije u odnosu na KS-MMĆ starijih davalaca (Oreffo, Bennett, et al., 1998; Oreffo, Bord, et al. 1998; D'Ippolito et al., 1999; Stenderup et al., 2001; Stenderup et al., 2003; Baxter et al., 2004; Mareschi et al., 2006; Stolzing et al., 2008; Dexheimer et al., 2011; Zaim et al., 2012; Mohd Ali et al., 2016; X. Chen et al., 2019). Ipak, prema pojedinim studijama razlike u potencijalu proliferacije između mlađih i starijih davaoca nisu bile uočljive (Wanger et al., 2009; Choumerianou et al., 2010; Lund et al., 2010; Siegel et al., 2013).

Kada je analizirana i upoređivana sposobnost KS-MMĆ da formiraju CFU-F kolonije, pojedine studije su ukazale na to da je sposobnost formiranja CFU-F kolonija kod starijih donora smanjena (Baxter et al., 2004; Stolzing et al., 2008; Choumerianou et al., 2010; Lund et al., 2010), dok drugi istraživači nisu primetili razlike u klonogenom potencijalu KS-MMĆ povezane sa uzrastom donora (Orreffo, Bennett, et al., 1998; Oreffo, Bord, et al., 1998; Stenderup et al., 2001; Wagner et al., 2009; Dexheimer et al., 2011; Siegel et al., 2013; Selle et al., 2022).

Slično se u literaturi mogu naći različiti podaci vezani za povezanost uzrasta davaoca i sposobnost KS-MMĆ za diferencijaciju u osteogenom, adipogenom i hondrogenom pravcu. Mada rezultati pojedinih studija ukazuju na to da uzrast davaoca ne utiče na adipogenezu (Majors et al., 1997; Stenderup et al., 2003; Wagner et al., 2009; Dexheimer et al., 2011; Siegel et al., 2013; Andrzejewska, Catar, et al., 2019), nakon eksperimenata izvedenih u drugim studijama primećeno je da veću sposobnost za adipogenu diferencijaciju imaju KS-MMĆ mlađih davalaca (Baxter et al., 2004; Stolzing et al., 2008; Zaim et al., 2012; Mohd Ali et al., 2016). Pored toga, deo istraživanja usmerenih na poređenje osteogenog potencijala KS-MMĆ ukazao je na odsustvo razlika između davalaca različitog uzrasta (Orreffo, Bennett, et al., 1998; Oreffo, Bord, et al., 1998; Stenderup et al., 2001; Stenderup et al., 2003; Wagner et al., 2009; Dexheimer et al., 2011; Siegel et al., 2013; Andrzejewska, Catar, et al., 2019; Selle et al., 2022), dok su rezultati drugih autora ukazali da KS-MMĆ mlađih davalaca imaju veći potencijal za diferencijaciju u osteogenom pravcu (Majors et al., 1997; D'Ippolito et al., 1999; Nishida et al., 1999; Baxter et al., 2004; Stolzing et al., 2008; Zaim et al., 2012; Mohd Ali et al., 2016; X. Chen et al., 2019). Manji broj studija poredio je kapacitet diferencijacije KS-MMĆ u hondrogenom pravcu pri čemu nije uočena korelacija između starosti davalaca i hondrogenog potencijala diferencijacije (Wagner et al., 2009; Dexheimer et al., 2011; Zaim et al., 2012; Siegel et al., 2013; Andrzejewska, Catar, et al., 2019; Selle et al., 2022). Nasuprot tome, u jednoj studiji primećena je smanjena sposobnost hondrogeneze kod KS-MMĆ starijih davalaca (Stolzing et al., 2008).

Osim toga, istraživači su primetili da u zavisnosti od uzrasta davaoca KS-MMĆ mogu imati različitu morfologiju. Naime, istraživanja Stolzing i saradnika su pokazala da su KS-MMĆ starijih davalaca veće i „zaobljenije“ nego KS-MMĆ mlađih davalaca (Stolzing et al., 2008), a poligonalan oblik KS-MMĆ starijih davalaca primetili su Ali i saradnici (Mohd Ali et al., 2016). Iako uloga citoskeleta u starenju MMĆ još uvek nije dovoljno ispitana, smatra se da zapažene razlike u morfologiji mogu biti posledica promene strukture citoskeleta (Lin et al., 2018).

Glavni izvor reaktivnih vrsta kiseonika (ROS) u ćelijama su mitohondrije, a tokom starenja dolazi do funkcijskih promena ovih organela. Tako je kod KS-MMĆ starijih davalaca zapažen povišen nivo ROS, kao i snižen nivo aktivnosti NAD zavisne deacetilaze SIRT-3 i superoksid dismutaze (SOD) u poređenju sa MMĆ mlađih davalaca (Stolzin et al., 2008; Brown et al., 2013; X. Chen et al., 2019). Oksidativni stres može indukovati smanjenje aktivnosti telomerase i na taj način uzrokovati skraćivanje telomera (Barnes et al., 2019), što bi moglo biti jedno od obrazloženja za smanjenje dužine telomera KS-MMĆ starijih davalaca koje je primećeno u pojedinim istraživanjima (Baxter et al., 2004; Choumerianou et al., 2010). Kako u studijama drugih istraživača nije uočena korelacija između dužine telomera i uzrasta davaoca (Stenderup et al., 2003; Wagner et al., 2009; Lund et al., 2010) potrebno je sprovesti dodatna ispitivanja. Poznato je da povišen nivo ROS može uzrokovati oštećenja DNK, što dovodi do pokretanja ćelijskog odgovora na oštećenja, pri čemu može doći do zastoja u ćelijskom ciklusu, odnosno do senescencije (ćelijskog starenja) (Passos et al., 2010). Neke od posledica odgovora na oštećenja DNK mogu biti translokacija p53 u jedro,

povećanje sinteze p21 i fosforilacija retinoblastoma proteina (Rb) (Borodkina et al., 2014). Pored oštećenja DNK, ROS takođe mogu dovesti i do epigenetičkih modifikacija, odnosno mogu indukovati metilaciju DNK i acetilaciju histona (Yang et al., 2015). Prema rezultatima eksperimenata u kojima su Stolzing i saradnici koristili vodonik peroksid (H_2O_2), KS-MMĆ starijih davalaca osetljivije su na ROS nego KS-MMĆ mlađih davalaca (Stolzing et al., 2008).

Navedeni podaci ukazuju na različite rezultate i zaključke istraživačkih grupa koje su ispitivale uticaj uzrasta davalaca na karakteristike KS-MMĆ. Neki od razloga za drugačije podatke koji se pronalaze u literaturi mogu biti posledica primene različitih metoda za izolaciju i kultivaciju ćelija, kao i razlika u broju ispitanika i drugačijim kriterijumima za definisanje grupe mladih i starih davalaca. Za bolje razumevanje uticaja uzrasta davalaca na svojstva i funkcije KS-MMĆ neophodno je standardizovati metode koje se koriste, kao i kriterijume za formiranje starosnih grupa.

1.5.3.3. Uticaj dugotrajne kultivacije na heterogenost KS-MMĆ

Zbog niske zastupljenosti u KS (0,01-0,001%), njihove heterogenosti i nepostojanja specifičnih markera na osnovu kojih bi prečišćena populacija KS-MMĆ mogla biti izolovana, kultivacija i ekspanzija ovih ćelija *in vitro* predstavljaju neophodan korak koji prethodi sprovođenju naučnih ispitivanja i potencijalnoj terapijskoj primeni (Chu et al., 2020). Da bi se rezultati različitih istraživača vezani za strukturne i funkcijske karakteristike KS-MMĆ mogli porediti, kao i zbog potencijalne primene ovih ćelija u terapiji, veoma je važno razumeti uticaj koji dugotrajna kultivacija ima na osobine KS-MMĆ.

Iako se u literaturi mogu naći različiti podaci vezani za ćelijsko starenje (senescenciju), nesumnjivo je da ovaj proces predstavlja jedan od najvažnijih problema koji se može javiti pri dugotrajnoj kultivaciji MMĆ *in vitro* (Li et al., 2017). Kultivacija KS-MMĆ, kao i gajenje u kulturi bilo koje druge vrste ćelija, ima svoja ograničenja. Nakon određenog broja ćelijskih deoba MMĆ podležu senescenciji i prestaju da proliferišu. Senescentne ćelije nisu mrtve i mogu se održavati u ovom neproliferišućem stanju mesecima (Wagner et al., 2010; Soto-Gamez et al., 2019).

Pretpostavlja se da mehanizmi uključeni u proces senescencije podrazumevaju nagomilavanje oštećenja DNK, akumulaciju inhibitora ciklin-zavisne kinase p16INK4a i oksidativni stres. Moguće je i da je skraćivanje telomera ili promena njihove strukture jedan od okidača senescencije. Smatra se da skraćivanje telomera može predstavljati neku vrstu „unutrašnjeg sata“, s obzirom na to da do njihovog skraćivanja dolazi prilikom svake ćelijske deobe (Wagner et al., 2010; Matsuyama et al., 2020). Geißler i saradnici su utvrdili da se tokom dugotrajne kultivacije *in vitro* smanjuje replikatavni kapacitet mišjih KS-MMĆ, što je u korelaciji sa nivoom skraćivanja telomera (Geißler et al., 2012). Pored toga, pokazano je da se telomere humanih KS-MMĆ skraćuju za otprilike 1 kB nakon približno desetostrukog dupliranja populacije (10 PD) što dovodi do smanjenog kapaciteta za proliferaciju i zaustavljanja ćelijskog ciklusa ili pokretanja apoptoze (Baxter et al., 2004; Alves et al., 2010). Ipak, još uvek se ne može sa sigurnošću reći da li je skraćivanje telomera uzrok senescencije ili pak posledica ovog procesa (Wagner et al., 2010).

Pri umnožavanju *in vitro* primećuju se i promene ćelijskog ciklusa KS-MMĆ. Sa povećanjem broja pasaža povećava se i broj KS-MMĆ koje se nalaze u S fazi ćelijskog ciklusa (Izadpanah et al., 2008). Kinetika rasta KS-MMĆ se smanjuje tokom dugotrajne kultivacije, dok se nivo β galaktozidaze povezane sa senescencijom (lizozomalna pH6 β -galaktozidaza, SA- β -gal) konstantno povećava (Li et al., 2012; Neri, 2019). Fenotipske promene koje se uočavaju u senescentim KS-MMĆ mogu biti povezane sa biološkom aktivnošću

lizofosfatidne kiseline (LPA), koja je veoma važna za sintezu membranskih fosfolipida (Kanehira et al., 2012; Turinetti et al., 2016).

Prema mišljenju mnogih istraživača, broj ćelijskih pasaža može se koristiti kao indikator starosti ćelija. Pasažiranje ili subkultivacija ćelija je uobičajena procedura kojom se ćelije umnožavaju i održavaju u dugotrajnim kulturama *in vitro*, podelom i presađivanjem dela ćelijske populacije u nove kulture ćelija čime se obezbeđuje njihova dalja ekspanzija. Ovaj podatak može biti veoma koristan za poređenje rezultata jedne laboratorije koja radi po visoko standardizovanim procedurama. Broj pasaža se može lako pratiti, pri čemu nije neophodno određivati broj ćelija. Ipak, jedan od nedostataka ovakvog načina procenjivanja starosti populacije jeste to što konfluentnost inicijalno zasejanih ćelija utiče na to koliko često će ćelije biti pasažirane (Wagner et al., 2010; Kusena et al., 2021). Smatra se da zbog toga broj udvostručavanja populacije (eng. *population doublings*, PD) može biti bolji parameter za procenu starosti ćelija. Za izračunavanje PD koristi se sledeća jednačina (Cristofalo et al., 1998):

$$N_H/N_1=2^X \text{ odnosno } [\log_{10}(N_H) - \log_{10}(N_1)]/\log_{10}(2) = X$$

N_H - broj ćelija koji se izbroji u datoj pasaži nakon umnožavanja (eng. *inoculum number*); N_1 - broj zasejanih ćelija; X - PD.

Iako je ovaj metod procene starosti populacije precizniji, takođe ima svoje nedostatke. Na ovaj način određuje se samo kumulativni broj ćelijskih deoba cele populacije u kulturi, a ne pojedinačnih ćelija. Prilikom svakog pasažiranja deo ćelija može biti „izgubljen“ tokom koraka ispiranja, a to utiče na računanje krive rasta. Takođe, primećeno je da i pri standardizovanim uslovima kultivacije postoje značajne razlike između dugotrajnih kriva rasta ćelija različitih davalaca. Zbog svega navedenog, teško je proceniti da li je populacija ćelija koja je prošla kroz 10 PD u kulturi još uvek „mlada“ ili se ćelije nalaze u stanju senescencije (Wagner et al., 2010). Procena aktivnosti SA- β -gal smatra se „zlatnim standardom“ za procenu nivoa senescencije, a bazira se na detekciji aktivnosti ovog enzima citohemijskim/histohemijskim ili metodima koji se zasnivaju na fluorescentnom obeležavanju (Liu et al., 2020). Pokazano je da je ovaj enzim aktivan samo u humanim senescentnim fibroblastima, a ne i u mirujućim, presenescentnim ili diferenciranim ćelijama (Dimri et al., 1995). Ovaj metod se može primeniti i na MMC (Wagner et al., 2008; Liu et al., 2020). Ipak, procena aktivnosti SA- β -gal ne olakšava apsolutnu kvantifikaciju stanja ćelijskog starenja. Bolje razumevanje samog procesa je potrebno da bi se ustanovio adekvatniji metod za procenu senescencije (Wagner et al., 2010).

Poređenje rezultata različitih istraživanja koja su izvođena pri dugotrajnoj kultivaciji MMC *in vitro* je otežano zbog mogućeg uticaja brojnih faktora (Wagner et al., 2010). Naime, teško je izolovati homogenu populaciju MMC zbog velike heterogenosti ovih ćelija čak i u okviru iste populacije (McLeod & Mauck, 2017). Tokom dugotrajne *in vitro* ekspanzije subpopulacija brzoproliferišućih MMC neizbežno postaje dominantna. Razlike u načinima izolacije i medijumima koji se koriste mogu favorizovati umnožavanje pojedinih, različitih subpopulacija ćelija, što otežava poređenje rezultata (Wagner & Ho, 2007; Schallmoser et al., 2008; Costa et al., 2021).

Osim toga, prilikom umnožavanja ćelija može doći do mutacija. Veštačka sredina ne pruža dobru zaštitu od toksičnih agenasa kao što je visoka koncentracija kiseonika ili UV zračenje. Zbog toga je verovatnoća da kod MMC koje se gaje u kulturi dođe do oštećenja DNK ili pojave mutacija veća nego kod MMC *in vivo*. Najverovatnije većina oštećenja dovodi do neadekvatnog procesa proliferacije, pa takve ćelije bivaju eliminisane iz kulture.

Mutacije DNK mogu u pojedinim slučajevima i pozitivno uticati na proliferaciju, što bi dovelo do toga da takve ćelije postaju „vodeći” članovi populacije, ali se mora imati u vidu da mutacije mogu dovesti i do maligne transformacije ćelije (Wagner et al., 2010; Kim et al., 2017).

Gajenje KS-MMĆ u kulturi može uticati na njihovu sposobnost samoobnavljanja i proliferacije. Samoobnavljanje matičnih ćelija *in vivo* regulisano je njihovom ćelijskom nišom, te je sposobnost samoobnavljanja MMĆ u kulturi izmenjena usled veštačkih uslova (gajenje na plastici i u monosloju). Colter i saradnici su pokazali da klonovi MMĆ koji potiču od jedne ćelije mogu da prođu i do 50 PD tokom 10 nedelja, ako se pasažiraju češće, odnosno pri manjoj gustini ćelija. S druge strane, ćelije su prestajale da se dele posle 15 pasaža, ako su se pasažirale kada dostignu konfluentnost, odnosno kada prekriju celu površinu plastičnog suda za kulturu ćelija (Colter et al., 2000). Drugi istraživači ukazuju na to da niže koncentracije kiseonika u kulturi mogu pozitivno uticati na maksimalan broj PD (Fehrer et al., 2007; Widowati et al., 2017). Iako prema pojedinim rezultatima upotreba lizata humanih trombocita umesto goveđeg seruma povećava broj PD (Schallmoser et al., 2010), podaci koji se mogu naći u literaturi po ovom pitanju su varijabilni (Guiotto et al., 2020). Iz navedenog se može zaključiti da različiti uslovi kultivacije utiču na senescenciju, te da do ovog procesa ne dolazi uvek nakon tačno određenog broja ćelijskih deoba (Wagner et al., 2010).

Broj ćelijskih deoba je ograničen Hejflikovom granicom (eng. *Hayflick limit*) kojom se označava ograničen broj ćelijskih deoba pre nastupanja ćelijske smrti. Smatra se da je broj ćelijskih deoba pri kultivaciji *in vitro* ograničen na 50-60, što zavisi od karakteristika samih ćelija. Međutim, kao što je napomenuto, maksimalan broj PD zavisi i od uslova kultivacije. Gubitak proliferacije se ne dešava simultano u kulturi, a pojedine ćelije imaju morfologiju koja je tipična za senescentne ćelije i pozitivno se boje na SA- β -gal još tokom ranih pasaža (Stendrup et al., 2003). Dakle, moguće je da se mehanizam koji pokreće senescenciju okida na stohastički način, kao i da na njega utiče različit broj deoba kroz koje su pojedine MMĆ prošle pre trenutka izolacije (Wagner et al., 2010; Schmeer et al., 2019).

Pored toga, starost samog organizma i senescencija mogu biti povezani. Od otkrića Hejflikove granice spekulise se da senescencija ima ulogu u starenju čitavog organizma. Pojedine studije su pokazale da postoji negativna korelacija između godina davanja i sposobnosti ćelija za umnožavanje tokom kultivacije, kako za fibroblaste tako i za KS-MMĆ (Stenderup et al. 2003; Mareschi et al., 2006; Mohd Ali et al., 2016; Zupan et al., 2021). Zhou i saradnici su pokazali da je broj ćelija koje su pozitivne na SA- β -gal značajno veći u uzorcima KS-MMĆ starijih davalaca u poređenju sa KS-MMĆ mlađih davalaca (Zhou et al., 2008; X. Chen et al., 2019). Rezultati pojedinih istraživanja ukazuju na to da su neki od gena čija je ekspresija povišena tokom dugotrajne kultivacije *in vitro* (gen *SNAPC5* (eng. small nuclear RNA activating complex polypeptide 5), gen *CRIP1* (eng. cysteine rich protein 1), gen *SULT1A3* (eng. sulfotransferase family 1A member 3) takođe eksprimirani u višem nivou i kod starijih osoba (Wagner et al., 2009).

Brojne studije u kojima su ispitivani efekti dugotrajne kultivacije na osobine KS-MMĆ ukazale su na promene njihovih fenotipskih karakteristika, kao i funkcijskih osobina, uključujući njihov diferencijacioni i modulatorni potencijal. Naime, zapaženo je da tokom dugotrajne kultivacije KS-MMĆ može doći do promene u nivou ekspresije površinskih markera. Iako se i tokom kasnijih pasaža primećuje ekspresija svih markera karakterističnih za MMĆ, utvrđen je viši nivo njihove ekspresije tokom ranih pasaža (Wagner et al., 2008; Wang et al., 2021). Prema rezultatima mnogih istraživača, MMĆ izolovane iz KS gube svoj potencijal za diferencijaciju tokom gajenja u kulturi (Baxter et al., 2004; Bonab et al., 2006; Stolzing et al., 2008; Wang et al., 2021). Banfi i saradnici su analizirali potencijal

diferencijacije ovih ćelija u svakoj pasaži koristeći odgovarajući medijum za indukciju diferencijacije i boje za detekciju diferencijacije uključujući alizarin crveno, alkalni plavo ili sudan crno, kao i imunocitohemijsku detekciju osteokalcina i kolagena II. Prema njihovim rezultatima, KS-MMĆ u kulturi postepeno gube svojstva progenitorskih ćelija (Banfi et al., 2000). Postoje dokazi da ćelijsko starenje naročito smanjuje potencijal za diferencijaciju u adipogenom pravcu (Wagner et al., 2008). S druge strane, prema rezultatima pojedinih istraživača potencijal za osteogenu diferencijaciju u kasnim pasažama je zadržan ili čak povećan (Wagner et al., 2008). Studija Li i saradnika je ukazala na to da KS-MMĆ u standardnim uslovima kultivacije podležu spontanoj diferencijaciji u osteoblaste (Li et al., 2011). Sa druge strane, rezultati Yang i saradnika ukazuju da potencijal za adipogenu diferencijaciju KS-MMĆ ostaje očuvan tokom dužeg perioda kultivacije nego njihov osteogeni potencijal (Yang et al., 2018). Gajenje u kulturi ostavlja posledice na funkcijske osobine MMĆ koje mogu biti od značaja za njihovu terapijsku primenu uključujući njihove imunomodulatorne sposobnosti. Pokazano je da MMĆ u kasnijim pasažama imaju redukovani inhibicioni efekat na proliferaciju monojedarnih ćelija periferne krvi (Lin et al., 2018), a utvrđeno je da dugotrajna kultivacija dovodi i do promena MMĆ u pogledu njihove uloge u održavanju procesa hematopoeze. Naime, prema istraživanjima Walenda i saradnika, MMĆ iz kasnijih pasaža stimulišu proliferaciju hematopoetskih progenitora (HP), ali MMĆ iz ranijih pasaža pospešuju održavanje primitivnog fenotipa HP (CD34⁺, CD133⁺, CD38⁻) tokom većeg broja ćelijskih deoba. Stoga je zaključeno da MMĆ iz ranijih pasaža utiču na povećanje broja i procenta samoobnavljajuće populacije HP, te je kokultivacija sa njima pogodnija za umnožavanje primitivnih HP (Walenda et al., 2010).

Prilikom dugotrajne kultivacije KS-MMĆ, takođe je važno imati u vidu da se ćelije u kulturi najčešće nalaze u stanju visoke proliferacije pod nefiziološkim uslovima. Kao što je prethodno navedeno, zbog toga može doći do akumulacije oštećenja DNK, usled čega dolazi do zastoja u ćelijskom ciklusu, pa čak eventualno i do maligne transformacije. Mnoge studije su pokazale da su naročito MMĆ miševa i pacova podložne malignim transformacijama prilikom gajenja u kulturi (Foudah et al., 2009; Josse et al., 2010). Izgleda da je „beg od senescencije“ ključni korak za malignu transformaciju, a primećeno je da transformisane MMĆ mogu zadržati sposobnost diferencijacije u osteogenom, adipogenom i hondrogenom pravcu (Foudah et al., 2009). Međutim, izgleda da spontana *ex vivo* transformacija humanih MMĆ predstavlja redak slučaj. Mnogi istraživači nisu primetili bilo kakve citogenetske abnormalnosti tokom višemesečne kultivacije ovih ćelija (Aguilar et al., 2007; Bernardo et al., 2007; Zhang et al., 2007; Schallmoser et al., 2010; Lukomska et al., 2019). Primećeno je da humane ćelije zahtevaju više genetičkih promena da bi došlo do neoplastične transformacije nego što je slučaj sa ćelijama glodara, čime se objašnjava ovo odstupanje (Wagner et al., 2010). Prema podacima dostupnim u literaturi, u kliničkim studijama u kojima se koriste humane MMĆ nije primećeno formiranja tumora (Lin et al., 2018). Iako se humane MMĆ generalno ne transformišu tokom pažljive kultivacije (Miura et al., 2006), postoje i podaci o tome da MMĆ iz KS mogu biti podložne spontanoj transformaciji prilikom dužeg gajenja u kulturi (5-106 nedelja) (Rosland et al., 2009). Takođe, Pan i saradnici su pokazali da su humane MMĆ izolovane iz KS i jetre kultivisane duže od pet nedelja podlegale spontanoj transformaciji (u 4 od 46 uzoraka) i da su indukovale nastanak tumora nalik sarkomu nakon transplantacije imunodeficientnim miševima (Pan et al., 2014). Iz toga sledi da još nije sa sigurnošću utvrđeno da li KS-MMĆ podležu spontanoj transformaciji prilikom dugotrajne kultivacije (Lin et al., 2018). Zbog mogućih transformacija, bilo bi poželjno da se za terapijsku primenu koriste ćelije u ranim pasažama,

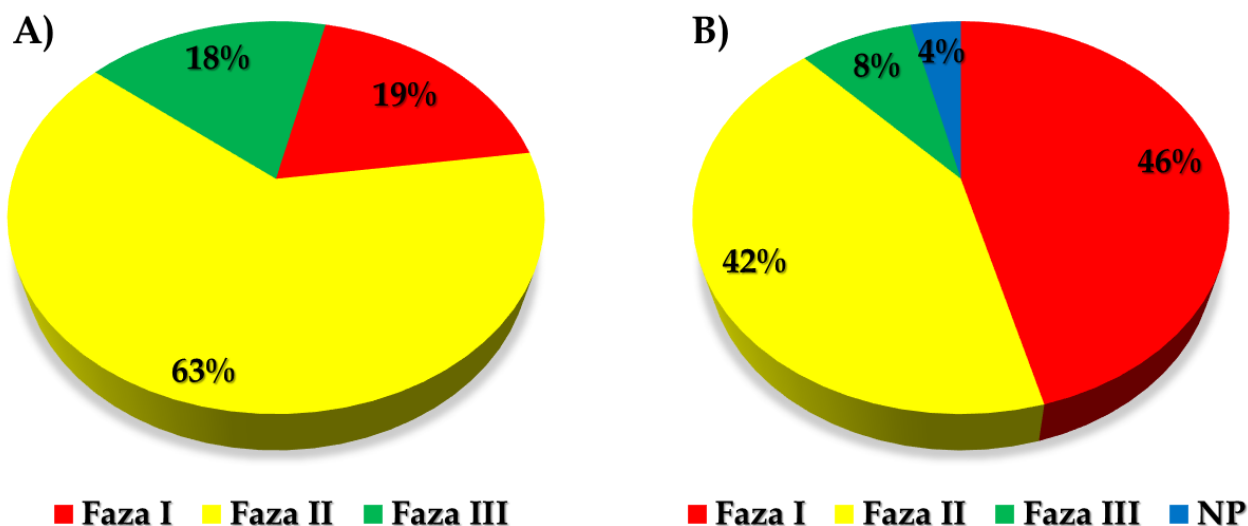
kao i da se vrši kontrola kvaliteta, na primer kroz analizu kariotipa ćelija neposredno pre primene (Wagner et al., 2010; Neri et al., 2019).

Poslednje decenije brojne studije se fokusiraju na „produžavanje života“ MMC kultivisanih *in vitro*. Mogu se uočiti dve glavne strategije – optimizacija uslova za gajenje u kulturi i modifikovanje ključnih signalnih puteva (primenom hemijskih inhibitora/aktivatora ili genetičkim inženjeringom) (Boyette & Tuan, 2014). Ispitivanja u kojima se utvrđuje potencijal različitih supstanci kojima se MMC mogu tretirati kako bi se podstakle njihove sposobnosti proliferacije i diferencijacije i usporio proces ćelijskog starenja imaju veliki značaj kako za naučna istraživanja, tako i za različite oblasti medicine.

1.5.4. KS-MMC u prekliničkim i kliničkim studijama

Od 1995. godine, kada je sprovedeno prvo kliničko ispitivanje za procenu efikasnosti i bezbednosti terapije hematoloških maligniteta zasnovane na MMC (Lazarus et al., 1995), ove ćelije su se našle u centru proučavanja kao potencijalni kandidati za ćelijsku terapiju. Saznanja da se MMC mogu označiti kao imuno-privilegovane zbog niskog nivoa ekspresije sistema humanih leukocitnih antigena klase I (eng. *Human Leukocyte Antigen system I*, HLA-I) i odsustva ekspresije sistema humanih leukocitnih antigena klase II (HLA-II) i ko-stimulatornih faktora CD40, CD80 i CD86 (Ullah et al., 2015), ukazala su na mogućnost terapijske primene alogernih KS-MMC. Istraživanja su utvrdila da je rizik za odbacivanje alogernih KS-MMC od strane primaoca nizak i da nakon transplantacije ne dolazi do produkcije anti-alogenih antitela, kao ni do regrutovanja T-limfocita (eng. *T-cell priming*) (Ullah et al., 2015). Bezbedna primena alogernih MMC značajna je s obzirom da otvara mogućnost formiranja banaka za čuvanje MMC, gde bi adekvatno izolovani, obrađeni i zamrznuti uzorci MMC mogli biti dostupni čim se ukaže potreba za njihovom potencijalnom primenom. Na ovaj način bi se mogla obezbediti adekvatna terapija, čak i za bolesnike kod kojih nije moguća upotreba autolognih MMC. U tom kontekstu, od velikog je značaja detektovati intra-donorske razlike koje bi mogle doprineti donošenju odluke o izboru adekvatnog uzorka za potencijalnu terapijsku primenu, posebno imajući u vidu heterogenost svojstava MMC.

Brojne su prekliničke i kliničke studije u kojima se autologne ili alogene KS-MMC koriste radi poboljšanja rekonstrukcije hematopoetskog i imunskog sistema, povećanja uspešnosti prihvatanja kalema, lečenja bolesti kalem protiv domaćina u slučaju transplantacije MČH i pojedinih kardiovaskularnih i neurodegenerativnih oboljenja, kao i rekonstrukcije koštanog sistema (Ullah et al., 2015; Sheykhhasan, 2017; Andrzejewska, Lukomska, et al., 2019; Chu et al., 2020). Ipak, većina ovih studija i dalje se nalazi u prvoj ili drugoj fazi kliničkog ispitivanja (Slika 8). Podaci o kliničkim studijama koje su završene ili su u toku mogu se naći na zvaničnim sajtovima <https://www.clinicaltrials.gov> i <https://www.clinicaltrialsregister.eu/>.



Slika 8. Podaci o kliničkim studijama u različitim fazama kliničkih ispitivanja. A) Podaci sa sajta <https://www.clinicaltrialsregister.eu/> kada se kao ključna reč pretraži pojam „Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells“, B) Podaci sa sajta <https://www.clinicaltrials.gov> kada se pretraži pojam „BM-MSC“. Faza I – U ovoj fazi se testira bezbednost tretmana na malom broju pacijenata i ponekad procenjuje adekvatna doza koju treba primeniti; Faza II – U drugoj fazi se dalje prati bezbednost na većem broju pacijenata koji primaju terapiju i utvrđuje da li su odgovori na terapiju povoljni ili korisni; Faza III – U ovoj fazi glavni cilj je dokazati da tretman daje željeni rezultat i da je bezbedan u još većoj grupi pacijenata. Treća faza obično traje najduže; NP – nije primenljivo, istraživači nisu naveli u kojoj fazi se nalazi njihova studija.

Već dugi niz godina ispituje se mogućnost primene KS-MMĆ za lečenje pojedinih bolesti imunskog sistema, uključujući bolest kalem protiv domaćina (eng. *Graft versus Host Disease*, GvHD), sistemski eritemski lupus (eng. *Systemic lupus erythematosus*, SLE) i reumatoidni artritis (RA). Međucelijskim kontaktima i produkcijom solubilnih faktora KS-MMĆ mogu inhibirati migraciju ćelija imunskog sistema, njihovu proliferaciju, diferencijaciju i aktivaciju i na taj način suprimirati imunski odgovor (M. Wang et al., 2018). Naime, bolest kalem protiv domaćina može nastati kao „sekundarna bolest“ prilikom alogene transplantacije matičnih ćelija hematopoeze (TMĆH). Sredinom 20. veka dokazano je da su T limfociti odgovorni za nastanak ove bolesti, a da su tkiva i organi koje GvHD najčešće zahvata koža, jetra, creva i limfoidni organi (Vujić i sar., 2012). Za lečenje GvHD kao prva linija terapije primenjuju se kortikosteroidi. Meta-analiza koju su nedavno sprovedeli Zhao i saradnici pokazala je da, u slučaju primene KS-MMĆ neposredno nakon TMĆH, može doći do značajne redukcije incidence hroničnog oblika GvHD, dok smanjenje stope akutnog oblika GvHD u ovoj studiji nije primećeno (Zhao et al., 2019). Pored toga, Zhang i saradnici su u nedavnoj prekliničkoj studiji sprovedenoj na miševima pokazali da KS-MMĆ imaju veći potencijal da redukuju simptome RA nego MMĆ koje su izolovane iz zubne pulpe mlečnih zubaili. KS-MMĆ su smanjile eroziju kostiju, snizile nivo TNF- α i IL-1 β u serumu i zglobovima, čime su sveukupno poboljšale inflamatorni status kod miševa sa RA (Zhang et al., 2019). Randomizovano, trostruko-slepo ispitivanje na 30 pacijenata (u placebo grupi 15, u grupi koja je primila KS-MMĆ takođe 15 pacijenata) pokazalo je poboljšanje kod pacijenata sa RA nakon tretmana sa KS-MMĆ. Naime, pacijenti su posle ovog tretmana mogli duže da stoje i šetaju bez pojave bola, međutim uočeni efekti terapije su se izgubili nakon 12 meseci (Shadmanfar et al., 2018). U drugim studijama je pokazano da primena KS-MMĆ može imati koristan efekat kod pacijenata obolelih od SLE, s obzirom da je primećeno da KS-MMĆ doprinose poboljšanju vrednosti indeksa aktivnosti SLE (eng. *SLE Disease*

Activity Index, SLEADI), krvne slike, kao i da mogu povećavati stopu preživljavanja (Wang, Zhang, et al., 2018; Wen et al., 2019).

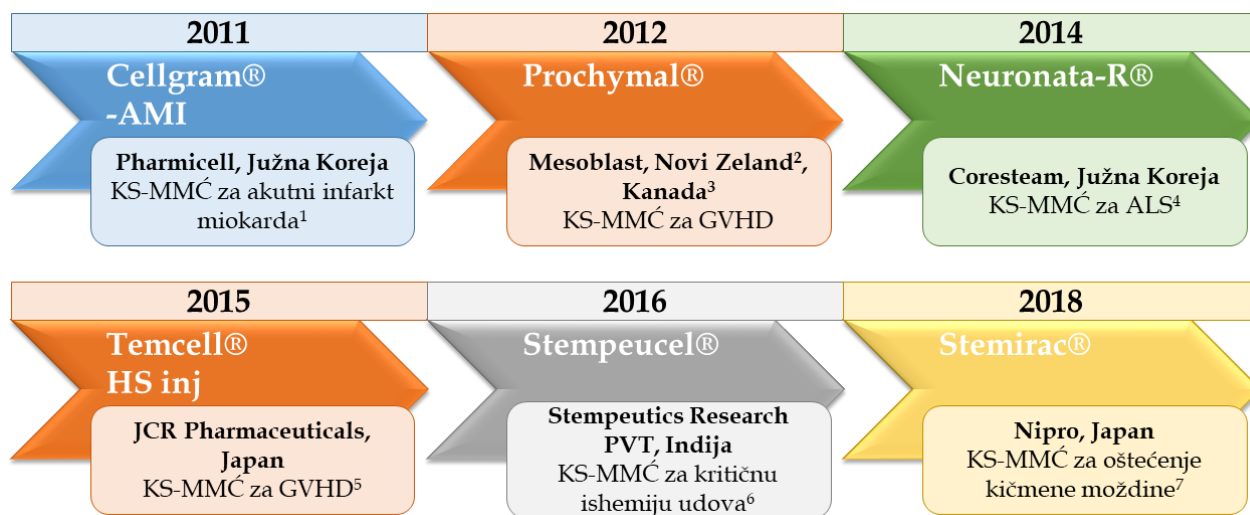
Istraživanja sprovedena tokom prethodnih godina ukazuju da KS-MMĆ mogu imati potencijalnu primenu za lečenje neurodegenerativnih oboljenja, zbog svojih imunomodulatornih sposobnosti, mogućnosti diferencijacije u neurone i parakrinog uticaja na proliferaciju, angiogenezu i vaskularizaciju tkiva. U prekliničkoj studiji koju su Sun i saradnici sprovedeli na pacovima pokazano je da intranazalna infuzija KS-MMĆ može imati neuro-regenerativni uticaj i poboljšati neurološke funkcije nakon intracerebralnog hemoragičnog šloga. U ovoj studiji je ustanovljeno da KS-MMĆ imaju sposobnost da „zaštite“ neurone i da stimulišu proliferaciju i diferencijaciju progenitorskih ćelija u neurone produkcijom bioaktivnih faktora koji imaju anti-inflamatorna svojstva i mogu biti od pomoći u slučaju oboljenja centralnog i perifernog nervnog sistema, uključujući VEGF, bFGF, GDNF (od eng. *Glial-derived Neurotrophic Factor*), EGF (od engl. *Epidermal Growth Factor*) i BDNF (od eng. *Brain-derived Neurotrophic Factor*) (Sun et al., 2015). Pored toga, kliničke studije u fazi I/II ukazuju na bezbednost primene KS-MMĆ kod pacijenata obolelih od amiotrofične lateralne skleroze (Oh et al., 2015; Syková et al., 2017). Rezultati studije sprovedene na 10 pacijenata obolelih od multiple skleroze ukazuju na mogućnost poboljšanja kliničke slike pacijenata obolelih od ove bolesti nakon terapije sa KS-MMĆ, na osnovu procene različitih parametara EDSS (eng. *Expanded Disability Scale Score*) i MSFC (eng. *Multiple Sclerosis Functional Composite*) skorova. Međutim, uprkos kliničkom poboljšanju ili stabilizaciji, magnetnom rezonantnom tomografijom (eng. *Magnetic Resonance Imaging*, MRI) uočena je progresija bolesti kod većine pacijenata (Yamout et al., 2010). Takođe je nedavna studija u fazi I/II pokazala bezbednost i efikasnost tretmana zasnovanog na intravenskoj primeni KS-MMĆ u jednoj dozi kod obolelih od multiple skleroze (Uccelli et al., 2019). Pojedine studije takođe su pokazale da KS-MMĆ mogu regenerisati oštećene neurone kod pacijenata obolelih od Parkinsonove bolesti (Kitada & Dezawa, 2012; Goodarzi et al., 2015), a završena klinička studija je ukazala na poboljšanje kliničkog stanja pacijenata obolelih od Parkinsonove bolesti i nakon 36 meseci od transplantacije KS-MMĆ bez primećenih neželjenih reakcija. Subjektivno poboljšanje je primećeno za simptome kao što su izraz lica, hod i epizode „smrzavanja“, a kod 2 od 7 pacijenta značajno je smanjena doza leka (Venkataramana et al., 2010).

Zbog velikog potencijala diferencijacije u osteogenom i hondrogenom pravcu, kao i zbog parakrine sekrecije solubilih faktora, KS-MMĆ su privukle pažnju istraživača koji ispituju mogućnosti poboljšanja regeneracije kostiju i hrskavice (Abdallah et al., 2016). Pokazano je da alogene KS-MMĆ mogu biti adekvatan izvor matičnih ćelija za oporavak tkiva hrskavice (Du et al., 2016). Preklinička studija na pacovima je ukazala da transplantacija autolognih KS-MMĆ može značajno pospešiti regeneraciju kranijalne kosti (Chen et al., 2013). Rezultati drugih istraživanja pokazuju da implantacija alogenih KS-MMĆ na fibrinskim nosačima može imati pozitivan uticaj kod defekata zglobova kolena zečeva (Berninger et al., 2013). Pored prekliničkih, i kliničke studije u fazi I i II, pokazuju pozitivan terapijski efekat KS-MMĆ na regeneraciju koštanog i hrskavičavog tkiva, bez neželjenih efekata (Behnia et al., 2012; Kaigler et al., 2013; Aoyama et al., 2014; Rajan et al., 2014; Kaigler et al., 2015).

Istraživanja su ukazala da KS-MMĆ mogu uticati na poboljšanje kliničke slike i u slučaju kardiovaskularnih oboljenja. U prekliničkim studijama na pacovima i svinjama pokazano je da KS-MMĆ mogu imati pozitivan terapijski efekat u slučaju infarkta miokarda (Wang et al., 2012; Richardson et al., 2013; Zhao et al., 2014). U istraživanju koje su sprovedeli Li i saradnici primećeno je da solubilni faktori koje KS-MMĆ produkuju mogu

uticati na smanjenje oštećenja i poboljšati funkciju srčanog mišića nakon infarkta miokarda (Li et al., 2009). Kliničke studije u kojima su pacijentima sa ishemičnom kardiomiopatijom transplantirane KS-MMĆ ukazuju na poboljšanje rada srčanog mišića u slučaju ovog oboljenja (Chen et al., 2004; Ramireddy et al., 2017).

Ipak, na polju potencijalne primene KS-MMĆ za lečenje različitih bolesti još uvek postoje brojne prepreke. Do danas, samo za 6 produkata KS-MMĆ dobijene su regulatorne dozvole neophodne za terapijsku primenu, i to samo u pojedinim državama (Slika 9).



Slika 9. Prikaz produkata KS-MMĆ koji su dobili regulatorne dozvole za primenu u navedenim zemljama. Odgovarajuće informacije mogu se pronaći na sledećim linkovima:

¹Web stranica Ministarstva za bezbednost hrane i lekova Koreje,

https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m_30/view.do?seq=70957;

²uslovno odobrenje dobijeno na Novom Zelandu 2012 godine isteklo je 2016 godine, web stranica Uprave za bezbednost lekova i medicinskih uređaja Novog Zelanda,

<https://medsafe.govt.nz/regulatory/ProductDetail.asp?ID=15063>;

³uslovno odobrenje dobijeno u Kanadi 2012. godine, odobrenje izdato 2014 godine., Kanadska baza podataka o lekovima,

<https://health-products.canada.ca/dpd-bdpp/info.do?lang=en&code=87195>;

⁴Web stranica Ministarstva za bezbednost hrane i lekova Koreje,

https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m_30/view.do?seq=70956;

⁵Web stranica Agencije za farmaceutske proizvode i medicinska sredstva Japana,

<https://www.pmda.go.jp/files/000215658.pdf>;

⁶Web stranica Nature India, <https://www.natureasia.com/en/nindia/article/10.1038/nindia.2016.61>;

⁷Web stranica Agencije za farmaceutske proizvode i medicinska sredstva Japana

<https://www.pmda.go.jp/files/000231946.pdf>.

Preuzeto i modifikovano prema Zhang i sar. (Zhang et al., 2021)

Zbog izrazite heterogenosti KS-MMĆ, kao što je prethodno napomenuto, teško je u potpunosti standardizovati metode izolacije i kultivacije ovih ćelija. Bez obzira na veliki broj istraživanja koja se sprovode sa KS-MMĆ, još uvek nije u potpunosti poznato na osnovu kojih markera bi se mogla izvršiti selekcija KS-MMĆ pogodnih za terapijsku primenu. Zbog toga je veoma važno detaljno utvrditi po kojim osobinama i u kom stepenu se razlikuju KS-MMĆ zdravih davalaca, kao i ustanoviti metode kojima bi se potencijalne razlike mogle uočiti na što efikasniji način. Ti podaci bi mogli da doprinesu donošenju odluke o izboru adekvatnog uzorka za potencijalnu primenu u terapijske svrhe. Takođe, od velikog značaja je razvijanje metoda kojima bi se iz ove heterogene populacije ćelija mogla izdvojiti homogenija populacija koja ispunjava sve kriterijume za bezbednu i efikasnu terapijsku primenu (Chu et al., 2020). Iako se može reći da su rezultati prekliničkih i kliničkih studija

obećavajući, treba imati u vidu da se većina ovih studija još uvek nalazi u ranim fazama kliničkog ispitivanja i da je neophodno sprovesti dalja detaljna istraživanja, odnosno sprovesti sve faze kliničkih ispitivanja, sa ciljem definitivne procene bezbednosti i efikasnosti potencijalne terapijske primene KS-MMĆ. Kao što se može videti na Slici 8B, veoma mali broj kliničkih studija (8%) nalazi se u trećoj fazi ispitivanja, dok je većina studija još uvek u prvoj (42%) ili u drugoj (46%) fazi, dok za 4% studija nije navedeno u kojoj fazi ispitivanja se nalaze. Treba naglasiti da se studije u početnim fazama baziraju na malom broju ispitanika, kao i da su za mali broj studija dostupni podaci koji govore o efikasnosti istih. Dakle, da li će studije koje se nalaze u početnim fazama uspjeti da dospeju do narednog koraka ispitivanja i da li će se tada potvrditi bezbednost i efikasnost potencijalne primene za sada ostaje u domenu nagađanja.

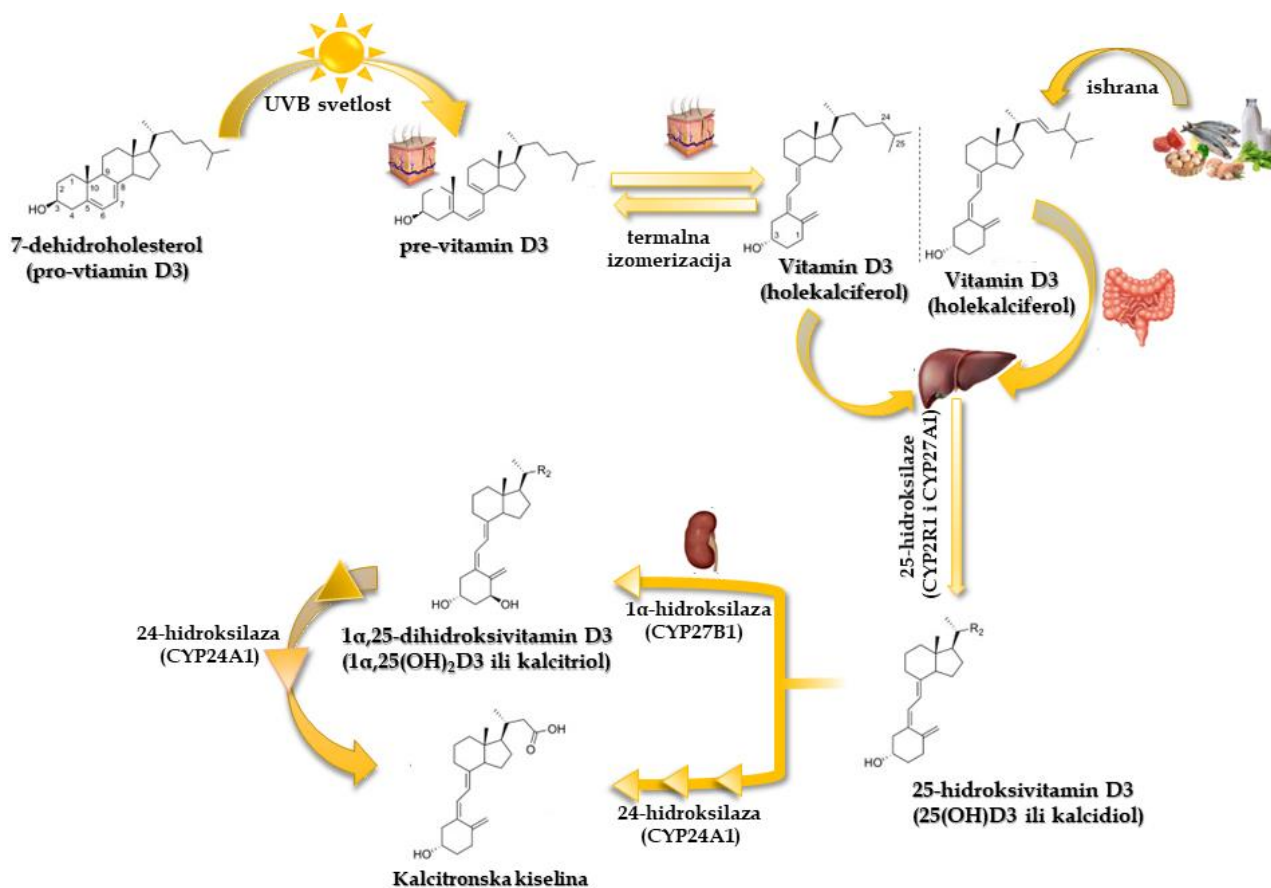
Da bi se KS-MMĆ mogle potencijalno koristiti za lečenje različitih oboljenja, neophodno je da se tokom svih procesa koji su uključeni u bioproizvodnju, odnosno „biobankiranje“ ćelija, zadovolje standardi dobre proizvođačke prakse. U Sjedinjenim Američkim Državama glavno regulativno telo koje daje odobrenje za upotrebu medicinskih produkata, uključujući i one koje sadrže žive ćelije, predstavlja Agencija za hranu i lekove (eng. *Food and Drug Administration, FDA*). Glavni organ zadužen za donošenje zakonskih regulativa i propisa na polju medicine u Evropskoj uniji je Evropska agencija za lekove (eng. *European Medicines Agency, EMA*). EMA je sačinjena od sedam manjih komiteta. Medicinski produkti koji sadrže MMĆ klasifikuju se kao „medicinsko sredstvo za naprednu terapiju“ (eng. *Advanced Therapy Medical Product, ATMP*), a preciznije se označavaju kao „medicinsko sredstvo za terapiju somatskim ćelijama“ (eng. *Somatic Cell Therapy Medicinal Product*). Pre potencijalne upotrebe MMĆ u kliničkim studijama, odnosno u terapijske svrhe, neophodno je dobiti akreditaciju od strane Komiteta za napredne terapije (eng. *Committee for Advanced Therapies, CAT*). CAT daje stručno mišljenje na osnovu procene kvaliteta, bezbednosti upotrebe i efikasnosti medicinskog sredstva/leka. Nakon dobijanja odobrenja od CAT, finalno odobrenje za upotrebu potencijalnog produkta u ćelijskoj terapiji daje Komitet za upotrebu medicinskih sredstava/lekova za humanu upotrebu (eng. *Committee for the Medicinal Products for Human Use*). Samo produkt čija je primena legalizovana na ovaj ovaj način, odnosno produkt za koji je dobijena centralizovana autorizacija za proizvodnju (eng. *Centralized Marketing Authorization*), može se primenjivati u zemljama Evropske unije (Andrzejewska, Lukomska, et al., 2019).

Istraživači polažu velike nade u potencijal, kako KS-MMĆ, tako i MMĆ izolovanih iz drugih tkiva, za lečenje brojnih bolesti za koje do sada nije razvijena efikasna terapija, kao i u mogućnost primene ovih ćelija sa ciljem unapređenja trenutno postojećih metoda lečenja. Međutim, tretmani koji se primenjuju, a da prethodno nisu odobreni od strane odgovarajućih regulativnih agencija, prete da ugroze napredak do kog su mukotrpnim radom istraživači širom sveta došli. Neodobrena primena MMĆ može biti veoma nebezbedna i imati razna neželjena dejstva. Pored neuspeha terapije i neželjenih reakcije na mestu primene, može doći i do migracije ćelija kroz organizam, diferenciranja u neželjenom pravcu ili do formiranja tumora, kao i do kontaminacije uzoraka u slučaju ekstenzivne manipulacije nakon izolacije ćelija. Ovi rizici postoje bez obzira da li je reč o autolognim ili alogenim MMĆ (Yim, 2005). Precizni i strogi zakoni i zakonske regulative potrebni su više nego ikad da bi se sprečila zloupotreba i osiguralo da etički, politički, finansijski i pravni pritisci ne ugrožavaju bezbednost istraživačkog procesa.

1.6. VITAMIN D3

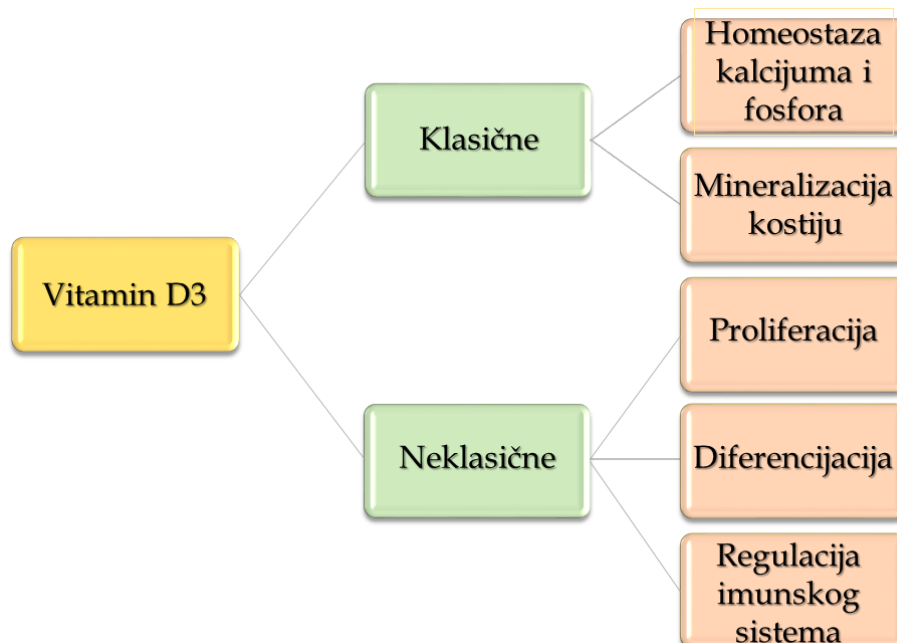
Za otkriće vitamina D3 najviše su zaslužni Edward Mellanby i McCollum. Mellanby je bio veoma zabrinut zbog velike učestalosti pojave rahitisa u Ujedinjenom Kraljevstvu, naročito u Škotskoj. Oslanjajući se na istraživanja koje je sprovodio McCollum, zaključio je da neadekvanta ishrana, uglavnom bazirana na žitaricama, može biti glavni razlog pojave rahitisa. Da bi potvrdio svoju hipotezu, on je pse koje je držao u zatvorenom prostoru udaljene od sunčeve svetlosti hranio namirnicama koje su u ishrani koristili ljudi iz Škotske. Psi koji su gajeni u ovim uslovima razvijali su simptome uporedive sa rahitisom kod ljudi. Mellanby je takođe uspeo da „izleči“ ovo stanje uvođenjem u ishranu ulja jetre bakalara, zbog čega je pretpostavio da je moguće da vitamin A ima ključnu ulogu u prevenciji rahitisa (Mellanby, 1919). Sa ciljem da testira ovu hipotezu, McCollum je propuštao kroz ulje jetre bakalara kiseonik koji je dovodio do degradacije vitamina A, što je potvrđeno zapažanjem da preparat tretiran na ovakav način nije više mogao da spreči nedostatak vitamina A. Međutim, sposobnost za prevenciju rahitisa nakon tretmana kisonikom je zadržana. To je vodilo ka zaključku da neki drugi faktor, a ne vitamin A, može biti odgovoran za pojavu rahitisa (McCollum et al., 1922). Ovaj faktor nazvan je vitamin D, jer je bio četvrti u nizu otkrivenih vitamina (Pilz et al., 2019). Iako je ideja o vitaminu D postala vrlo jasna, struktura ovog vitamina identifikovana je tek 1930. godine kada su Askwel i saradnici nakon ozračivanja mešavine ergosterola izolovali vitamin D2 (ergokalciferol) (Askew et al., 1930). Nedugo zatim, 1935. godine Windaus i saradnici su izolovali 7-dehidroholesterol (pro-vitamin D) (Windaus et al., 1935), dok je vitamin D3 (holekalciferol) identifikovan 1936. godine (Windans & Bock, 1936).

Vitamin D3 se stvara u koži iz 7-dehidroholesterolu pri izlaganju UVB svetlosti (svetlosni spektar 280-320 nm). Najpre se formira pre-vitamin D3 koji odmah podleže termalnoj reakciji izomerizacije pri čemu nastaje holekalciferol (VD3) (Soto et al., 2020) (Slika 8). Oko 80% vitamina D3 u organizmu nastaje na ovaj način. Vitamin D se može uneti u organizam i odgovarajućom ishranom (npr. jaja, riba, ili druga hrana bogata vitaminom D3), mada dijetetski unos uglavnom ima samo sporednu ulogu (Pilz et al., 2019). Proces sinteze VD3 odigrava se do 3 dana nakon izlaganja kože UVB svetlosti, a tokom ovog perioda se vitamin D3 vezujući protein (eng. *vitamin D3-binding protein*, DBP) vezuje za VD3 i oslobađa ga u krvotok (Soto et al., 2020). Holekalciferol pretstavlja biološki neaktivan oblik vitamina D3, a biološki aktivni metaboliti vitamina D3 nastaju kroz proces hidrosilacije VD3 koja uključuje dva koraka. Najpre se u jetri pomoću enzima citohroma 25-hidroksilaza (CYP2R1 i CYP27A1) vitamin D3 konvertuje u 25-hidroksivitamin D3 (25(OH)D3 ili kalcidiol). Zatim se u bubrezima pomoću enzima 1 α -hidroksilaze (CYP27B1) stvara 1 α ,25-dihidroksivitamin D3 (1 α ,25(OH)₂D3 ili kalcitriol) (Christakos et al., 2003) (Slika 10). Osim u ćelijama bubrega, enzim 1 α hidroksilaza eksprimiran je i u mnogim drugim ćelijama, kao što su keratinociti, ćelije imunskog sistema i tumorske ćelije (Geng et al., 2013). S druge strane, 24-hidroksilaza (CYP24A1) inaktivira 25(OH)D3 i 1 α ,25(OH)₂D3 i na taj način doprinosi održavanju homeostaze vitamina D3 (Holick, 2007) (Slika 8). Zanimljivo je zapažanje da je nivo ekspresije CYP24A1 povišen kod tumorskih ćelija, što može biti povezano sa sposobnošću ovih ćelija da izbegnu antitumorski uticaj vitamina D3 (Deeb et al., 2007). Pokazano je da MMC izolovane iz KS i masnog tkiva poseduju sve enzimske komponente potrebne za metabolisanje vitamina D3: receptore vitamina D3 i enzime CYP2R1, CYP27A1, CYP27B1 i CYP24A1 (Zhou et al., 2010; Geng et al., 2011; Ruggiero et al., 2016; Doering et al., 2019).



Slika 10. Metabolizam vitamina D3. Preuzeto i modifikovano prema Tecilazich i sar. 2021 i El-Khoury i sar. 2011 (El-Khoury et al., 2011; Tecilazich et al., 2021).

Vitamin D3 (holekalciferol) je važan za regulaciju metabolizma kalcijuma i fosfora. On podstiče resorpciju ovih minerala iz creva, omogućuje njihovo skladištenje u kostima i na taj način doprinosi održanju homeostaze i snage kostiju. Vitamin D3 stimuliše ekspresiju specifičnih hormona i faktora rasta, diferencijaciju i proliferaciju osteoblasta, a ima uticaj i na regulaciju imunskog sistema (Van Driel & Van Leeuwen, 2017; Soto et al., 2020) (Slika 11).



Slika 11. Funkcije vitamina D3. Preuzeto i modifikovano prema Soto et al. 2020 (Soto et al., 2020)

Homeostaza kalcijuma usko je povezana sa homeostazom koštanog tkiva. Kalcijum učestvuje u formiranju kostiju i obezbeđuje snagu skeletu, ali se takođe u kostima nalaze i najveće zalihe kalcijuma koje se mogu koristiti u slučaju nedostatka ovog minerala (Christakos et al., 2016). Nizak nivo kalcijuma u krvi stimuliše oslobađanje parathormona (PTH) iz paratiroidne žlezde. Kalcitriol i PTH podstiču diferencijaciju osteoklasta i resorpciju kosti, odnosno oslobađanje kalcijuma i fosfata u krvotok (Gil et al., 2018). S druge strane, PTH i kalcitriol u bubrezima pospešuju reapsorpciju kalcijuma, dok kalcitriol takođe podstiče resorpciju kalcijuma u crevima, sveobuhvatno utičući na regulaciju nivoa ovog minerala. Normalizacijom nivoa kalcijuma u krvi postiže se negativna povratna sprega, odnosno prekida se oslobađanje PTH (Kjundmiri et al., 2016; Gil et al., 2018). Kada je nivo kalcijuma u krvi adekvatan, kalcitriol može podstaći formiranje i rast kostiju, aktiviranjem diferencijacije hondrocita i povećanjem nivoa kalcijuma i fosfata u serumu, dok nedostatak vitamina D dovodi do neadekvatne mineralizacije skeleta (Gil et al., 2018). Ustanovljeno je da vitamin D može inhibirati sintezu i izlučivanje PTH, ali i stimulisati lučenje insulina kao i FGF23 (eng. *hosphaturic factor fibroblast growth factor 23*) (Bikle, 2009).

Receptor vitamina D3 (eng. *Vitamine D3 Receptor, VDR*) je nuklearni receptor prisutan u većini ćelija ljudi (Adorini & Penna, 2008), između ostalih i u ćelijama urođenog i stečenog imuniteta (Provvedini et al., 1983). Pod uticajem vitamina D snižava se nivo proinflamatornih, a povećava nivo anti-inflamatornih citokina. Tako je primećeno da je nivo proinflamatornih citokina kao što su TNF- α i IL-6 najniži tokom letnjih meseci, kada je koncentracija vitamina D u organizmu najveća (Soto et al., 2020). Pored toga, vitamin D svoju imunoregulatornu funkciju ispoljava delujući na različite imunske ćelija. Naime, pokazano je da aktivni metabolit 1,25(OH) $_2$ D3 održava dendritične ćelije u nezrelom stanju i time utiče na održanje imunološke tolerancije, a takođe smanjuje ekspresiju CD80 i CD86 na ovim ćelijama i na taj način ometa njihovu interakciju sa T limfocitima (Rosenblatt et al., 2010; Barragan et al., 2015). Pored toga, vitamin D3 podstiče sazrevanje makrofaga i poboljšava njihovu fagocitozu, dok paralelno smanjuje ekspresiju proteina glavnog kompleksa histokompatibilnosti klase II na površini makrofaga čime ometa aktivaciju T limfocita (Soto et al., 2020). Takođe je utvrđeno da 1,25(OH) $_2$ D3 snižava proliferaciju NK ćelija i smanjuje njihovu citotoksičnost, odnosno da redukuje produkciju TNF- α i IFN- γ (Ota et al., 2015). Pokazano je da ovaj vitamin smanjuje broj B limfocita i njihovu proliferaciju i diferencijaciju u plazma ćelije, kao i da redukuje broj aktiviranih T limfocita i produkciju TNF- α (Caballero-Velázquez et al., 2016). Takođe je uvrđeno da 1,25(OH) $_2$ D3 redukuje produkciju IL-2 i IFN- γ od strane Th1 (eng. *T helper type 1*) CD4 $^+$ T limfocita, dok sa druge strane promoviše povećanje anti-inflamatorne i pro-tolerogene Th2 (eng. *T helper type 2*) subpopulacije CD4 $^+$ T limfocita (Caballero-Velázquez et al., 2016; Soto et al., 2020).

Istraživanja ukazuju da kalcitriol i VDR mogu uticati na ekspresiju gena koji su povezani sa ćelijskom proliferacijom i diferencijacijom, što upućuje na njegovu potencijalnu ulogu u prevenciji raka (Gil et al., 2018). Pojedine prekliničke i kliničke studije pokazuju da kalcitriol i njegovi analozi mogu ispoljiti antitumorske efekte *in vitro* i *in vivo* kroz više mehanizama uključujući indukciju zaustavljanja ćelijskog ciklusa, apoptozu, diferencijaciju, kao i supresiju upale, angiogeneze i metastaziranja (Gil et al., 2018).

Prvi rezultati koji su ukazali da je vitamin D povezan sa diferencijacijom mišjih leukemijskih ćelja u makrofage objavljeni su 1981. godine (Abe et al., 1981). Pokazano je da VDR signalizacija u osteogenim progenitorima povećava ekspresiju RANKL (eng. TNF superfamily member 11, TNFSF11, sinonim RANKL) i stimuliše njihovu diferencijaciju u osteoklaste, dok aktiviranje VDR u zrelim osteoblastima ima antikataboličko dejstvo

(smanjuje ekspresiju RANKL) i anaboličke efekte, npr. stimuliše LRP5 (eng. LDL receptor related protein 5) signalizaciju (Christakos et al., 2016). Nedavno je pokazana sposobnost kalcitriola i nekoliko strukturno sličnih članova klase sekosteroida da regulišu Hedgehog signalni put koji je uključen u procese diferencijaciju tkiva tokom embriogeneze i održavanje populacija adultnih matičnih ćelija (Gil et al., 2018).

Ispitivanja uticaja metabolita vitamina D3 ukazuju na potencijalnu ulogu ovog vitamina u procesu osteogene diferencijacije KS-MMĆ. Iako istraživanja ukazuju da vitamin D3 u formi holekalciferola (VD3) može uticati na proliferaciju osteoblasta (D. Wang et al., 2018), precizan efekat koji ova forma vitamina ima na svojstva MMĆ i dalje nije u potpunosti poznat. Novije studije u kojima je VD3 korišćen u sklopu hibridnih bionosača ukazuju da ovaj vitamin može imati osteoinduktivni uticaj na MMĆ, odnosno da može poboljšati njihov regenerativni potencijal, što implicira prednosti ovakvog tretmana u lečenju bolesti/povreda kostiju. U slučaju kada je radi omogućavanja kontinuiranog i kontrolisanog oslobađanja VD3 ovaj vitamin integrisan u bionosače sačinjene od kalcijum sulfata i kalcijum citrata, ustanovljen je njegov stimulatívni efekat na vijabilnost i brzinu proliferacije mišjih KS-MMĆ (Chen, Ji, et al., 2020). Pored toga, pokazano je da su polikaprolakton/želatinski nosači u kombinaciji sa nano-hidroksiapatitom (HAP) i VD3 stimulisali osteogenezu MMĆ masnog tkiva. U ovom istraživanju primećena je kako povećana aktivnost alkalne fosfataze (ALP) u ranim fazama osteogeneze, tako i veći stepen mineralizacije u kasnim fazama osteogene diferencijacije (Sattary et al., 2019). Osteoinduktívni efekat pokazan je i u slučaju kada su humane KS-MMĆ kultivisane na biorazgradivim polimernim nanovlaknima koja su služila kao bionosači za VD3/vitamin K2/Mg (Guler et al., 2021). U eksperimentima koji su vršeni na humanim MMĆ izolovanim iz zubne pulpe, utvrđeno je da hitozanski bionosači koji sadrže VD3 omogućuju kontinuirano isporučivanje ovog vitamina tokom 3-5 dana (Gupta et al., 2021).

Iako ove studije ukazuju na pro-osteogene efekte VD3 u kombinaciji sa bionosačima, efekat samog VD3 na regenerativni potencijal KS-MMĆ, kao i mehanizmi koji leže u osnovi njegovog dejstva nisu u potpunosti ispitani. Definisanje efekata koje tretman VD3 ima na KS-MMĆ može biti od velike važnosti u kontekstu potencijalne upotrebe ovih ćelija u regenerativnoj medicini.

1.7. SIRTUIN 1 (SIRT1)

Sirtuin 1 (SIRT1) protein, kodiran genom *SIRT1*, je kod sisara najkonzervativnija histon deacetilaza zavisna od nikotinamid-adenin-dinukleotida (NAD⁺) (Salminen et al., 2013). Osim što je meta za histonske i nehistske proteine, SIRT1 funkcioniše kao transkripcioni faktor u mnogim fiziološkim procesima (Yamamoto et al., 2007), a poznato je da ulogu jednog od ključnih regulatora ćelijskih funkcija povezanih sa regenerativnim potencijalom ostvaruje i u MMĆ. Naime, ustanovljeno je da SIRT1 promoviše samoobnavljanje MMĆ i da ih štiti od brojnih unutrašnjih i spoljašnjih stresora, uključujući oštećenje DNK, reaktivne vrste kiseonika, genomsku nestabilnost i hiperinflamatornu i apoptotičku signalizaciju (Zainabadi, 2018). Shodno tome, pokazano je da je SIRT1 aktivacija neophodna za *ex vivo* ekspanziju humanih KS-MMĆ i MT-MMĆ u kulturi (Yuan et al., 2012). Nedavno je pokazano da mikroRNA-34a (faktor izazvan hipoksijom) indukuje apoptozu i starenje KS-MMĆ pacova tako što smanjuje ekspresiju SIRT1 (Zhang et al., 2015). U eksperimentima sprovedenim na ćelijskoj liniji mišjih MMĆ, C3H10T1/2, primećeno je da je tokom osteogene diferencijacije bila povišena aktivnost SIRT1, ali ne i nivo ekspresije ovog proteina (Li et al., 2013). Utvrđeno je i da je aktivnost SIRT1 u negativnoj korelaciji sa

adipogenezom u preadipocitima (Picard et al., 2004). S obzirom da adipociti nastaju diferencijacijom MMĆ, može se zaključiti da SIRT1 ima uticaj na ovaj proces (Moerman et al., 2004). Istraživanja ukazuju da aktivacija SIRT1 promoviše osteogenu diferencijaciju, dok na adipogenezu ima inhibitorski uticaj (Bäckesjö et al., 2009; Tseng et al., 2011; Yuan et al., 2012; Y. Chen et al., 2021). Utvrđeno je da se nivo proteina SIRT1 smanjuje tokom ekstenzivne kultivacije KS-MMĆ i MT-MMĆ (Yuan et al., 2012), kao i da je aktivnost SIRT1 u negativnoj korelaciji sa uzrastom (Li et al., 2011), što je u skladu sa promenom sposobnosti diferencijacije MMĆ *in vitro* i *in vivo*. Na osnovu navedenog, može se zaključiti da SIRT1 ima važnu ulogu u diferencijaciji i starenju KS-MMĆ i MT-MMĆ, odnosno da bi aktivacija SIRT1 *in vitro* mogla da promeni „sudbinu“ MMĆ (Chen et al., 2014).

Signalizacija preko SIRT1 uključuje aktivaciju različitih nishodnih signalnih molekula. Pokazano je da SIRT1 u KS-MMĆ reguliše puteve rezistencije na stres deacetilacijom FoxO3 (eng. Forkhead box protein O3), čime pozitivno utiče na vijabilnost ćelija. Naime, FoxO3 je član FOXO familije transkripcionih faktora sisara, koji su jedan od ključnih regulatora odgovora na stres, nastanka tumora i dugovečnosti, s obzirom da regulišu ekspresiju gena koji su uključeni u procese apoptoze, progresije ćelijskog ciklusa i odgovora na stres (Zhang et al., 2015). S druge strane, primećeno je da se primenom resveratrola, aktivatora SIRT1, putem aktiviranja SIRT1/FoxO3 signalnog puta postiže usmeravanje MMĆ u pravcu osteogene diferencijacije usled povećane ekspresije *RUNX2* (Tseng et al., 2011). Sun i saradnici su pokazali da povećana ekspresija SIRT1 u MMĆ kod miševa može sprečiti gubitak koštanog tkiva putem deacetilacije FoxO3 i smanjivanjem oksidativnog stresa (Sun et al., 2018). U saglasnosti sa navedenim je i istraživanje koje su Chen i saradnici sprovedeli na miševima, a koje ukazuje da aktiviranje SIRT1/FoxO3 signalnog puta može biti jedan od potencijalnih tretmana u slučaju redukcije koštanog tkiva usled nedostatka vitamina D3 (Chen, Hu, et al., 2020). Takođe, deacetilacija histona može biti jedan od mehanizama posredstvom kojih SIRT1 utiče na diferenciranje MMĆ u određenom pravcu, kao što tokom diferencijacije KS-MMĆ ka osteogenoj lozi, sklerostin (eng. Sclerostin), inhibitor formiranja kostiju, može biti regulisan pomoću SIRT1 kroz deacetilaciju histona 3 na lizin 9 (H3K9) na promotoru gena (Cohen-Kfir et al., 2011). Pored deacetilacije FoxO3, SIRT1 utiče na deacetilaciju β -katenina (eng. β -catenin) što dovodi do njegove lokalizacije u jedru i povećane osteogene diferencijacije KS-MMĆ (Simic et al., 2013). Yoon i saradnici su pokazali da u regulaciju samoobnavljanja humanih KS-MMĆ i njihovoj osteogenoj diferencijaciji može biti uključen SIRT1/p53 signalni put (Yoon et al., 2016). Takođe, pokazano je da SIRT1 može uticati na diferencijaciju MMĆ i stimulisanjem aktivnosti *RUNX2* i *SOX9* putem njihove posttranslacione deacetilacije, podstičući na taj način diferencijaciju ka osteoblastima, odnosno hondroblastima. Sa druge strane, SIRT1 snižava ekspresiju C/EBP-d (eng. CCAAT enhancer binding protein delta) i aktivnost PPAR γ , čime negativno utiče na adipogenu diferencijaciju MMĆ (Zainabadi, 2018).

Postoje indikacije da se važna uloga SIRT1 u regulaciji funkcija MMĆ može iskoristiti za razvoj poboljšanih terapija za lečenje različitih bolesti, naročito u oblasti regenerativne medicine. Radi dobijanja adekvatnog broja ćelija za transplantaciju istraživači se oslanjaju na ekspanziju prikupljenih MMĆ. S obzirom na pozitivan uticaj SIRT1 na proliferaciju KS-MMĆ i MT-MMĆ (Yuan et al., 2012), strategija kojom se aktivira ova signalizacija mogla bi da pomogne u povećanju prinosa ćelija i da smanji broj potrebnih pasaža za dostizanje željenog broja MMĆ (Zainabadi, 2018). Nekoliko studija sprovedenih na životinjama daju razloga za optimizam. Čak i kratkoročna primena farmakoloških agenasa koji su aktivirali SIRT1 bila je dovoljna da poboljša i *ex vivo* rast i *in vivo* funkciju humanih KS-MMĆ prilikom transplantacije u srce pacova nakon infarkta (Liu et al., 2017). Od velikog je značaja utvrditi

da li bi strategija pre-tretmana/pre-kondicioniranja proizvela slične efekte i u kliničkim ispitivanjima. S obzirom da je u pojedinim studijama primećeno relativno loše preživljavanje MMC posle implantacije (Pagani et al., 2003; Burova et al., 2013), moguće je da bi pre-tretman kojim bi se pospešila aktivnost SIRT1 imao koristan efekat, s obzirom na njegov represivni uticaj na apoptotičke i senescentne signalne puteve i potektivnu ulogu od genotoksičnog i oksidativnog stresa. *Ex vivo* „podmlađivanje” MMC upotrebom agonista SIRT1 može biti poželjnija strategija od genetskog inženjeringa koji bi doveo do trajnih genetskih promena. Pored toga što smanjuje mogućnost genetske alteracije u neželjenom pravcu, pre-tretman sa SIRT1 agonistima takođe je izvodljiviji i lakši za primenu u postojećem transplantacijskom programu u odnosu na genetske modifikacije (Zainabadi, 2018).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavna prepreka za standardizaciju procedura kultivacije i umnožavanja *in vitro* MMĆ je heterogenost bioloških svojstava različitih populacija ovih ćelija, kao i nepostojanje pouzdanog jedinstvenog specifičnog markera za njihovu identifikaciju. Za potencijalnu terapijsku primenu KS-MMĆ ključno pitanje bez definitivnog odgovora predstavlja njihova precizna karakterizacija i procena regenerativnog potencijala. Utvrđivanje po kojim osobinama i u kom stepenu se razlikuju KS-MMĆ zdravih davalaca, kao i uspostavljanje metoda pomoću kojih bi se potencijalne razlike mogle uočiti na što efikasniji način, može biti od velikog značaja za donošenje odluke o izboru adekvatnog uzorka za potencijalnu primenu u ćelijskoj terapiji.

Takođe, ispitivanja koja utvrđuju kapacitet različitih biološki aktivnih supstanci da poboljšaju regenerativni potencijal KS-MMĆ u kontekstu podsticanja njihove sposobnosti proliferacije i diferencijacije, kao i usporavanja ćelijskog starenja, mogu biti od značaja za definisanje novih modaliteta potencijalne terapijske primene KS-MMĆ. Malobrojne novije studije u kojima je korišćen holekalciferol u sklopu biohibridnih nosača ukazuju na njegov potencijalni osteo-induktivni efekat na KS-MMĆ koji bi mogao doprineti poboljšanju njihovog regenerativnog potencijala. Utvrđivanje da li i u kojoj meri vitamin D3 u formi holekalciferola može uticati na funkcijska svojstva KS-MMĆ, kao i koji mehanizmi se mogu nalaziti u osnovi njegovog dejstva, može biti od velikog značaja ne samo za fundamentalnu nauku, već i za potencijalnu terapijsku primenu ovog vitamina kao pretrretmana u protokolima transplantacije KS-MMĆ.

U skladu sa navedenim činjenicama, a radi dobijanja podataka koji doprinose boljem razumevanju varijabilnih podataka o svojstvima i terapijskim efektima KS-MMĆ u naučnoj literaturi, kao i definisanja potencijala primene vitamina D3 za prekondicioniranje KS-MMĆ u ćelijskoj terapiji postavljeni su sledeći

Ciljevi istraživanja:

1. Precizna, uporedna karakterizacija MMĆ izolovanih iz kosne srži zdravih davalaca.
2. Analiza uticaja vitamina D3 u formi holekalciferola na regenerativni potencijal KS-MMĆ.
3. Analiza signalnih puteva uključenih u modulaciju svojstva i funkcija KS-MMĆ pod uticajem vitamina D3.

Kako bi se ispunili definisani ciljevi, istraživanja su izvođena u sledećim fazama:

1. Uporedna analiza svojstva i funkcija KS-MMĆ zdravih davalaca na osnovu ispitivanja:

- Morfologije KS-MMĆ – primenom fazno-kontrastne i transmisionne elektronske mikroskopije;
- Imunofenotipizacije KS-MMĆ – određivanjem ekspresije specifičnih mezenhimskih markera (CD29, CD73, CD90 i CD105) i odsustva ekspresije hematopoetskih markera (CD45 i HLA-DR);

- Vijabilnosti i proliferativnog kapaciteta KS-MMĆ – određivanjem metaboličke aktivnosti, vremena potrebnog za dupliranje populacije ćelija i broja vijabilnih ćelija;
- Klonogenog potencijala KS-MMĆ;
- Procesu ćelijskog starenja (senescencije) KS-MMĆ;
- Diferencijacionog potencijala KS-MMĆ – kultivacijom u odgovarajućim medijumima za indukciju diferencijacije u pravcu osteogene, hondrogene i adipogene loze;
- Proteinske ekspresije i lokalizacije komponenti citoskeleta (F-aktin), specifičnih markera za pluripotentnost (NANOG, OCT-4, SOX2), markera proliferacije (Ki67) i regulatora ćelijskog starenja (p53).

2. Analiza uticaja vitamina D3 na svojstva i funkcije povezane sa regenerativnim kapacitetom KS-MMĆ na osnovu ispitivanja:

- Vijabilnosti i proliferativnog kapaciteta KS-MMĆ – određivanjem metaboličke aktivnosti i ćelijskog ciklusa;
- Klonogenog potencijala KS-MMĆ;
- Procesu ćelijskog starenja KS-MMĆ;
- Potencijala diferencijacije KS-MMĆ u pravcu osteogene i adipogene loze;
- Relativne genske ekspresije specifičnih markera za pluripotentnost (*NANOG*, *SOX2*, *OCT-4*), osteogenu (*ALP*, *RUNX2*, *OCN*) i adipogenu diferencijaciju (*Adiponektin*, *PPAR γ*);
- Proteinske ekspresije i lokalizacije specifičnih markera za proliferaciju (Ki67), pluripotentnost (NANOG, OCT-4, SOX2) i regulatora ćelijskog starenja (p53).

3. Analiza signalnih puteva uključenih u modulaciju svojstva i funkcija KS-MMĆ pod uticajem vitamina D3 na osnovu ispitivanja:

- Uticaja vitamina D3 na proteinsku ekspresiju i lokalizaciju signalnih molekula (SIRT1, FoxO3) u KS-MMĆ;
- Učešća aktiviranih signalnih puteva u delovanju vitamina D3 na ispitivane funkcije KS-MMĆ primenom EX-527, specifičnog farmakološkog inhibitora SIRT1.

3. MATERIJAL I METODI

3.1. MEDIJUMI I PUFERI

Za kultivaciju KS-MMĆ kao standardni medijum (SM) korišćen je α -MEM medijum (eng. *MEM Alpha Modification medium supplemented with nucleosides*, Capricorn-Scientific, Ebsdorfergrund, Nemačka) sa 10% fetalnog telećeg seruma (FBS od eng. *Fetal Bovine Serum*, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) 1% penicilina/streptomcina (Gibco, Thermo Fisher Scientific), i 1% L-glutamina (Capricorn-Scientific).

Za indukciju osteogene diferencijacije KS-MMĆ korišćen je medijum koji se sastojao od SM sa dodatkom 10 mM β -glicerofosfata (AppliChem), 50 μ M fosfata askrobinske kiseline (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) i 10 nM deksametazona (Sigma-Aldrich)).

Za indukciju hondrogene diferencijacije KS-MMĆ korišćen je medijum koji se sastojao od SM sa dodatkom 50 μ M fosfata askrobinske kiseline, 10 nM deksametazona (Sigma-Aldrich) i 2 ng/mL transformišućeg faktora rasta beta (TGF- β 1, R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD).

Za indukciju adipogene diferencijacije KS-MMĆ korišćen je medijum koji se sastojao od SM sa dodatkom 1 μ M deksametazona (Sigma-Aldrich), 100 μ g/mL isobutilmetilksantina (IBMX, od eng. *isobutyl-methylxanthine*, Sigma-Aldrich) i 10 μ g/mL insulina (Sigma-Aldrich).

Izotonični rastvor fosfatnog pufera za ćelijske kulture (PBS, od eng. *Phosphate-Buffered Saline*) pravljen je razblaživanjem 10 puta koncentrovanog komercijalno dostupnog rastvora (10% PBS, Capricorn-Scientific) u sterilnoj vodi za injekcije (odnos 1:9).

Pufer za liziranje eritrocita u uzorcima KS sastojao se od 155 mM NH_4Cl , 0.1 mM Na_2EDTA i 10 mM NaHCO_3 u PBS (pH 7.2-7.4).

Za fiksaciju aspirata KS kalupljenih za svetlosnu i transmisionu elektronsku mikroskopiju korišćen je 2.5% glutaraldehid koji je pravljen razblaživanjem 25% glutaraldehida 10 puta u 0.1 M Sørensen fosfatnom puferu (PB, pH 7.2).

Za fiksaciju uzoraka kultivisanih KS-MMĆ koji su se kalupili za svetlosnu i transmisionu elektronsku mikroskopiju korišćen je rastvor 2.5% glutaraldehida i 3.7% paraformaldehida u odnosu 1:1. Razblaženje paraformaldehida od 3.7% je pravljeno razblaživanjem 37% paraformaldehida 10 puta u 0.1 M PB.

3.2. REAGENSI I ANTITELA

Za potrebe istraživanja u okviru ove disertacije korišćeni su reagensi koji uključuju antitela, biološki aktivne faktore i specifične inhibitore (Tabele 1, 2, 3 i 4)

Tabela 1. Podaci o korišćenim faktorima i inhibitorima.

Naziv	Proizvođač	Dejstvo
Holekalciferol (prekursor vitamina D3, VD3)	Santa Cruz Biotechnologies, SAD	Vitamin
6-hloro-2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol-1-karboksiamid (EX-527)	Santa Cruz Biotechnologies, SAD	Inhibitor

Propidijum jodid (PI)	Thermo Fisher Scientific, SAD	Fluorescentna boja za nukleinske kiseline
Faloidin-tetrametilrodamin b izotiocijanat	Sigma-Aldrich, SAD	Fluorescentna boja za F-aktin
4',6-diamidin-2-fenilindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, SAD	Fluorescentna boja za nukleinske kiseline

Tabela 2. Podaci o korišćenim primarnim antitelima. PE-*phycoerithrin*, FITC-*fluorescein isothiocyanate*, Cy-*cyanine*.

Primarno antitelo	Poreklo	Proizvođač	Primena
Anti-humano CD29-konjugovano PE	Miš	R&D Systems, SAD	Protočna citometrija
Anti-humano CD33-konjugovano PE	Miš	R&D Systems, SAD	Protočna citometrija
Anti-humano CD34-konjugovano PE	Miš	DakoCytomation, Danska	Protočna citometrija
Anti-humano CD44H-konjugovano PE	Miš	R&D Systems, SAD	Protočna citometrija
Anti-humano CD45-konjugovano Cy5-PE	Miš	R&D Systems, SAD	Protočna citometrija
Anti-humano CD73-konjugovano PE	Miš	R&D Systems, SAD	Protočna citometrija
Anti-humano CD90-konjugovano PE	Miš	R&D Systems, SAD	Protočna citometrija
Anti-humano CD105-konjugovano PE	Miš	Invitrogen, CA	Protočna citometrija
Anti-humano CD235a-konjugovano PE	Miš	R&D Systems, SAD	Protočna citometrija
Anti-humano HLA-DR-konjugovano FITC	Miš	Invitrogen, CA	Protočna citometrija
Anti-humano Ki67	Zec	Abcam, SAD	Protočna citometrija, Imunofluorescentna mikroskopija
Anti-humano p53	Miš	Santa Cruz Biotechnologies, SAD	Imunofluorescentna mikroskopija

Anti-humano NANOG	Miš	Cell Signaling Technology, SAD	Imunofluorescentna mikroskopija
Anti-humano OCT-4	Zec	Cell Signaling Technology, SAD	Imunofluorescentna mikroskopija
Anti-humano SOX2	Miš	Cell Signaling Technology, SAD	Imunofluorescentna mikroskopija
Anti-humano SIRT1	Zec	Cell Signaling Technology, SAD	Imunofluorescentna mikroskopija
Anti-humano FoxO3a	Zec	Cell Signaling Technology, SAD	Imunofluorescentna mikroskopija

Tabela 3. Podaci o korišćenim sekundarnim antitelima. PE-phycoerithrin, FITC-fluorescein.

Sekundarno antitelo	Poreklo	Proizvođač	Primena
Anti-zečije-konjugovano FITC	Koza	Sigma-Aldrich, SAD	Protočna citometrija, Imunofluorescentna mikroskopija
Anti-mišije-konjugovano FITC	Koza	BD Biosciences	Protočna citometrija
Anti mišije-konjugovano Alexa Fluor 555	Koza	Sigma-Aldrich, SAD	Imunofluorescentna mikroskopija

Tabela 4. Podaci o korišćenim izotipskim kontrolama. FITC-fluorescein

Izotipska kontrola	Poreklo	Proizvođač	Primena
IgG1- konjugovano PE	Miš	R&D Systems, SAD	Protočna citometrija
IgG1- konjugovano FITC	Miš	R&D Systems, SAD	Protočna citometrija
IgG2A- konjugovano PE	Miš	Invitrogen, SAD	Protočna citometrija

3.3. HUMANI MATERIJAL

3.3.1. Prikupljanje uzoraka kosne srži

Uzorci kosne srži (KS) 5 zdravih davalaca (uzrasta 2-12 godina, Tabela 5) aspirirani su iz zadnjeg grebena ilijačne kosti prilikom prikupljanja KS za potrebe alogene transplantacije kosne srži od srodnog, HLA podudarnog davaoca, na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“. Svi uzorci su prikupljeni u skadu sa pravilima Etičkog odbora Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ i uz pisanu informisanu saglasnost staratelja svakog davaoca.

Tabela 5. Podaci o davaocima.

Davalac	Pol	Uzrast	Krvna grupa i Rh faktor	Kariotip
D1	Muško	8 godina i 10 meseci	AB+	46. XY [20]
D2	Žensko	12 godina i 3 meseca	B+	46. XX [20]
D3	Žensko	2 godine i 5 meseci	O+	46. XX [20]
D4	Muško	12 godina i 4 meseca	AB+	46. XY [20]
D5	Žensko	12 godina i 2 meseca	O+	46. XX [20]

Uzorci sveže KS (2 mL) su odmah nakon aspiracije sipani u vakutajner sa EDTA (à 3 mL) i transportovani na sobnoj temperaturi u Laboratoriju Grupe za hematologiju i matične ćelije Instituta za Medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu. Paralelno je 1 ml svežeg uzorka odmah nakon aspiracije nalivan u staklenu bočicu u koju je prethodno sipano 2.5 mL fiksativa (2.5% glutaraldehid) i transportovano na sobnoj temperaturi na Katedru za biologiju ćelija i tkiva Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.3.2. Izolacija monojedarnih ćelija (MNC) iz svežih uzoraka kosne srži

Da bi se iz uzoraka KS izolovale ukupne monojedarne ćelije (MNC) sveži uzorci su najpre razblaženi sa RPMI-1640 medijumom (Sigma-Aldrich) u odnosu 1:3, a zatim naneti na gustinski gradijent (1.077 g/mL) za izolovanje monojedarnih ćelija (LSM, Lymphocyte Separation Medium 1077, Capricorn-Scientific, Germany). Centrifugiranje je vršeno brzinom 1400 obrtaja po minuti (rpm, od eng. revolutions per minute) u trajanju od 30 min, na sobnoj temperaturi i bez kočenja. Iz središnjeg sloja, koji je formiran u obliku magličastog prstena, MNC su pažljivo prikupljane i resuspendovane u RPMI-1640 medijumu sa 10% FBS. Uzorci su potom ispirani od gustinskog gradijenta centrifugiranjem na 1800 rpm/10 min na sobnoj temperaturi. Po potrebi, lizirani su eritrociti u talogu MNC dodavanjem pufera za liziranje eritrocita, inkubacijom u trajanju od 5 min i sledstvenim centrifugiranjem (800 rpm/5 min). Talog MNC je potom ponovo ispiran 2 puta u RPMI-1640 sa 10% FBS, nakon čega su MNC resuspendovane u 1 mL SM za kultivaciju KS-MMĆ. Koncentracija ćelija i njihov ukupan broj određivan je brojanjem u Türk rastvoru (NRK, Srbija), a vijabilnost ćelija primenom 0.4% rastvora boje Tripan plavo (eng. Trypan blue, Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD).

3.3.3. Kultivacija i pasažiranje KS-MMĆ

KS-MMĆ su iz populacije MNC izolovane na osnovu sposobnosti adhezije za plastičnu podlogu. Da bi se izdvojila adhezivna populacija ćelija, MNC resuspendovane u SM su postavljane u plastične flaskove za kultivaciju adhezivnih ćelijskih kultura (površine 25 cm² ili 75 cm²) i inkubirane u standardnim uslovima kultivacije na 37 °C u atmosferi sa 5% CO₂ i 100% relativnom vlažnošću vazduha. Rast ćelija je praćen svakodnevno, do pojave adherentnih ćelija kada je medijum prvi put osvežavan. Ove ćelije su označene kao nulta pasaža (P0). Po uspostavljanju kultura KS-MMĆ, SM je menjan 2 puta nedeljno. U trenutku dostizanja 80-90% konfluentnosti ćelije su pasažirane tako što su KS-MMĆ ispirane sa PBS i odlepljivane sa podloge inkubacijom sa 0.25% Tripsin/1mM EDTA rastvora (Capricorn-Scientific) na 37°C u toku 5-10 min. Vijabilitet ćelija je određivan bojenjem Tripan plavim,

nakon čega su ćelije ponovo zasejavane u novi flask za sledeću pasažu tako da koncentracija bude 1×10^4 ćelija/cm².

KS-MMĆ izolovane iz svih 5 uzoraka su uspešno umnožene. U eksperimentima su korišćene KS-MMĆ iz pasaža P2-P7, a svaki eksperiment je ponavljan najmanje 3 puta.

3.3.4. Krioprezervacija KS-MMĆ

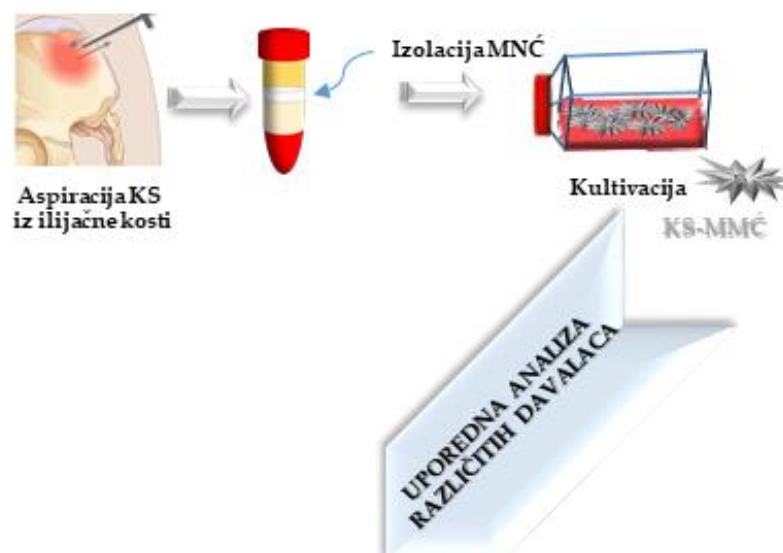
Prilikom pasažiranja deo supenzije KS-MMĆ je zamrzavan u krio-tubama u koncentraciji 1×10^6 ćelija/mL. KS-MMĆ su zamrzavane u medijumu za zamrzavanje koji čine 90% FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) i 10% krioprotektant – dimetilsulfoksid (DMSO, Sigma-Aldrich). Tako pripremljene ćelijske suspenzije su stavljane u kutiju sa izopropanolom u zamrzivač na -70°C čime je obezbeđeno postepeno hlađenje uzorka. Nakon 24 h do 48 h zamrznuti uzorci KS-MMĆ su prebačeni u tankove sa tečnim azotom (-196°C), gde su čuvani do odmrzavanja.

Odmrzavanje uzoraka je vršeno u vodenom kupatilu na temperaturi od 37°C. Uzorci su po odmrzavanju postepeno, ali brzo razblaživani sa SM, a zatim centrifugiranjem na 1400 rpm u trajanju od 10 min ispirani od krioprotektanta. Vijabilitet ćelija je određivan bojenjem Tripan plavim, nakon čega su ćelije zasejavane u flaskove za kulturu tkiva kako bi se umnožile za potrebe eksperimenta.

3.4. EKSPERIMENTALNI DIZAJN

3.4.1. Uporedna analiza svojstava i funkcija KS-MMĆ različitih davalaca

Analiza razlika svojstava i funkcija KS-MMĆ različitih davalaca vršena je na osnovu ispitivanja morfologije i imunofenotipa, metaboličke i proliferativne aktivnosti, kao i diferencijacionog potencijala KS-MMĆ. Morfološke karakteristike utvrđivane su svetlosnom i transmissionom elektronskom mikroskopijom, kao i na osnovu ekspresije F-aktina određene metodom imunofluorescentne mikroskopije. Prema kriterijumima Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju praćen je nivo ekspresije površinskih markera specifičnih za MMĆ (CD29, CD73, CD90 i CD105) i odsustvo ekspresije markera zrelih hematopoetskih ćelija (CD45, HLA-DR). Metabolička aktivnost KS-MMĆ različitih davalaca je procenjena MTT testom u kratkoročnim vremenskim intervalima (24 h i 48 h), dok je radi procene kapaciteta proliferacije određivano vreme dupliranja ćelijske populacije (eng. Population Doubling Time, PDT). Sa ciljem definisanja klonogenog potencijala određivan je broj CFU-F kolonija (eng. *Colony Forming Unit-Fibroblast*). Paralelno je analiziran proces ćelijskog starenja određivanjem aktivnosti enzima β-galaktozidaze. Pored toga, imunofluorescentnim obeležavanjem praćena je proteinska ekspresija i lokalizacija markera pluripotentnosti/matičnosti (NANOG, OCT-4 i SOX2), markera ćelijske proliferacije Ki67 i tumor supresor proteina p53. U cilju utvrđivanja diferencijacionog potencijala izolovanih KS-MMĆ, primenom odgovarajućih medijuma indukovana je osteogena, adipogena i hondrogena diferencijacija. Osteogena diferencijacija je analizirana određivanjem nivoa aktivnosti ALP posle 7 dana, odnosno detekcijom depozita kalcijuma nakon 21 dan kultivacije. Adipogena diferencijacija potvrđivana je na osnovu prisustva lipidnih tela nakon 28 dana kultivacije, dok je nakon 21 dan inkubacije analizirana hondrogena diferencijacija bojenjem proteoglikana.

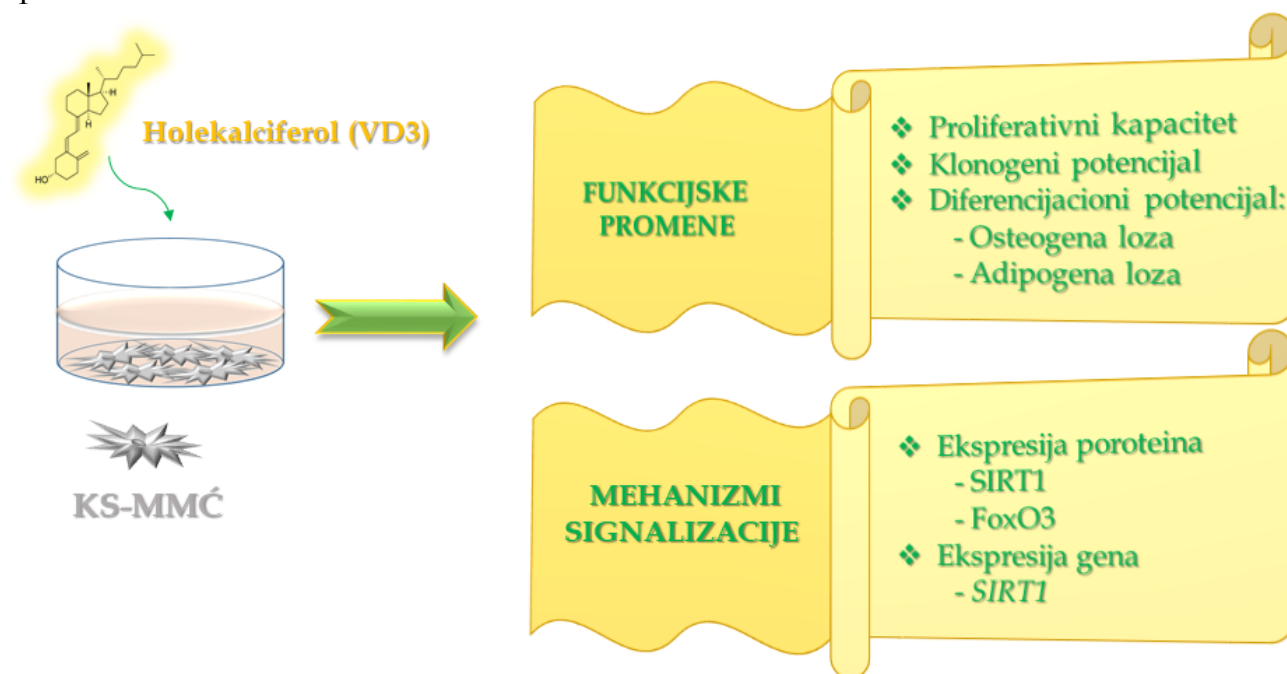


Slika 12. Shematski prikaz eksperimentalnog pristupa za uporednu analizu svojstava i funkcija KS-MMĆ različitih davalaca.

3.4.2. Ispitivanje potencijala vitamina D3 da moduliše funkcije i signalizaciju KS-MMĆ povezanu sa regenerativnim potencijalom

U cilju ispitivanja potencijala vitamina D3 (VD3) na modifikuje funkcije KS-MMĆ povezane sa regenerativnim potencijalom vršena je analiza proliferativne aktivnosti i diferencijacionog potencijala KS-MMĆ. Uz to, paralelno je ispitivan uticaj VD3 na aktivaciju SIRT1 signalnog puta koji ima važnu ulogu u modulaciji regenerativnog potencijala KS-MMĆ. Proliferativni kapacitet KS-MMĆ tretiranih različitim koncentracijama VD3 (10 nM, 20 nM i 40 nM) procenjivan je MTT testom posle isteka ogovarajućih vremenskih intervala (24h, 48h, 72h, 5 dana i 7 dana). Pored toga, uticaj različitih koncentracija VD3 (10 nM, 20

nM i 40 nM) na klonogeni kapacitet KS-MMĆ analiziran je CFU-F testom. Radi utvrđivanja uticaja VD3 na diferencijacioni potencijal KS-MMĆ, ćelije su kultivisane u prisusvu VD3 (10 nM i 20 nM) tokom indukcije diferencijacije u osteogenom i adipogenom pravcu. Sposobnost osteogeneze KS-MMĆ utvrđivana je nakon 7 dana na osnovu nivoa aktivnosti ALP, odnosno posle 21 dan detekcijom deponovanog kalcijuma. Adipogeneza KS-MMĆ je procenjivana nakon 28 dana na osnovu sposobnosti ćelija da formiraju lipidna tela. Ispitivanje uticaja VD3 da moduliše SIRT1 signalizaciju vršeno je analizom proteinske ekspresije SIRT1 i FoxO3 imunofluorescentnim obeležavanjem nakon petodnevnog tretmana sa 10 nM ili 20 nM VD3, dok je uticaj VD3 na ekspresiju iRNK SIRT1 procenjivan qPCR metodom.

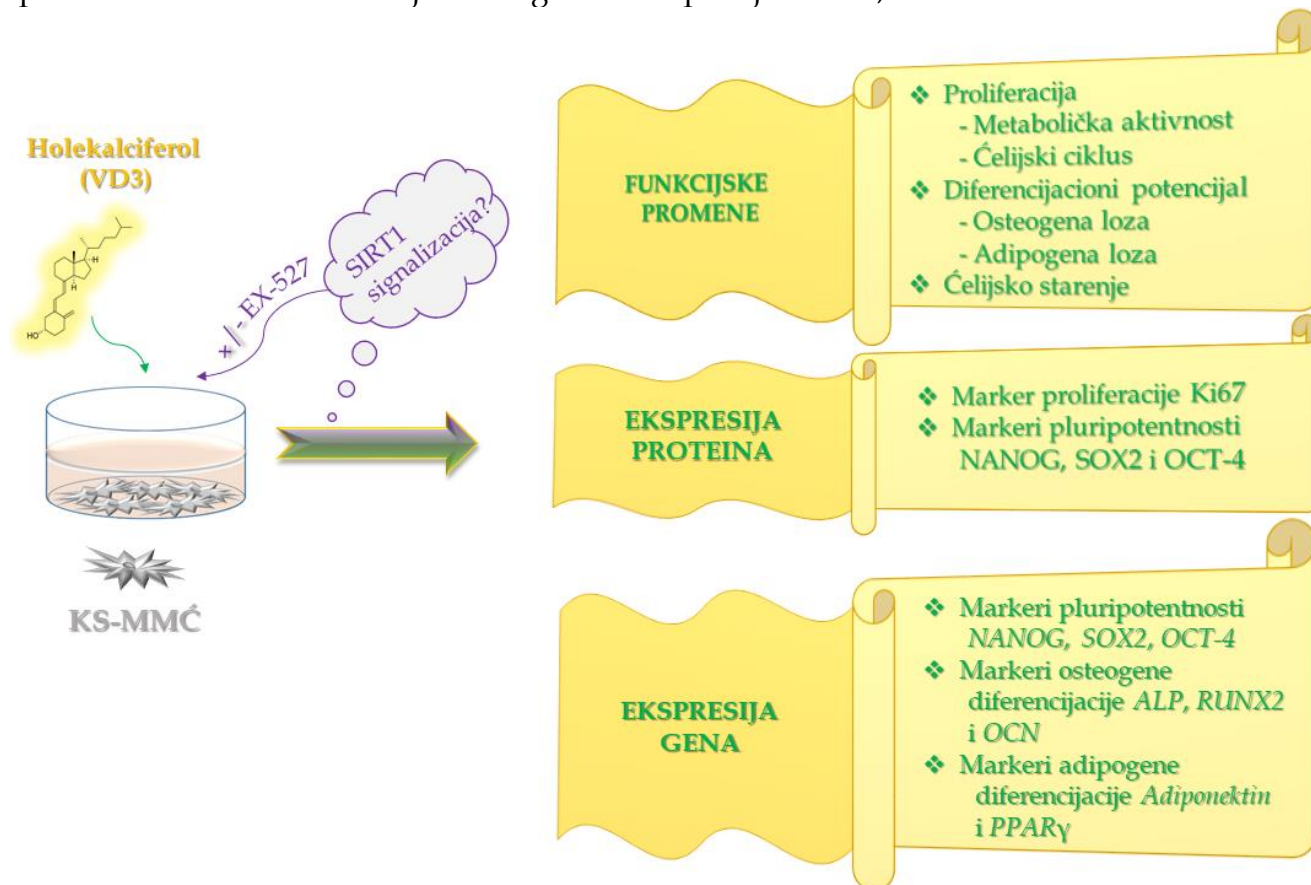


Slika 13. Shematski prikaz analize uticaja vitamina D3 na funkcije i signalizaciju KS-MMĆ povezanu sa regenerativnim potencijalom.

3.4.3. Ispitivanje učešća SIRT1 signalizacije u delovanju vitamina D3 na funkcije KS-MMĆ povezane sa regenerativnim potencijalom

U sklopu definisanja molekulskih mehanizama uključenih u delovanje VD3 na KS-MMĆ, ispitivano je učešće SIRT1 signalizacije u efektima VD3 na funkcije KS-MMĆ povezane sa regenerativnim potencijalom praćenjem metaboličke i proliferativne aktivnosti KS-MMĆ, njihovog ćelijskog ciklusa, procesa starenja i diferencijacionog potencijala. Za potrebe ovih ispitivanja, procena metaboličke aktivnosti i ćelijskog ciklusa KS-MMĆ vršena je posle 5 dana tretmana sa VD3 (10 nM i 20 nM) u kombinaciji bez ili sa 5 μ M EX-527 (6-hloro-2,3,4,9-tetrahidro-1H-karbazol-1-karboksamid, selektivni inhibitor SIRT1) primenom MTT testa, odnosno protočnom citometrijom nakon bojenja DNK propidijum jodidom. Paralelno je nakon istih tretmana ispitivan proces ćelijskog starenja analizom aktivnosti enzima β -galaktozidaze. U cilju analiziranja uticaja pretretmana sa VD3 na diferencijacioni potencijal KS-MMĆ, ćelije su najpre 5 dana tretirane sa VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa 5 μ M EX-527, nakon čega je indukovana diferencijacija ka osteogenoj ili adipogenoj lozi inkubacijom u odgovarajućim medijumima. Osteogeneza je potvrđivana posle 7 dana na osnovu reakcije ALP, odnosno nakon 21 dan detekcijom mineralizacije. Za procenu

adipogeneze nakon 28 dana utvrđivan je broj ćelija sa lipidnim telima. Ispitivanje povezanosti SIRT1 signalizacije sa delovanjem VD3 na ekspresiju gena povezanih sa diferencijacijom (*ALP*, *RUNX2*, *OCN*, *Adiponektin*, *PPAR γ*) vršeno je qPCR analizom uzoraka tretiranih 5 dana sa VD3 (10 mM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa 5 μ M EX-527. Nakon istih tretmana, proteinska ekspresija i lokalizacija markera pluripotentnosti/matičnosti (*NANOG*, *OCT-4*, i *SOX2*), kao i markera ćelijske proliferacije *Ki67*, određivana je u uzorcima KS-MMĆ imunofluorescentnim obeležavanjem, dok je qPCR korišćen za određivanje nivoa genske ekspresije *OCT-4*, *SOX2* i *NANOG*.



Slika 14. Shematski prikaz analize učešća SIRT1 signalizacije u delovanju vitamina D3 na funkcije KS-MMĆ povezane sa regenerativnim potencijalom.

3.5. PRIMENJENI METODI

3.5.1. Priprema uzoraka za elektronsku i svetlosnu mikroskopiju

Za potrebe elektronske mikroskopije odmah nakon aspiracije 1 mL KS uzorka je fiksiran u 2.5% rastvoru glutaraldehida u fosfatnom puferu (0.1 M, pH 7.2) tokom 4 h na +4°C.

KS-MMĆ gajene u kulturi pod standardnim uslovima su po dostizanju konfluentnosti u P4-P5 odlepljivane iz flaskova i brojane u Türk rastvoru. Odgovarajuća zapremina uzorka u kojoj se nalazilo 1×10^6 ćelija fiksirana je u 2.5% rastvoru paraformaldehida i 2.5% rastvoru glutaraldehida u fosfatnom puferu (0.1 M, pH 7.2), u odnosu 1:1 tokom 1.5 h na +4°C.

Po završetku fiksiranja, svi uzorci su 3 puta ispirani u PB, a zatim post-fiksirani u 1% rastvoru OsO₄ fosfatnom puferu (0.1 M, pH 7.2) tokom 2.5h na sobnoj temperaturi, u mraku. Uzorci su zatim dehidratirani kroz seriju etanola rastuće koncentracije (70%, 96%, 100%). Da bi se uzorci prosvetlili korišćen je propilen oksid, a zatim su ukalupljeni u Araldit smoli (Sigma-Aldrich) na temperaturi od 60 °C tokom 72h. Za analizu na nivou svetlosne mikroskopije korišćeni su polutanki preseki tkiva (debljine 1 µm) koji su montirani na predmetne pločice. Uzorci su analizirani svetlosnim mikroskopom Leica DMLB i fotografisani pripadajućom DFC295 digitalnom kamerom (Leica Microsystems, Nemačka). Ultratanki preseki (debljine 70-100 nm) montirani su na bakarne mrežice. Uzorci su zatim analizirani elektronskim mikroskopom Philips CM12 (Philips/FEI, Holandija) i fotografisani pripadajućom digitalnom kamerom SIS MegaView III (Olympus Soft Imaging Solutions, Nemačka).

3.5.2. Određivanje diferencijalnog sastava ćelija kosne srži

Na mikroskopskim pločicama pravljene su tanki razmazi uzoraka KS. Nakon sušenja (1-2 h) razmazi su bojani po metodi *May-Grunwald-Giemsa*. Zatim je pod svetlosnim mikroskopom (Olympus, Tokyo, Japan) analiziran ćelijski sastav KS (eritrociti, mijeloblasti, promijelociti, mijelociti, metamijelociti, zreli granulociti, monociti i limfociti).

3.5.3. Određivanje broja i vijabilnosti ćelija

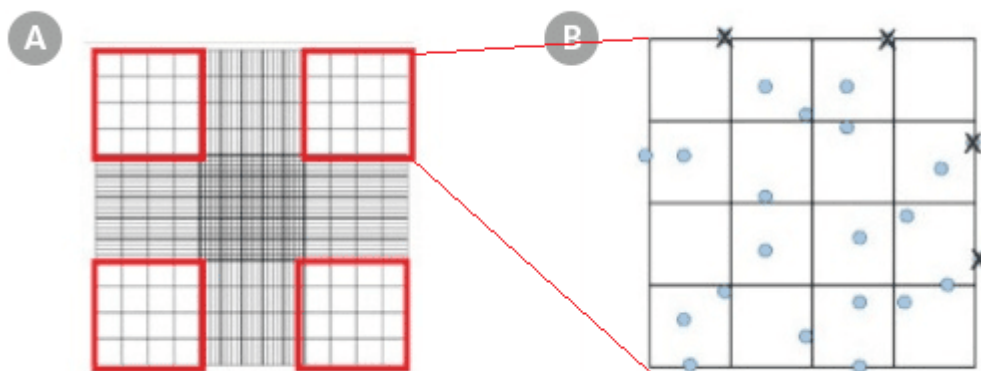
3.5.3.1. Određivanje broja ćelija bojenjem u Türk rastvoru

Ćelije resuspendovane u SM su izbrojane tako što je uzorkovano 10 µL suspenzije ćelija i dodavano 190 µL Türk rastvora. Nakon mešanja, uzorak je nanošen na hemocitometar, vodeći računa o tome da se ispod pokrovnog stakla ne formiraju mehurići vazduha. Ćelije su brojane posmatranjem pod svetlosnim mikroskopom (Olympus, Tokyo, Japan) (slika 15). Za određivanje koncentracije ćelija (broj ćelija/mL) korišćena je formula:

$$\text{Broj ćelija/mL} = \frac{n}{4} * 20 * 10^4$$

n – broj dobijen tako što je u okviru 4 polja (slika 15A) određivan broj ćelija u 16 kvadratića (slika 15B); 4 – broj polja u okviru kojih je određivan broj ćelija; 20 – razblaženje (ćelijska suspenzija je razblažena 20 puta – 10 µl ćelijske suspenzije + 190 µl Türk rastvora); 10⁴ – 1 ml = 1 cm³, a svaki od 9 „glavnih“ kvadrata hemocitometra ima zapreminu 0.1 mm³.

Da bi se utvrdio apsolutni broj ćelija, dobijena koncentracija ćelija je pomnožena sa ukupnom zapreminom ćelijske suspenzije.



Slika 15. Izgled dijagrama hemocitometra pod svetlosnim mikroskopom. Slika preuzeta sa linka <https://www.stemcell.com/how-to-count-cells-with-a-hemocytometer.html>

3.5.3.2. Određivanje vijabilnosti ćelija primenom boje Tripan plavo

Tripan plavo (Trypan blue) je vitalna boja koja boji u plavo samo mrtve ćelije, dok žive ćelije ostaju nebojene. Da bi se odredila vijabilnost ćelija, nakon centrifugiranja i resuspendovanja u SM uzorkovano je 10 μL suspenzije ćelija u koju je dodavano 90 μL 0.4% rastvora Tripan plavo boje, a zatim je ovako pripremljen uzorak dobro promešan i pažljivo nanošen na hemocitometar. Posmatranjem pod svetlosnim mikroskopom utvrđivan je broj živih ćelija (nebojene) i broj mrtvih ćelija (plave boje). Za određivanje procenta vijabilnosti korišćena je formula:

$$V = \frac{N}{T} * 100$$

V – procenat vijabilnosti (%); N – broj živih ćelija, dobijen tako što je u okviru 4 polja (slika 15A) određivan broj nebojenih ćelija u 16 kvadratića (slika 15B); T – ukupan broj ćelija (broj živih ćelija + broj mrtvih ćelija), dobijen tako što je u okviru 4 polja (slika 15A) određivan ukupan broj ćelija (nebojenih i obojenih u plavo) u 16 kvadratića (slika 15B)

3.5.4. Proliferacija KS-MMĆ

3.5.4.1. Procena vremena potrebnog za udvajanje populacije KS-MMĆ

Kako bi se utvrdilo koliko je vremena potrebno da se duplira broj KS-MMĆ u kulturi (PDT od eng. Population Doubling Time), u flaskove za kulturu ćelija zasejavano je $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ ćelija u SM. Ćelije su kultivisane u standardnim uslovima kultivacije, uz zamenu medijuma dva puta nedeljno. U trenutku dostizanja konfluentnosti ćelije su odlepljivane na prethodno opisan način (u odeljku 3.3.3.), a zatim je broj vijabilnih ćelija određivan primenom boje Tripan plavo. Nakon toga, u novi flask ćelije su zasejavane u koncentraciji $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$. Ovaj postupak je ponavljan tokom svakog pasažiranja zaključno sa pasažom broj 7. Za izračunavanje PDT korišćena je sledeća formula:

$$\text{PDT} = (\text{TT0}) \lg 2 / (\lg N_t - \lg N_0)$$

T-T0 – vreme koje je proteklo od zasejavanja do odlepljivanja ćelija (h); N0 – broj ćelija u trenutku zasejavanja; Nt – broj ćelija posle odlepljivanja.

3.5.4.2. *Određivanje vijabilnosti/metaboličke aktivnosti KS-MMĆ primenom MTT testa*

Radi analiziranja metaboličke aktivnosti KS-MMĆ korišćen je MTT test koji se zasniva na reakciji redukcije tetrazolijumske soli žute boje, MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol-2il)-2,5 difenil-tetrazolijum bromid), do formazana plave boje. Za odvijanje ove reakcije potrebna je aktivnost enzima mitohondrijalne sukcinat dehidrogenaze koji je prisutan kod vijabilnih, metabolički aktivnih ćelija. Za potrebe ovog testa KS-MMĆ su zasejavane u ploče za kulturu ćelija sa 96 bunarića u koncentraciji 1×10^3 i/ili 5×10^3 ćelija/bunaru. Da bi ćelije adherirale, inkubirane su tokom 24 h u standardnim uslovima kultivacije. Nakon odgovarajućih tretmana ćelijama je dodavan MTT (Sigma-Aldrich) u koncentraciji 5 mg/mL. Inkubacija je nastavljena tokom naredna 2 h. Po isteku ovog perioda plavi kristali formazana koji su se formirali rastvarani su dodavanjem 100 μ L izopropanola (VWR Chemicals, Francuska). Optička gustina, odnosno apsorpcija svetlosti talasne dužine 540 nm, očitavana je na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (LabSystems Multiskan PLUS, Nelsirki, Finland).

Zavisno od zadatog cilja analizirana je metabolička aktivnost KS-MMĆ u različitim eksperimentalnim uslovima. U cilju upoređivanja metaboličke aktivnosti KS-MMĆ različitih davalaca, MTT test je urađen nakon 24 h ili 48 h kultivacije KS-MMĆ u SM. Osim toga, za potrebe ispitivanja uticaja vitamina D3 na metaboličku aktivnost KS-MMĆ, ćelije su kultivisane tokom različitih vremenskih perioda (24 h, 48 h, 72 h, 5 dana, 7 dana) u SM u prisustvu vitamina D3 (VD3, holekalciferol) (Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, TX, USA) koncentracije 10 nM, 20 nM i 40 nM. U daljim ispitivanjima usmerenim na definisanje dejstva VD3 na metaboličku aktivnost KS-MMĆ i ulogu SIRT1 signalnog puta u pokazanim efektima, KS-MMĆ su kultivisane 5 dana u prisustvu VD3 (10 nM i 20 nM) sa ili bez 5 μ M EX-527 (Santa Cruz Biotechnologies). Kontrolnu grupu su u svim eksperimentima činile netretirane KS-MMĆ gajene u SM. Posle isteka odgovarajućih tretmana, metabolička aktivnost ćelija procenjivana je na prethodno opisani način.

3.5.4.3. *Određivanje klonogenog kapaciteta KS-MMĆ*

Klonogeni kapacitet KS-MMĆ analiziran je korišćenjem testa za detektovanje formiranja kolonija nalik fibroblastima, CFU-F test (od engl. Colony Forming Unit – Fibroblastic assay) i primenjen je za uporedne analize KS-MMĆ različitih davalaca, kao i pri ispitivanju potencijala VD3 da moduliše funkcije KS-MMĆ povezanih sa regenerativnim potencijalom. U sterilne ploče za kultivaciju ćelija sa 24 bunarića KS-MMĆ su zasejane u koncentraciji 250 ćelija/bunariću u SM. Zasejane KS-MMĆ su kultivisane 14 dana u standardnim uslovima kultivacije uz promenu medijuma 2 puta nedeljno. Za potrebe ispitivanja uticaja VD3 da moduliše klonogeni kapacitet KS-MMĆ, dodavan je VD3 (10 nM, 20 nM ili 40 nM) u SM. Nakon 14 dana kultivacije ćelije su ispirane sa PBS, fiksirane hladnim metanolom (Zorka, Šabac, Srbija) na sobnoj temperaturi 5 min, a zatim bojene 0.3% rastvorom boje Crystal Violet (Carlo Erba reagents S.A.S., Val de Reuil, Francuska) u trajanju od 15 minuta. Posle ispiranja destilovanom vodom određivan je broj kolonija posmatranjem pod invertnim svetlosnim mikroskopom (Olympus, Tokyo, Japan). Kolonijom je smatrana grupacija ćelija prečnika 2 mm ili više koja se sastojala od najmanje

50 ćelija. Efikasnost formiranja kolonija je izražavana u procentima, kao odnos broja kolonija i broja inicijalno zasejanih ćelija.

Za izračunavanje efikasnosti formiranja kolonija u jednom bunariću korišćena je formula:

$$E = \frac{CFU-F}{250} * 100$$

E - efikasnost formiranja kolonija (%); CFU-F - broj izbrojanih kolonija u jednom bunariću; 250 - broj inicijalno zasejanih ćelija

3.5.4.4. Analiza ćelijskog ciklusa KS-MMĆ

Uticaj tretmana sa VD3 i učešće SIRT1 signalnog puta u regulaciji ćelijskog ciklusa KS-MMĆ analiziran je protočnom citometrijom pomoću bojenja DNK propidijum jodidom. Ćelije su zasejavane u koncentraciji 1×10^5 ćelija/bunaru u sterilne ploče za kultivaciju ćelija sa 6 bunara i kultivisane u SM u standardnim uslovima. Nakon postizanja subkonfluentnosti ćelije su tretirane 5 dana sa VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μ M). Netretirane ćelije su služile kao kontrolna grupa. Po završetku tretmana KS-MMĆ su odlepljivane pomoću Tripsin-EDTA i ispirane centrifugiranjem tokom 10 min na 1400 rpm. Nakon toga, izdvojeni alikvoti od 2×10^5 ćelija su ispirani u PBS, fiksirani u ledeno hladnom apsolutnom etanolu i inkubirani tokom 40 min na 37°C u PBS sa dodatkom 50 μ g/mL propidijum jodida (Thermo Fisher Scientific), 0.1 mg/mL RNaseA (Thermo Fisher Scientific) i 0.1% Triton X-100 (Serva Electrophoresis GmbH). Rezultati su očitavani na protočnom citometru Cytomics FC 500 (Beckman Coulter).

3.5.4.5. Analiza procesa starenja KS-MMĆ

Za analizu procesa starenja ćelija korišćen je komercijalni set reagenasa Senescence Cells Histochemical Kit (Sigma-Aldrich), pomoću kog je praćen nivo ekspresije enzima β -galaktozidaze. Test se zasniva na reakciji u kojoj β -galaktozidaza dovodi do hidrolize 5-bromo-4-hloro-3-indol- β -D-galaktopiranozida (X-gal), pri čemu nastaju 5-bromo-4-hloro-3-hidroksiindol i galaktoza. Zatim dolazi do dimerizacije i oksidacije 5-bromo-4-hloro-3-hidroksiindola, pri čemu nastaje jedinjenje plave boje, 5,5'-dibromo-4,4'-dihloro-indigo. Detekcija promene boje ćelija ukazuje na ekspresiju β -galaktozidaze. Kako bi se utvrdio proces starenja KS-MMĆ, praćena je ekspresija enzima β -galaktozidaze na nivou pojedinačnih ćelija.

Za potrebe analize senescencije KS-MMĆ različitih donora, ćelije iz pasaža P5-P7 su zasejavane u ploču za kulturu ćelija sa 96 bunarića u SM u koncentraciji 2×10^3 ćelija/bunariću. Nakon 24 h kultivacije pod standardnim uslovima ćelije su fiksirane primenom 3.7% paraformaldehida i bojene prema uputstvu proizvođača. Ploča je ostavljena preko noći na sobnoj temperaturi, nakon čega je promena boje mogla biti detektovana. Kada je boja odstranjena, ćelije su ispirane PBS, a zatim analizirane i fotografisane na svetlosnom invertnom mikroskopu (Olympus, Japan). Radi kvantifikacije, u nekoliko različitih vidnih polja određivan je procenat ćelija koje su bile obojene, odnosno u kojima je detektovana ekspresija enzima β -galaktozidaze.

Pored toga, u određenim eksperimentima u kojima je procenjivan uticaj tretmana sa VD3 i učešće SIRT-1 signalizacije u regulaciji ćelijskog starenja, KS-MMĆ su zasejavane u koncentraciji 2×10^3 ćelija/bunariću u ploče za kulturu ćelija sa 48 bunarića. Tokom narednih

5 dana KS-MMĆ su tretirane sa VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa 5 μ M EX-527. Netretirane ćelije su korišćene kao kontrolna grupa. Po završetku tretmana ćelije su bojene i analizirane na prethodno opisan način.

3.5.5. Multipotentna diferencijacija

Za potrebe ispitivanja sposobnosti diferencijacije KS-MMĆ u osteogenu, adipogenu i hondrogenu ćelijsku lozu, KS-MMĆ su zasejavane u sterilne ploče sa 96 bunarića u SM u koncentraciji 5×10^4 ćelija po bunariću i inkubirane u standardnim uslovima kultivacije. SM je menjan 2 puta nedeljno do dostizanja subkonfluentnosti ćelija (70-80% popunjenosti bunarića). Tada je vršena zamena SM medijuma sa odgovarajućim medijumima za indukciju diferencijacije ćelija u tri ćelijske linije mezodermalnog porekla. Ćelije koje su i dalje kultivisane u SM služile su kao kontrolna grupa. Odgovarajući medijumi, kako standardni, tako i diferencijacioni, menjani su dva puta nedeljno sve do momenta detektovanja diferenciranih ćelija.

3.5.5.1. Osteogena diferencijacija

Za usmeravanje KS-MMĆ ka diferenciranju u osteogenom pravcu korišćen je osteogeni medijum (OM) pripremljen na prethodno opisan način (odjeljak 3.1.). Nakon 7 dana kultivacije u OM utvrđivana je sposobnost rane osteogeneze histohemijskim određivanjem aktivnosti alkalne fosfataze (ALP). Ćelije su najpre fiksirane primenom 3.7% formalina razblaženog u 90% metanolu, a potom ispirane PBS-om. Aktivnost ALP je određivana bojenjem 5-bromo-4-hloro-3-indol fostat/inozitol plavim tetrazolijumom (BCIP/NBT) (Sigma-Aldrich) u puferu alkalne fosfataze (0.1 M Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9.5) (100 μ L/bunariću) tokom 60 min na sobnoj temperaturi, a zatim je reakcija zaustavljena ispiranjem sa PBS. Detekcija ALP pozitivnih ćelija zasniva se na njihovoj sposobnosti hidrolize BCIP pri čemu dolazi do oslobađanja jona vodonika koji dalje redukuju NBT dajući NBT-formazan plave boje. Vizuelizacijom plavo obojenih ćelija detektovana je aktivnost ALP pod svetlosnim invertnim mikroskopom (Olympus, Tokyo, Japan).

Pored toga, kasna osteogena diferencijacija detektovana je nakon 21 dana kultivacije u OM. Ćelije su najpre fiksirane, a zatim bojene bojom Alizarin crveno (2% *Alizarin red*, Merck Chemicals, Darmstadt, Nemačka) na sobnoj temperaturi tokom 30 min, nakon čega su ćelije ispirane PBS-om. Ova boja se vezuje za kalcijum koji se nalazi u vanćelijskom matriksu, te je stepen mineralizacije procenjivan na osnovu vizuelne detekcije depozita kalcijuma i mineralizacije matriksa pod svetlosnim invertnim mikroskopom.

Stepen rane i kasne osteogene diferencijacije je dodatno kvantifikovan denzitometrijski primenom programa NIH ImageJ software (v.1.46r, LOCI; University of Wisconsin, Madison, WI, USA).

Osteogena diferencijacija KS-MMĆ analizirana je u različitim eksperimentalnim uslovima. U cilju upoređivanja osteogenog kapaciteta KS-MMĆ različitih davalaca, ćelije su kultivisane u OM tokom 7 i 21 dan, dok su kontrolne grupe inkubirane u istom periodu samo u SM. Pored toga, da bi se ispitao uticaj VD3 na osteogeni potencijal KS-MMĆ, zasejane ćelije su tokom indukcije osteogene diferencijacije u OM tretirane sa VD3 (koncentracije 10 nM i 20 nM) tokom 7 i 21 dana. Kontrolne grupe su bile ćelije inkubirane bez VD3. U daljim ispitivanjima uticaja pretretmana VD3 na osteogenu diferencijaciju KS-MMĆ, ćelije su najpre tretirane sa VD3 (koncentracije 10 nM i 20 nM) u kombinaciji bez ili

sa EX527 (koncentracija 5 μ M) u SM tokom 5 dana, a zatim inkubirane u OM tokom odgovarajućeg vremenskog perioda. Kao kontrolna grupa služile su ćelije koje nisu pretretirane sa VD3. Posle završetka tretmana, aktivnost ALP i stepen mineralizacije su detektovani na prethodno opisan način.

3.5.5.2. Hondrogena diferencijacija

Indukcija hondrogene diferencijacije KS-MMĆ vršena je kultivacijom ćelija u hondrogenom medijumu (HM) koji je pripremljen na prethodno opisan način (odjeljak 3.1.). Za potrebe ispitivanja hondrogenog potencijala diferencijacije KS-MMĆ različitih donora, ćelije su kultivisane u HM tokom 21 dan, dok su kontrolne grupe inkubirane u SM. Posle 21 dana kultivacije, ćelije su ispirane PBS-om, a zatim fiksirane 3.7% formalinu razblaženom u 90% metanolu. Po završetku fiksiranja, 1% sirćetna kiselina je korišćena za ispiranje fiksiranih ćelija. KS-MMĆ su bojene Safranin O bojom (Merck Chemicals) tokom 5 min na sobnoj temperaturi, a zatim ispirane sa PBS. Posmatranjem pod svetlosnim invertnim mikroskopom (Olympus Tokyo, Japan) potvrđivana je hondrogena diferencijacija na osnovu stepena obojenosti glikozaminoglikana, proteoglikana specifičnih za vanćelijski matriks tkiva hrskavice. Kako bi se kvantifikovao stepen hondrogene diferencijacije denzitometrijom korišćen je program NIH ImageJ software (v.1.46r, LOCI; University of Wisconsin, Madison, WI, USA).

3.5.5.3. Adipogena diferencijacija

Diferencijacija KS-MMĆ u pravcu adipogene loze izvedena je korišćenjem adipogenog medijuma (AM) pripremljenog na prethodno opisan način (odjeljak 3.1.) u kojem su KS-MMĆ gajene tokom 28 dana. Nakon 28 dana inkubacije ćelije su ispirane PBS-om i fiksirane 3.7% paraformaldehidom u PBS. U cilju detekcije adipogene diferencijacije, ćelije su bojene Oil-Red-O bojom (Merck Chemicals) na sobnoj temperaturi tokom 60 min. Da bi se bojenje obustavilo ćelije su ispirane sa PBS. Pod svetlosnim invertnim mikroskopom (Olympus Tokyo, Japan) vizuelizovana su obojena unutarćelijska lipidna tela čime je potvrđivana adipogena diferencijacija. Kvantifikacija adipogene diferencijacije vršena je brojanjem ćelija koje sadrže lipidna tela i određivanjem njihove procentualne zastupljenosti u odnosu na ukupan broj analiziranih ćelija.

Za potrebe uporednih ispitivanja KS-MMĆ različitih donora, ćelije su kultivisane u AM tokom 28 dana, dok su kontrolne grupe inkubirane u SM. Pored toga, da bi se ispitaio uticaj VD3 na adipogeni kapacitet KS-MMĆ, ćelije su inkubirane u AM u prisustvu VD3 (koncentracije 10 nM i 20 nM) tokom 28 dana, dok su kontrolne grupe bile inkubirane bez VD3. Radi analiziranja uticaja pretretmana sa VD3 na adipogenu diferencijaciju KS-MMĆ, ćelije su najpre tretirane sa VD3 (koncentracije 10 nM i 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX527 (koncentracija 5 μ M) u SM tokom 5 dana, a zatim inkubirane u AM tokom 28 dana. Kontrolna grupa nije pretretirana sa VD3.

3.5.6. Analiza ćelijskih proteina imunofluorescentnim obeležavanjem ćelija

U cilju analize ekspresije specifičnih površinskih markera koji su neophodni za karakterizaciju KS-MMĆ, kao i utvrđivanja ekspresije i lokalizacije određenih proteina unutar ovih ćelija, korišćeni su metodi direktnog i indirektnog fluorescentnog obeležavanja.

Rezultati su analizirani metodom protočne citometrije ili upotrebom epifluorescentnog mikroskopa (Olympus, Tokyo, Japan). Za potrebe protočne citometrije korišćen je Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD) citometar, a analize su vršene pomoću softvera WinMDI 2.9 (J. Trotter, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA) i NovoExpress 1.2.4 software (Agilent, Santa Clara, CA, SAD).

3.5.6.1. Analiza površinskih antigena protočnom citometrijom

Za potrebe imunofenotipske karakterizacije KS-MMĆ različitih davalaca, ćelije su kultivisane u SM pod standardnim uslovima kultivacije. Ćelije pasaža P2-P7 su po dostizanju 90% konfluentnosti odlepljivane pomoću 1 mL akutaze (Biowest, Nuaille, Francuska) kako se ne bi narušila struktura proteina koji se analiziraju. Zatim su ćelije ispirane hladnim PBS i centrifugirane (10 min, 1600 rpm). Koncentracija i broj ćelija utvrđivani su brojanjem u rastvoru Tripan plavo, a zatim razlivane u alikvote od po 2×10^5 ćelija za svako od ispitivanih antitela. Da bi se sprečilo nespecifično vezivanje antitela, ćelijske suspenzije su inkubirane u hladnom PBS sa dodatkom 0.5% goveđeg serum albumina (BSA, eng. *Bovine Serum Albumine*), (Sigma-Aldrich) na sobnoj temperaturi tokom 30 min. Nakon ispiranja centrifugiranjem (10 min, 1600 rpm), KS-MMĆ su prikupljene i inkubirane sa primarnim monoklonskim mišjim anti-humanim antitelima konjugovanim sa fluorescentnim markerima PE, Cy5-PE i FITC i to za površinske ćelijske markere: CD29, CD73, CD90, CD105, CD45 i HLA-DR (Tabela 2). Nivo nespecifičnog vezivanja antitela određen je upotrebom odgovarajućih izotipskih kontrola (Tabela 3). Svako od navedenih antitela dodavano je u odnosu 1:100, nakon čega je sledila inkubacija u mraku tokom 30 min na $+4^{\circ}\text{C}$. Višak antitela je potom ispiran u PBS centrifugiranjem (10 min, 1600 rpm). Za fiksiranje je korišćen 3.7% paraformaldehid u PBS, a fiksirane ćelije su čuvane u mraku na $+4^{\circ}\text{C}$ do trenutka očitavanja rezultata.

3.5.6.2. Analiza ekspresije markera proliferacije Ki67 protočnom citometrijom

U određenim eksperimentima u kojima je procenjivan uticaj tretmana sa VD3 i potencijalna uloga SIRT1 signalizacije u regulaciji proliferativnog statusa KS-MMĆ analizirana je ekspresija markera proliferacije Ki67 metodom protočne citometrije. U te svrhe, KS-MMĆ su zasejavane u ploče sa 6 bunara u SM u koncentraciji 1×10^5 ćelija/bunaru i gajene u SM u standardnim uslovima kultivacije. Nakon dostizanja subkonfluentnosti, KS-MMĆ su tretirane tokom 5 dana sa VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μM). Posle ovog perioda ćelije su odlepljene sa Tripsin-EDTA i centrifugirane (10 min na 1400 rpm). Za dalju analizu odvajani su alikvoti sa 2×10^5 ćelija. Posle ispiranja u PBS centrifugiranjem na 1400 rpm tokom 10 min, ćelije su fiksirane u 5% formaldehidu tokom 15 min na sobnoj temperaturi. U sledećem koraku fiksirane ćelije su ispirane centrifugiranjem (1400 rpm/10min) u hladnom PBS sa dodatkom 0.5% BSA. Da bi došlo do permeabilizacije ćelija uzorci su nakon toga inkubirani na ledu tokom 30 min u rasvoru koji je pored PBS sa 0.5% BSA sadržao i 0.1% Triton X-100 (Serva Electrophoresis GmBh). Nakon permeabilizacije uzorci su ispirani dva puta centrifugiranjem (1400 rpm/10 min), a zatim inkubirani u PBS sa 0.5% BSA u trajanju od 15 min na sobnoj temperaturi sa ciljem sprečavanja nespecifičnog vezivanja proteina. Zatim je dodavano primarno monoklonsko zečije anti-humano anti-Ki67 antitelo (Tabela 2). Inkubacija je vršena na sobnoj temperaturi, a po isteku 2 h višak nevezanih primarnih antitela ispiran je dodavanjem PBS sa 0.5% BSA centrifugiranjem (1400 rpm/10 min). U sledećem koraku dodavano je sekundarno anti-

žečije FITC konjugovano antitelo (Tabela 3), a inkubacija je trajala 1 h na sobnoj temperaturi. U završnom koraku uzorci su ispirani u PBS-u sa 0.5% BSA, a zatim su ćelije resuspendovane u 0.5 mL PBS. Pored protočne citometrije, u cilju analize subćelijske lokalizacije Ki67 proteina korišćena je epifluorescentna mikroskopija pri čemu su uzorci pripremani na način opisan u narednom odeljku.

3.5.6.3. Ispitivanje ekspresije i lokalizacije proteina epifluorescentnim mikroskopom

Za potrebe indirektno imunofluorescence KS-MMĆ su zasejavane na staklene ljušpice u koncentraciji 3×10^3 ćelija/ljušpici. Da bi ćelije adhererirale za podlogu kultivisane su tokom 24 h u SM, a zatim su adherente ćelije ispirane sa PBS i fiksirane u 4% paraformaldehidu u PBS. Za permeabilizaciju membrana radi omogućivanja detekcije unutarćelijskih proteina uzorci su inkubirani sa 0.1% Triton X-100 u PBS tokom 5 min, a zatim u PBS sa 1% BSA tokom 30 min kako bi se sprečilo nespecifično vezivanje proteina. U narednom koraku dodavano je odgovarajuće primarno antitelo (Tabela 2), a inkubacija je trajala 1 h na sobnoj temperaturi. Da bi se odstranio višak nevezanih primarnih antitela, ćelije su ispirane sa PBS. Sledila je dvočasovna inkubacija sa odgovarajućim sekundarnim antitelom konjugovanim FITC ili Alexa Fluor 555 fluorescentnim bojama (Tabela 3) na sobnoj temperaturi u mraku. Kako bi se omogućila detekcija jedara ćelija u rastvor sekundarnih antitela dodavana je boja 4',6-diamidin-2-fenilindol (DAPI) (Sigma Aldrich) finalne koncentracije 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Za ispiranje ćelija od viška sekundarnih antitela korišćen je PBS i destilovana voda. Na predmetna stakla je nanošen medijum za montiranje uzoraka pripremljenih za imunofluorescencu, a zatim su ljušpice sa ćelijama postavljane na predmetna stakla. Ekspresija i lokalizacija ispitivanih proteina detektovana je i fotografisana upotrebom epifluorescentnog mikroskopa i odgovarajućeg softvera (Olympus, Tokio, Japan).

U eksperimentima u kojima je analiziran uticaj tretmana sa VD3 i učešće SIRT1 signalizacije u regulaciji ekspresije i lokalizacije ispitivanih proteina, ćelije su nakon zasejavanja i 24 h kultivacije u SM tretirane tokom narednih 5 dana sa VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μM). Kao kontrolna grupa korišćene su netretirane ćelije. Tretman je obustavljan ispiranjem 2 puta sa PBS, a ćelije su fiksirane u 4% formaldehidu u PBS. Uzorci su dalje obeležavani i analizirani na prethodno opisan način.

3.5.7. Genska ekspresija

Promena ekspresije specifičnih gena u KS-MMĆ pod uticajem tretmana sa VD3 i učešće SIRT1 signalizacije u regulaciji ekspresije ovih gena, analizirana je qPCR metodom. Najpre je nakon tretmana iz uzoraka izolovana ukupna informaciona RNK (iRNK) na osnovu koje je sintetisana komplementarna DNK (kDNK), a zatim su se u reakciji kvantitativne lančane polimeraze (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*, qPCR) umnožavali geni od interesa primenom specifičnih prajmera.

3.5.7.1. Izolacija ukupne RNK

Da bi se sprečila kontaminacija i degradacija uzoraka za potrebe izolacije ukupne RNK korišćen je specifičan plastični potrošni materijal bez ribonukleaza i dezoksiribonukleaza (eng. *Dnase/Rnase-free*). Svi postupci su rađeni u sterilnim uslovima.

KS-MMĆ su zasejavane u ploče za kultivaciju ćelija sa 6 bunara u koncentraciji 1×10^5 ćelija/bunaru i kultivisane u standardnim uslovima kultivacije u SM do dostizanja subkonfluentnosti. Zatim je započinjan tretman sa VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μ M) u trajanju od 5 dana. Posle završetka tretmana ćelije su ispirane pomoću PBS, a zatim je dodavan hladan, komercijalno dostupan reagens za izolaciju RNK, TRIzol (Thermo Fisher Scientific). Inkubacija ćelija TRizolom (1 mL/bunaru) trajala je 5 min, a vršena je na sobnoj temperaturi. Da bi liza ćelija bila potpuna, ćelije su nakon inkubacije mešane, a zatim prebacivane u mikrotubice od 1.5 mL. Zatim je u mikrotubice dodavano 0.2 mL hloroforma (VWR Chemicals, Francuska), tokom 15 sekundi uzorci su snažno mešani, a zatim inkubirani na sobnoj temperaturi u trajanju od 10 min. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani na $+4^\circ\text{C}$ na 12 000 g tokom 15 min. Posle centrifugiranja u mikrotubicama su bile primetne tri razdvojene faze – gornja, vodena faza u kojoj se nalazi RNK, srednja, bela faza u kojoj se nalazi DNK i donja, crvena faza u kojoj se nalaze proteini i lipidi. U nastavku je 350 μ L gornje, vodene faze, prebacivano u nove mikrotubice, pri čemu je pipetiranje veoma pažljivo izvođeno kako ne bi došlo do slučajne kontaminacije sa DNK. Zatim je vršena precipitacija RNK dodavanjem 500 μ L izopropanola i centrifugiranjem na 12 000 g tokom 20 min na $+4^\circ\text{C}$. Po završetku centrifugiranja odlivan je izopropanol, a RNK je rastvarana u 75% etanolu. Sledilo je centrifugiranje (12 000 g / 8 min) na $+4^\circ\text{C}$, a zatim je tečna faza pažljivo odstranjivana, kako bi sav etanol ispario. Na osušene taloge RNK je dodavano 20 μ L destilovane vode koja sadrži DEPC (dietil pirokarbonat) (Thermo Fisher Scientific) koji inaktivira ribonukleaze u cilju sprečavanja degradacije RNK molekula. Za određivanje koncentracije i čistoće RNK korišćen je spektrofotometar (Implen, Munich, Nemačka). Uzorci izolovane RNK su nakon toga čuvani zamrzavanjem na -70°C .

3.5.7.2. Reverzna transkripcija

Prethodno izolovana ukupna RNK prevođena je u komplementarnu DNK (kDNK) upotrebom komercijalno dostupnog kita namenjenog za reverznu transkripciju (eng. *RevertAid TM Hminus First Strand cDNA Synthesis Kit*, Fermentas, Life Science, SAD) i oligo dT prajmera. Po uputstvu proizvođača pravljena je smeša 2 μ g izolovane RNK, 1 μ L oligo dT prajmera i destilovane vode, tako da ukupna zapremina smeše bude 12.5 μ L. Reakcija je izvođena pomoću *Mastercycler personal* aparata (Eppendorf, Nemačka). Da bi došlo do vezivanja oligo dT prajmera za poliA kraj iRNK smeša je inkubirana na 65°C u periodu od 5 min. Zatim je temperatura snižavana na 25°C , a uzorcima dodavana osnovna mešavina sačinjena od smeše dezoksiribonukleotida (dNTP miks), reverzne transkriptaze, inhibitora ribonukleaze i 5 puta koncentrovanog pufera za reverznu transkripciju. Kako bi se postigli optimalni uslovi za aktivnost reverzne transkriptaze reakcija je nastavljena na 42°C u trajanju od 1 h. Da bi se reakcija obustavila temperatura je podizana na 70°C tokom 10 min. Komplementarna DNK sintetisana na ovaj način korišćena je dalje u reakciji lančane polimeraze.

3.5.7.3. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu (Real time-PCR, qPCR)

Na osnovu sintetisane kDNK i odgovarajućih komercijalno dostupnih prajmera za specifične DNK sekvence vršena je amplifikacija qPCR metodom. Za qPCR reakciju korišćen je komercijalno dostupan Fast SYBR® Green Master Mix (2X) (Applied Biosystems, Kalifornija, SAD). Kit sadrži fluorescentnu boju SYBR Green I, enzime DNK polimerazu (AmpliTaq® Fast DNA Polymerase, Ultra Pure) i uracil-DNK glikozilazu (Uracil-DNA

Glycosylase, UDG), ROX boju (ROX™ dye Passive Reference), dNTP i odgovarajući pufer za PCR reakciju. Za svaku reakciju korišćeno je 10 µL reakcione smeše koja se sastojala od 5 µL Fast SYBR Green Master Mix (2X), 2,5 µL odgovarajućeg para prajmera (500 nM forward prajmer + 500 nM reversed prajmer) (Tabela 6), 2 µL (10 ng) kDNA i 0,5 µL vode bez nukleaza (Thermo Fisher Scientific). Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu odigravala se u termobloku aparata za qPCR (Mic qPCR, Bio Molecular Systems, Australija). Uslovi amplifikacije bili su sledeći: inicijalna denaturacija 20 min na 95°C, zatim 40 ciklusa koji su se sastojali od koraka denaturacije DNK lanaca 3s na 95°C i koraka vezivanja prajmera i elongacije lanaca od 30s na 60°C, pri čemu se ciklus topljenja odigravao u temperaturnom opsegu od 72°C do 95°C brzinom 0.3°C/s. Ekspresija konstitutivno eksprimiranog (eng. *housekeeping*) gena za gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu (*GAPDH*) analizirana je kao kontrola pri proceni nivoa ekspresije umnožavanog gena od interesa za svaki uzorak. Kao negativna kontrola korišćene su smeše u kojima je umesto kDNK bila dodata voda bez nukleaza. Kvantifikacija relativne ekspresije gena vršena je primenom $\Delta\Delta C_t$ metoda, na osnovu podataka dobijenih softverskom analizom (micPCR v2.10.0) gde ΔC_t predstavlja razliku C_t vrednosti gena od interesa i gena za *GAPDH*.

Tabela 6. Sekvence korišćenih prajmera za qPCR.

Gen	Sekvenca (5'-3')
<i>GAPDH</i>	F: GAAGGTGAAGGTCGGAGT
	R: GAAGATGGTGATGGGATTTC
<i>ALP</i>	F: CACCCACGTCGATTGCATCT
	R: TAGCCACGTTGGTGTTGAGC
<i>OCN</i>	F: GGCGCTACCTGTATCAATGG
	R: TCAGCCAACTCGTCACAGTC
<i>RUNX2</i>	F: GCCTAGGCGCATTTCAGA
	R: CTGAGAGTGGAAGGCCAGAG
<i>NANOG</i>	F: GATGCCTCACACGGAGACTG
	R: GCAGAAGTGGGTTGTTTGCC
<i>OCT-4</i>	F: TGAGTAGTCCCTTCGCAAGC
	R: GCTTCGGATTTTCGCCTTCTC
<i>SOX2</i>	F: GACAGTTACGCGCACATGAA
	R: TAGGTCTGCGAGCTGGTCAT
<i>SIRT1</i>	F: TGCTGGCCTAATAGAGTGGCA
	R: CTCAGCGCCATGGAAAATGT
<i>Adiponektin</i>	F: CCTGGTGAGAAGGGTGAGAA
	R: CAATCCCACACTGAATGCTG
<i>PPARγ</i>	F: CAGGAAAGACAACAGACAAATCA
	R: GGGGTGATGTGTTTGAACCTG

3.5.8. Statistička analiza rezultata

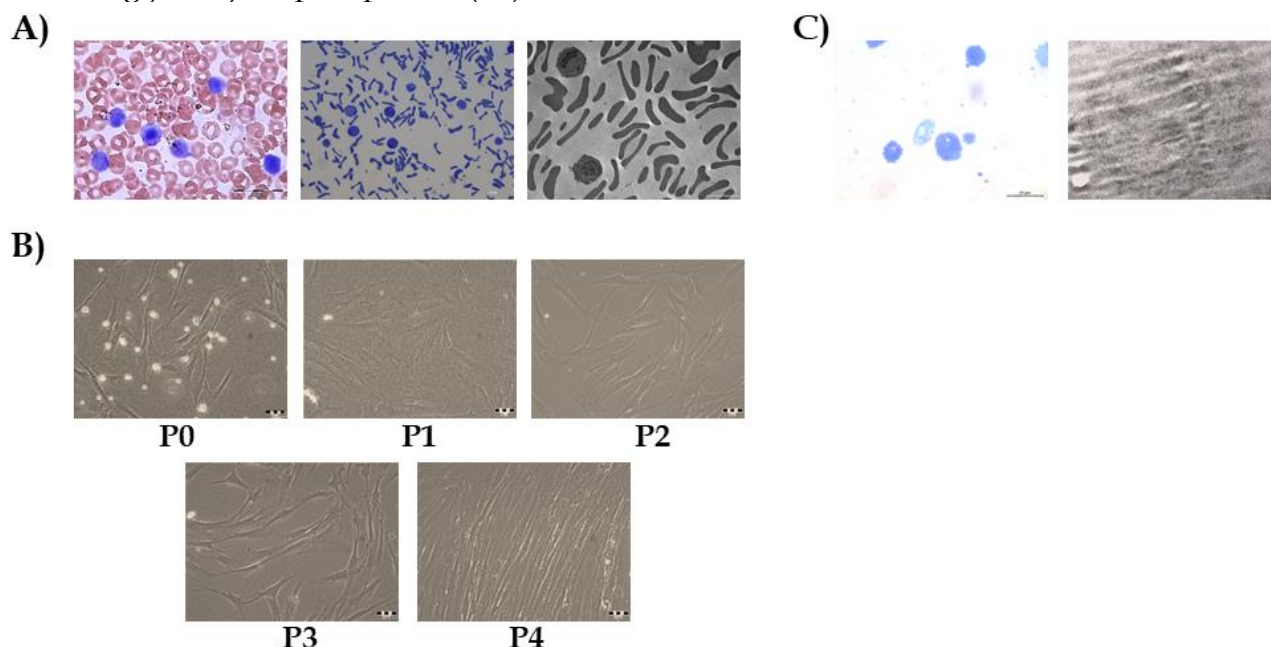
Svi eksperimenti su izvođeni najmanje 3 puta. Prikazani su reprezentativni rezultati u vidu srednjih vrednosti \pm standardna greška (eng. *Standard Error of the Mean, SEM*). Za statističku analizu rezultata korišćen je Studentov t test u programu GraphPad Prism 7

(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), a vrednosti $p < 0.05$ su smatrane statistički značajnim (* za $p < 0.05$; ** za $p < 0.01$; *** za $p < 0.001$).

4. REZULTATI

4.1. IZOLOVANJE I KULTIVACIJA MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA IZ KOSNE SRŽI

Mezenhimske matične ćelije (MMC) uspešno su izolovane iz uzoraka kosne srži (KS) svih 5 davaoca uzrasta 2-12 godina. Kao što se može videti na Slici 16 A, u uzorcima sveže KS bilo je dominantno prisustvo eritrocita. Iz uzoraka KS najpre su izolovane monojedarne ćelije, koje su zatim zasejavane u flaskove za kultivaciju ćelija. MMC su od ostalih monojedarnih ćelija izdvojene na osnovu sposobnosti adhezije za površinu plastičnih flaskova za kultivaciju. Tokom prvih dana kultivacije posmatranjem pod inverznim mikroskopom primećeno je da u svim uzorcima ćelije izgledaju heterogeno. Većinu su činile okrugle, svetle, neadherentne ćelije, a u svim uzorcima je uočeno i prisustvo adherentnih, poligonalnih, vretenastih ćelija (Slika 16 B). Medijum je menjan na svaka 2-3 dana, a prilikom tog postupka zajedno sa medijumom odstranjivane su i neadherentne ćelije. Posle 7-10 dana kultivacije pod standardnim uslovima (37°C, 5% CO₂, 100% vlažnost) i redovnog menjanja medijuma na svaka 2-3 dana, uočeno je da dominantnu populaciju ćelija čine adherentne ćelije (Slika 16 B) Tokom narednih dana kultivacija je nastavljena pod standardnim uslovima, a primećeno je da se ćelije brže umnožavaju. Oko 14 dana posle zasejavanja ćelije su formirale uniforman sloj i pokrivale oko 80-90% površine flaska (subkonfluentna popunjenost). Tokom sledećih pasaža adherentne ćelije su dostizale subkonfluentnost za 7-14 dana. Po dostizanju konfluentnosti ćelije su odlepljivane i pasažirane na način opisan u Materijalu i metodima, a na Slici 16 C može se videti morfoloģija ćelija iz pete pasaže (P5).



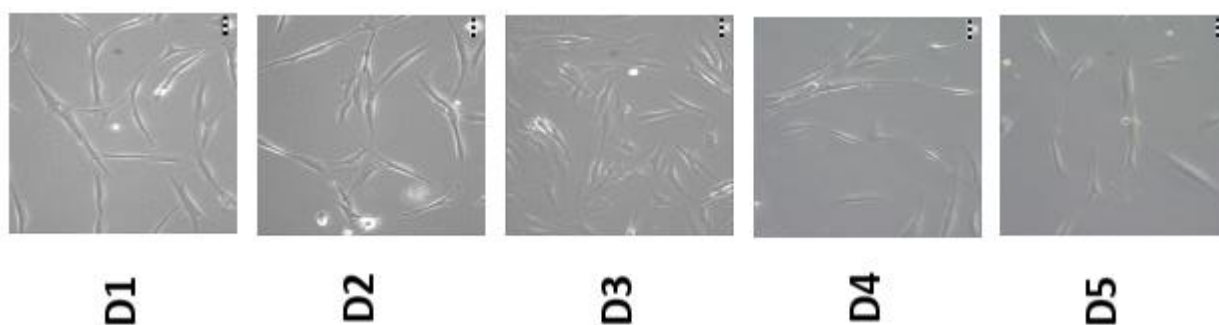
Slika 16. Morfoloģski izgled svežih uzoraka KS i izolovane adherentne ćelijske populacije. A) Reprezentativne slike na kojima je prikazan morfoloģski izgled svežih uzoraka KS – razmaz pune KS posle May-Grunwald-Giemsa bojenja (levo), kao i ukalupljeni uzorci na nivou svetlosne (sredina) i elektronske (desno) mikroskopije. Vrednost razmere: za slike razmaza KS i svetlosne mikroskopije 20 μm ; za sliku elektronske mikroskopije 5 μm . B) Izgled ćelija tokom razliĉitih pasaža (P). Prikazane su reprezentativne slike inverzne svetlosne mikroskopije. Vrednost razmere: 50 μm . C) Reprezentativne slike na kojima je prikazan morfoloģski izgled ćelija iz kulture na nivou svetlosne (levo) i elektronske (desno) mikroskopije. Vrednost razmere: za sliku svetlosne mikroskopije 20 μm ; za sliku elektronske mikroskopije 2 μm .

4.2. KARAKTERIZACIJA I UPOREDNA ANALIZA MEZENHIMSKIH MATIČNIH ĆELIJA IZOLOVANIH IZ KS RAZLIČITIH DAVALACA

Nakon uspješne izolacije i ekspanzije *in vitro* adherentnih ćelija svih davalaca, ispitivano je da li ove ćelije ispunjavaju minimalne kriterijume za karakterizaciju MMĆ definisane od Komiteta za tkivne i mezenhimske matične ćelije Međunarodnog udruženja za ćelijsku terapiju (sinonim Komitet) u cilju potvrde njihove MMĆ prirode. Paralelno je analizirano da li postoje razlike između davalaca po pitanju ovih karakteristika KS-MMĆ. Sa tim ciljem vršena je uporedna analiza morfologije adherentnih ćelija, njihovog imunofenotipa, diferencijacionog i proliferativnog potencijala, klonogenog kapaciteta, kao i ekspresije markera pluripotentnosti. Na osnovu rezultata navedenih analiza potvrđeno je da ćelije izolovane iz KS svih davalaca uzrasta 2-12 godina ispunjavaju kriterijume neophodne za karakterizaciju KS-MMĆ, pri čemu su uočene sličnosti u svim ispitivanim karakteristikama između davalaca.

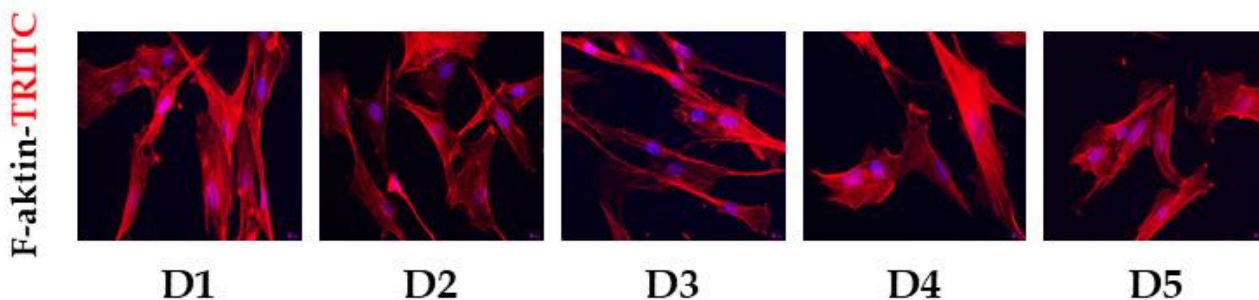
4.2.1. Morfološke karakteristike KS-MMĆ zdravih davalaca

Rezultati uporedne analize morfologije izolovanih adherentnih ćelija iz KS zdravih davalaca uzrasta 2-12 godina pokazali su morfologiju sličnu fibroblastima, tipičnu za MMĆ kod svih davalaca (Slika 17). Ovu morfologiju ćelije su zadržavale i tokom dugotrajne kultivacije, a razlike u izgledu ćelija različitih davalaca nisu bile uočljive. Ovi nalazi su potvrdili da ćelije izolovane iz KS svih davalaca ispunjavaju prvi kriterijum Komiteta za karakterizaciju MMĆ.



Slika 17. Morfološki izgled KS-MMĆ zdravih davalaca. Prikazane su reprezentativne slike ćelija u petoj pasaži. Vrednost razmere: 50 μ m.

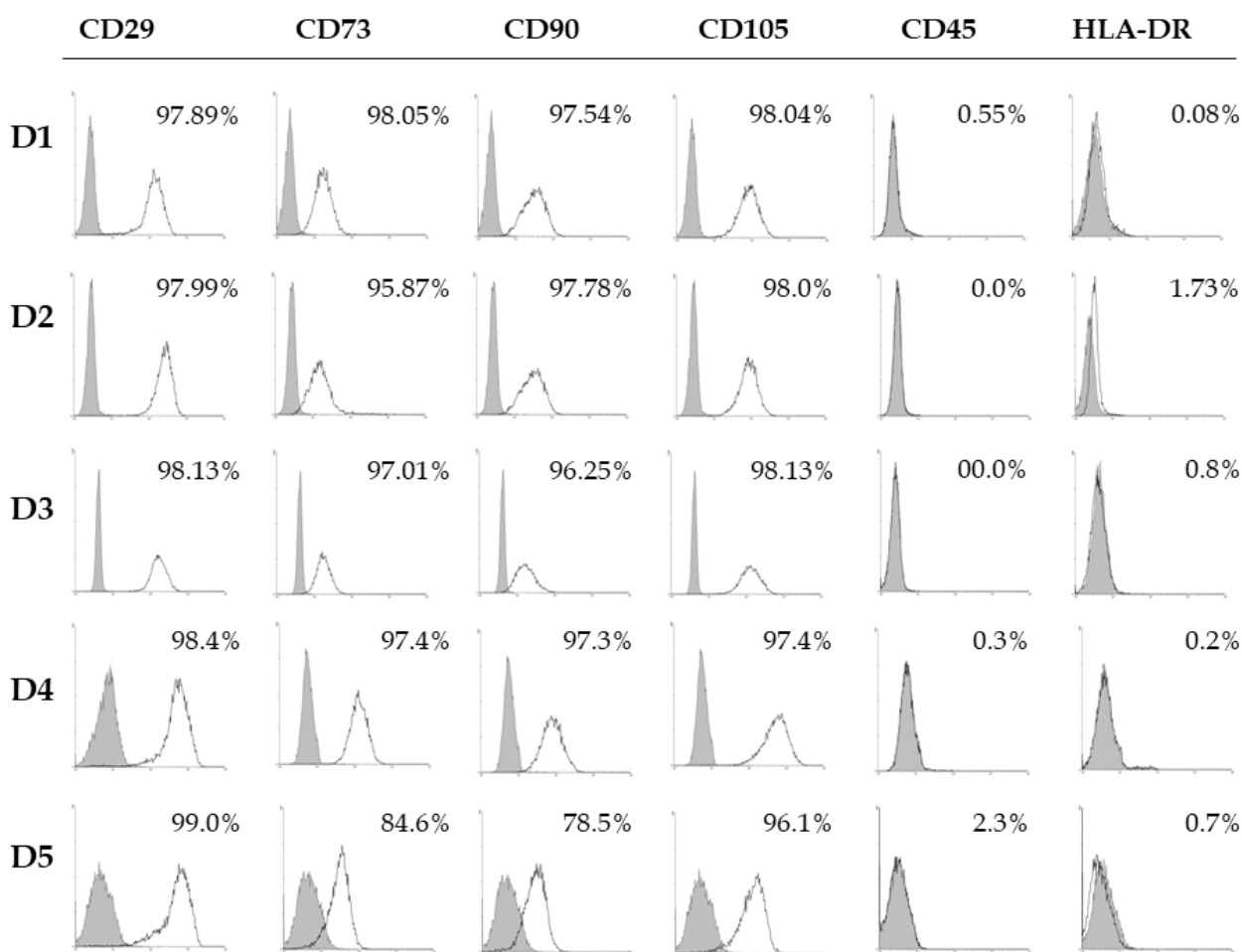
Dodatno je, sa ciljem utvrđivanja organizacije citoskeleta KS-MMĆ i procene razlika između davalaca, imunofluorescentnim obeležavanjem određivana unutarćelijska ekspresija i lokalizacija citoskeletnog proteina, F-aktina (Slika 18). Rezultati su ukazali da KS-MMĆ svih davaoca imaju sličnu organizaciju F-aktina potvrđujući i na taj način sličnost morfoloških karakteristika izolovanih KS-MMĆ.



Slika 18. Ekspresija i organizacija F-aktina u KS-MMĆ zdravih davalaca. KS-MMĆ su zasejavane na ljuspice postavljene u ploče za kulturu ćelija sa 24 bunarića, u koncentraciji 3000 ćelija/ljuspici i kultivisane tokom 24 h u standardnim uslovima kako bi adherirale. Zatim je vršeno imunofluorescentno bojenje za F-aktin (crveno), dok su jezdra ćelija bojena fluorescentnom DAPI bojom (plavo). Predstavljene su reprezentativne fotografije sa epifluorescentnog mikroskopa. Vrednost razmere: 20 μ m.

4.2.2. Imunofenotip KS-MMĆ zdravih davalaca

U sledećem koraku, metodom protočne citometrije utvrđeno je da ćelije izolovane iz KS svih davalaca poseduju imunofenotipske karakteristike MMĆ. Dobijeni rezultati su pokazali da izolovane KS-MMĆ ekspiriraju površinske antigene karakteristične za MMĆ (CD29, CD73, CD90, CD105) u visokom nivou, dok je nivo ekspresije markera karakterističnih za hematopoetske i imunske ćelije bio veoma nizak (CD45 i HLA-DR) (Slika 19). Naime, kao što se može videti na reprezentativnim histogramima, ekspresija pozitivnih markera tipičnih za MMĆ je kod različitih davaoca bila detektovana u opsegu od 97.89 do 99% za CD29, od 84.6 do 98.5% za CD73, od 78.5% do 97.78% za CD90 i od 96.1% do 98.13% za CD105. S druge strane, kod svih davalaca CD45 marker bio je ekspiriran na manje od 2.3% ćelija, dok je nivo ekspresije HLA-DR bio manji od 1.73%. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da adherentne ćelije izolovane iz KS zdravih davalaca uzrasta 2-12 godina ispunjavaju drugi kriterijum neophodan za karakterizaciju MMĆ, pri čemu nisu primećene značajne razlike u očekivanom obrascu ekspresije površinskih antigena KS-MMĆ između različitih davalaca.

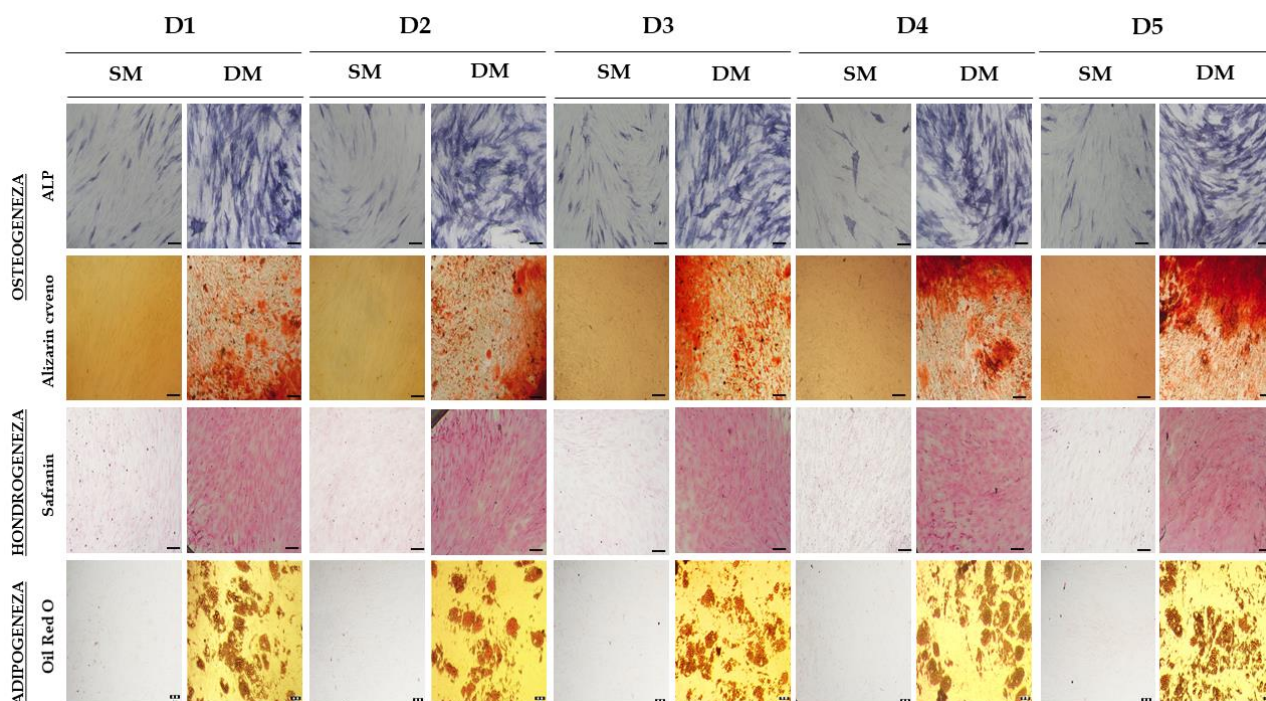


Slika 19. Imunofenotip KS-MMĆ zdravih davalaca određen metodom protočne citometrije. Prikazani su reprezentativni histogrami analiziranih ćelija iz pete pasaže na kojima je predstavljena ekspresija površinskih antigena (neobojena površina) u odnosu na odgovarajuću izotipsku kontrolu (siva površina).

4.2.3. Diferencijacioni potencijal KS-MMĆ zdravih davalaca

Sa ciljem utvrđivanja kapaciteta multipotentne diferencijacije izolovanih adherentnih ćelija iz KS zdravih davalaca, procenjavana je njihova sposobnost diferencijacije u osteogenom, hondrogenom i adipogenom pravcu u odgovarajućim uslovima kultivacije. Kao što se može videti na Slici 20, adherentne ćelije svih davalaca imale su sposobnost diferencijacije u sve tri navedene ćelijske loze, a značajne razlike između davaoca u pogledu diferencijacionog kapaciteta nisu uočene. Spontana diferencijacija ćelija koje su kultivisane u standardnom medijumu nije primećena ni kod jednog davaoca. Kako je kod svih davalaca pokazano da adherentna populacija ćelija KS ima sposobnost diferencijacije u tri mezenhimske loze, ispunjen je treći kriterijum Komiteta ISCT i time definitivno potvrđen MMĆ identitet izolovanih ćelija. Naime, dobijeni rezultati su pokazali da je aktivnost ALP enzima bila značajno povišena kod KS-MMĆ koje su gajene u osteogenom medijumu u poređenju sa aktivnošću ovog enzima u kontrolnoj grupi, čime je pokazan potencijal za ranu osteogenu diferencijaciju ovih ćelija. U skladu sa uočenim povećanjem aktivnosti ALP enzima, utvrđeno je da su se KS-MMĆ diferencirale u osteoblaste tokom duže kultivacije (21 dan) u osteogenom medijumu, što je potvrđeno vizuelizacijom depozita kalcijuma posle bojenja Alizarin crveno bojom. Ovi rezultati su potvrdili sposobnost osteogeneze KS-MMĆ svih analiziranih davalaca, bez uočenih značajnih inter-individualnih razlika (Slika 20).

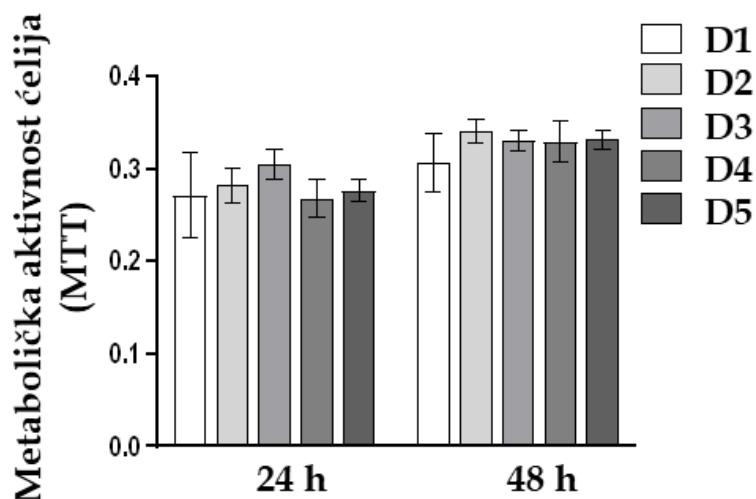
Pored toga, utvrđeno je da su KS-MMĆ svih davalaca imale sposobnost diferenciranja u hondroците nakon 21 dan kultivacije u odgovarajućem hondrogenom indukcionom medijumu, što je nakon bojenja Safranin O bojom dokazano detektovanjem proteoglikana koji nisu uočeni u kontrolnoj grupi ćelija (Slika 20). Slično, prilikom kultivacije KS-MMĆ svih davalaca u adipogenom medijumu, posle 28 dana kultivacije i bojenja Oil Red O bojom, potvrđeno je da se ove ćelije mogu diferencirati u adipocyte na osnovu formiranja lipidnih tela unutar ćelija, koja nisu detektovana kod ćelija gajenih u standardnom medijumu (Slika 20).



Slika 20. Diferencijacioni potencijal KS-MMĆ zdravih davalaca. Ćelije iz pete pasaže kultivisane su u standardnim uslovima, a po postizanju subkonfluentnosti inkubirane tokom različitih vremenskih perioda u odgovarajućem diferencijacionom medijumu (DM). Ćelije gajene u standardnom medijumu (SM) služile su kao kontrolna grupa. Sposobnost osteogeneze potvrđena određivanjem nivoa aktivnosti ALP enzima (nakon 7 dana kultivacije) i detekcijom mineralizacije bojenjem Alizarin crvenim (posle 21 dana kultivacije). Potencijal hondrogenoze procenjen detekcijom proteoglikana histohe mijskim bojenjem Safranin O bojom posle 21 dana kultivacije. Sposobnost adipogeneze detektovana bojenjem lipidnih tela Oil Red bojom nakon 28 dana kultivacije. Prikazane su reprezentativne slike za KS-MMĆ svakog davaoca. Vrednost razmere za slike osteogene i hondrogene diferencijacije je 50 μ m, dok je za slike adipogene diferencijacije vrednost razmere 20 μ m.

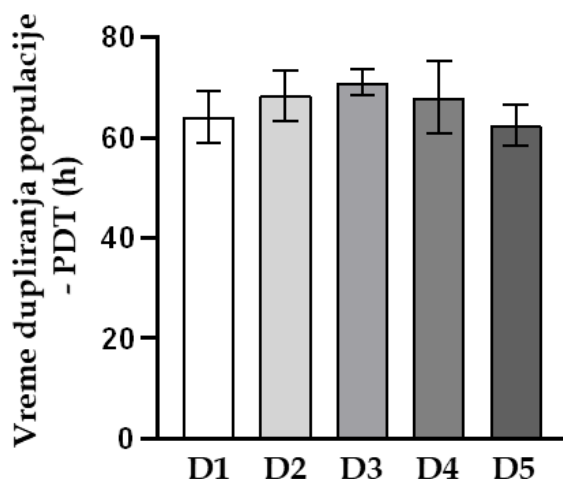
4.2.4. Proliferativni kapacitet KS-MMĆ zdravih davalaca

U daljem toku istraživanja upoređivan je proliferativni kapacitet KS-MMĆ zdravih davalaca. U te svrhe, najpre je MTT testom ispitivana vijabilnost/metabolička aktivnost KS-MMĆ tokom različitih vremenskih intervala. Poređenjem dobijenih rezultata ovog testa primećeno je da je stepen metaboličke aktivnosti KS-MMĆ između različitih davalaca veoma sličan u oba ispitivana termina. Nakon 48h kultivacije u standardnim uslovima mogao se uočiti blag porast u metaboličkoj aktivnosti KS-MMĆ svih davalaca u poređenju sa njihovom aktivnošću detektovanom posle 24h kultivacije (Slika 21). Međutim, uočena razlika nije bila statistički značajna.



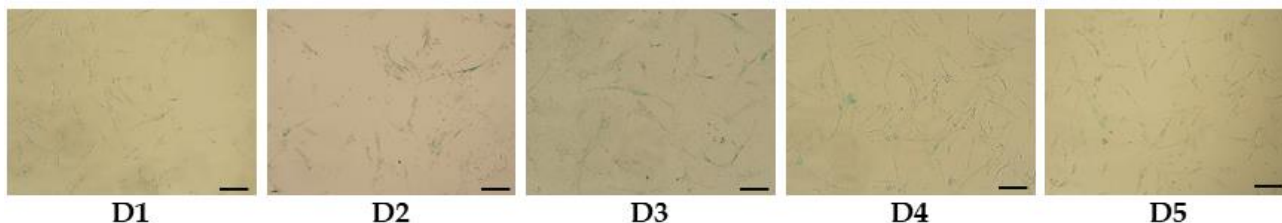
Slika 21. Metabolička aktivnost KS-MMĆ zdravih davalaca. KS-MMĆ su zasejavane u ploče za kultivaciju ćelija sa 96 bunarića u koncentraciji 5000 ćelija/bunariću. Nakon odgovarajućih vremenskih intervala (24 h i 48 h) inkubacije u standardnim uslovima, metabolička aktivnost ćelija određena je MTT testom. Prikazani su rezultati kao srednja vrednost dobijenih optičkih gustina \pm SEM za najmanje tri nezavisna eksperimenta izvedena u triplikatu.

U skladu sa ovim rezultatima su i rezultati dobijeni analizom vremena potrebnog za dupliranje populacije (PDT) koji su ukazali na ujednačenu stopu rasta KS-MMĆ svih davaoca (Slika 22). Naime, ovom analizom je utvrđeno da je prosečno vreme potrebno da se populacija KS-MMĆ udvostruči kod svih davalaca iznosilo 65-70 h, odnosno približno 3 dana.



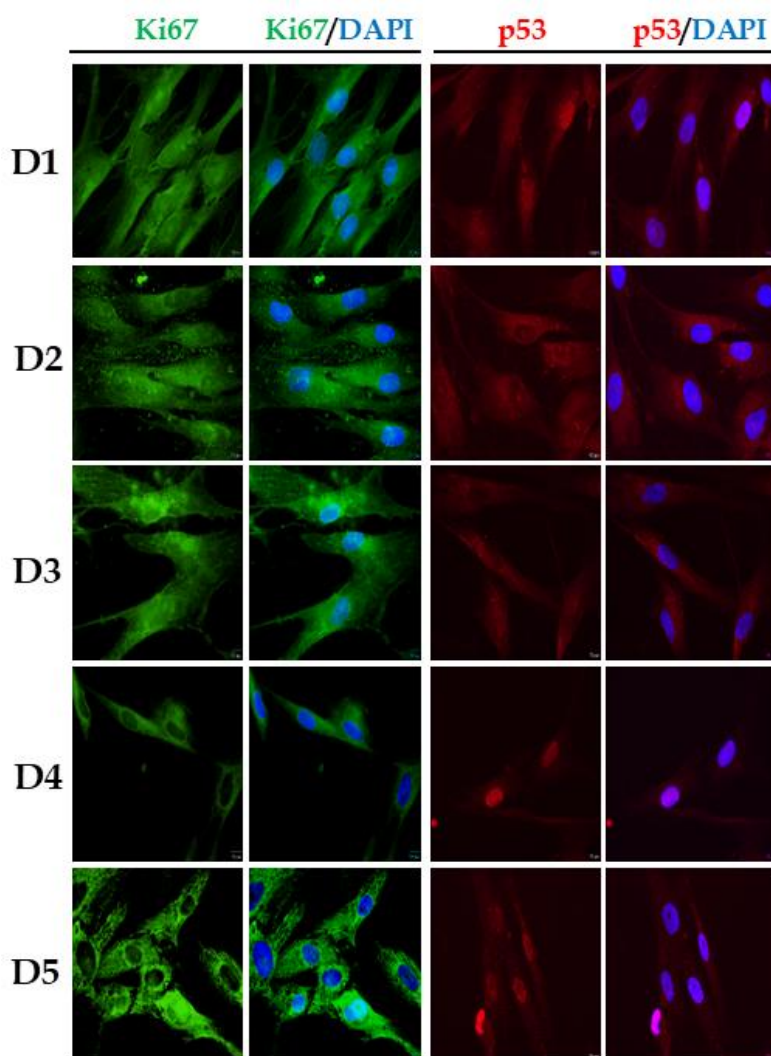
Slika 22. Vreme dupliranja ćelijske populacije KS-MMĆ različitih davalaca. Ćelije su zasejavane u koncentraciji 10×10^4 ćelija/cm² i kultivisane u SM u standardnim uslovima. Svaki put po dostizanju konfluentnosti tokom 10 pasaža, KS-MMĆ su odlepljivane i određivan je njihov broj, a ćelije zatim pasažirane za dalju kultivaciju. Na osnovu odnosa broja inicijalno zasejanih i broja ćelija nakon odlepljivanja izračunavan je PDT prema formuli koja je prikazana u odeljku Materijal i metodi. Prikazani su rezultati kao srednje vrednosti \pm SEM za najmanje tri nezavisna eksperimenta izvedena u duplikatu.

U prilog rezultatima da KS-MMĆ svih davalaca aktivno proliferišu i nakon dugotrajne kultivacije govore i rezultati uporednog ispitivanja starenja ćelija (senescencije) u kulturi. Kako bi se procenio nivo ćelijskog starenja kultivisanih ćelija određivan je nivo ekspresije β -galaktozidaze kao markera ovog procesa. Rezultati su pokazali da je u populaciji KS-MMĆ svih ispitivanih davaoca iz pasaža P5-P7 prisutan mali broj ćelija pozitivnih na β -galaktozidazu (Slika 23). Kada je broj ćelija pozitivnih na β -galaktozidazu izražen procentualno u odnosu na ukupan broj ćelija u kulturi, utvrđeno je da je u populaciji KS-MMĆ različitih davalaca zastupljeno 0.8-2.1% senescentnih ćelija. Ovi podaci su u skladu sa izraženim proliferativnim kapacitetom utvrđenim prethodnim analizama.



Slika 23. Ćelijsko starenje KS-MMĆ zdravih davaoca. KS-MMĆ pasaža P5-P7 su postavljane u ploče za kulturu ćelija sa 96 bunarića u koncentraciji 3000 ćelija/bunariću i kultivisane tokom 24 h u standardnim uslovima kako bi adherirale. Aktivnost β -galaktozidaze određena je pomoću komercijalno dostupnog kita na način opisanu u odeljku Materijal i metodi. Prikazane su reprezentativne slike ćelija. Vrednost razmere je 50 μ m.

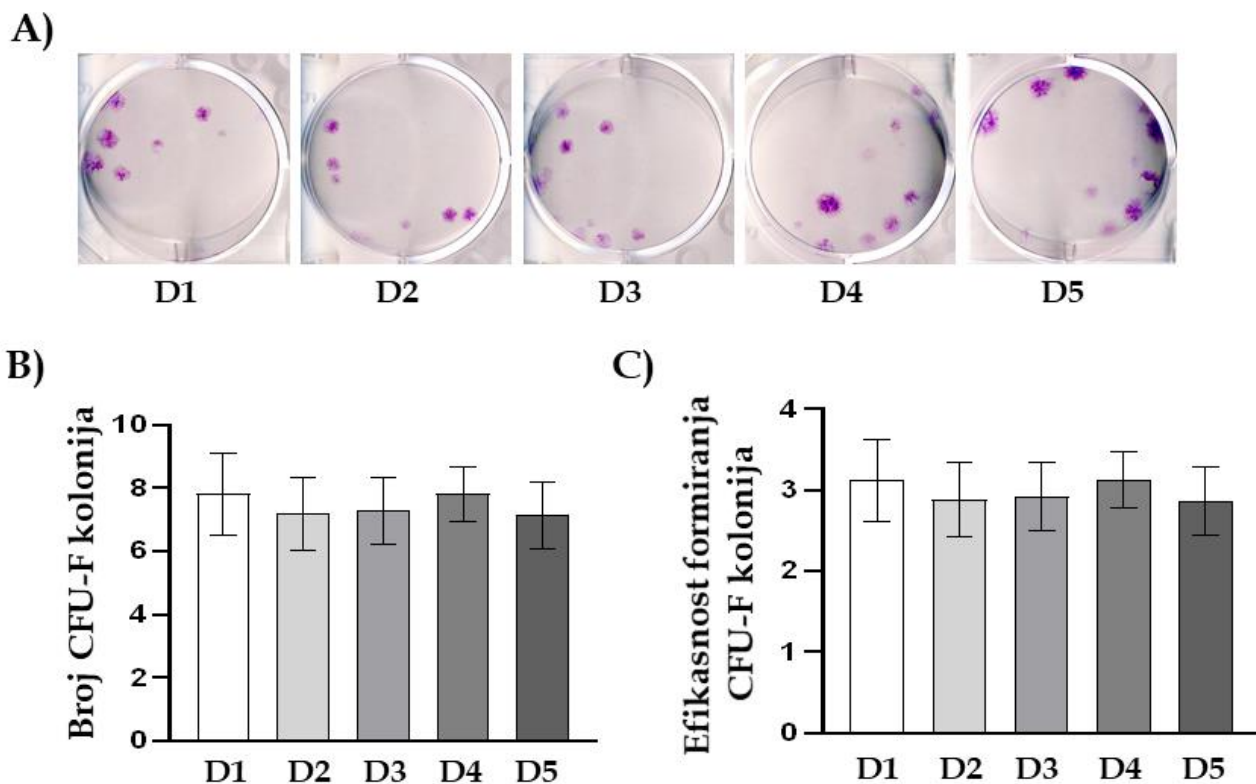
Visoka stopa proliferacije KS-MMĆ zdravih davalaca potkrepljena je takođe na molekularnom nivou, detekcijom visokog nivoa konstitutivne ekspresije unutarćelijskog markera proliferacije Ki67 metodom imunofluorescentnog obeležavanja (Slika 24). U ovom slučaju, međutim, uočene su blage razlike u intenzitetu ekspresije i lokalizaciji markera Ki67 u KS-MMĆ različitih davalaca. Naime, najviši nivo ekspresije Ki67 proteina bio je detektovan kod davaoca D5. Pored nivoa ekspresije, utvrđene su varijacije u lokalizaciji Ki67 proteina između davaoca, s obzirom da je kod KS-MMĆ davaoca D1, D2 i D3 ekspresija Ki67 bila uočljiva u citoplazmi i jedru, dok je kod davaoca D4 i D5 ovaj protein bio eksprimiran predominantno u citoplazmi. Osim toga, paralelno je analizirana ekspresija p53 proteina, važnog regulatora ćelijske proliferacije i senescencije, u KS-MMĆ različitih davalaca. Dobijeni rezultati su ukazali na sličan bazalni nivo ekspresije ovog proteina u KS-MMĆ različitih davalaca, pri čemu su uočene razlike između davalaca u pogledu lokalizacije p53 (Slika 24). Slično kao i ekspresija Ki67 proteina, ekspresija p53 proteina je bila detektovana u citoplazmi i jedru KS-MMĆ davaoca D1, D2 i D3. S druge strane, kod davaoca D4 i D5 protein p53 je bio prevashodno detektovan u jedru KS-MMĆ.



Slika 24. Unutarćelijska ekspresija i lokalizacija Ki67 i p53 proteina u KS-MMĆ zdravih davalaca detektovana indirektnim imunofluorescentnim obeležavanjem. KS-MMĆ su zasejavane na ljuispice postavljene u ploče za kultivaciju ćelija sa 24 bunarića, u koncentraciji 3000 ćelija/ljuispici i kultivisane u standardnim uslovima kako bi adherirale. Posle 24 h kultivacije ćelije su obeležavane sa primarnim antitelima za Ki67 i p53, a zatim odgovarajućim sekundarnim FITC- (zeleno), odnosno Alexa Fluor 555-konjugovanim antitelom (crveno). Za obeležavanje jedara ćelija korišćena je fluorescentna DAPI boja (plavo). Predstavljene su reprezentativne fotografije slikane pomoću epifluorescentnog mikroskopa. Vrednost razmere: 20 µm.

4.2.5. Klonogeni potencijal KS-MMĆ zdravih davalaca

Kako bi se odredio potencijal samoobnavljanja MMĆ izolovanih iz KS zdravih davalaca, analiziran je njihov klonogeni potencijal primenom CFU-F testa. Dobijeni rezultati su pokazali da KS-MMĆ posle 14 dana kultivisanja formiraju kolonije veće od 2 mm u prečniku koje su se sastojale od 50 ili više ćelija tipične morfologije slične fibroblastima. Morfologija samih CFU-F kolonija bila je heterogena, ali u osnovi slična kod različitih davalaca (Slika 25 A). Pri tome je broj CFU-F kolonija bio ujednačen između davaoca, te se na 250 zasejanih KS-MMĆ moglo detektovati u proseku 8 CFU-F kolonija (Slika 25 B). Pored toga, prosečna efikasnost formiranja kolonija bila je oko 3% i nije značajno varirala između različitih davaoca (Slika 25 C). Na osnovu dobijenih nalaza utvrđeno je da je za sve ispitivane uzorke KS-MMĆ klonogeni kapacitet bio sličan.

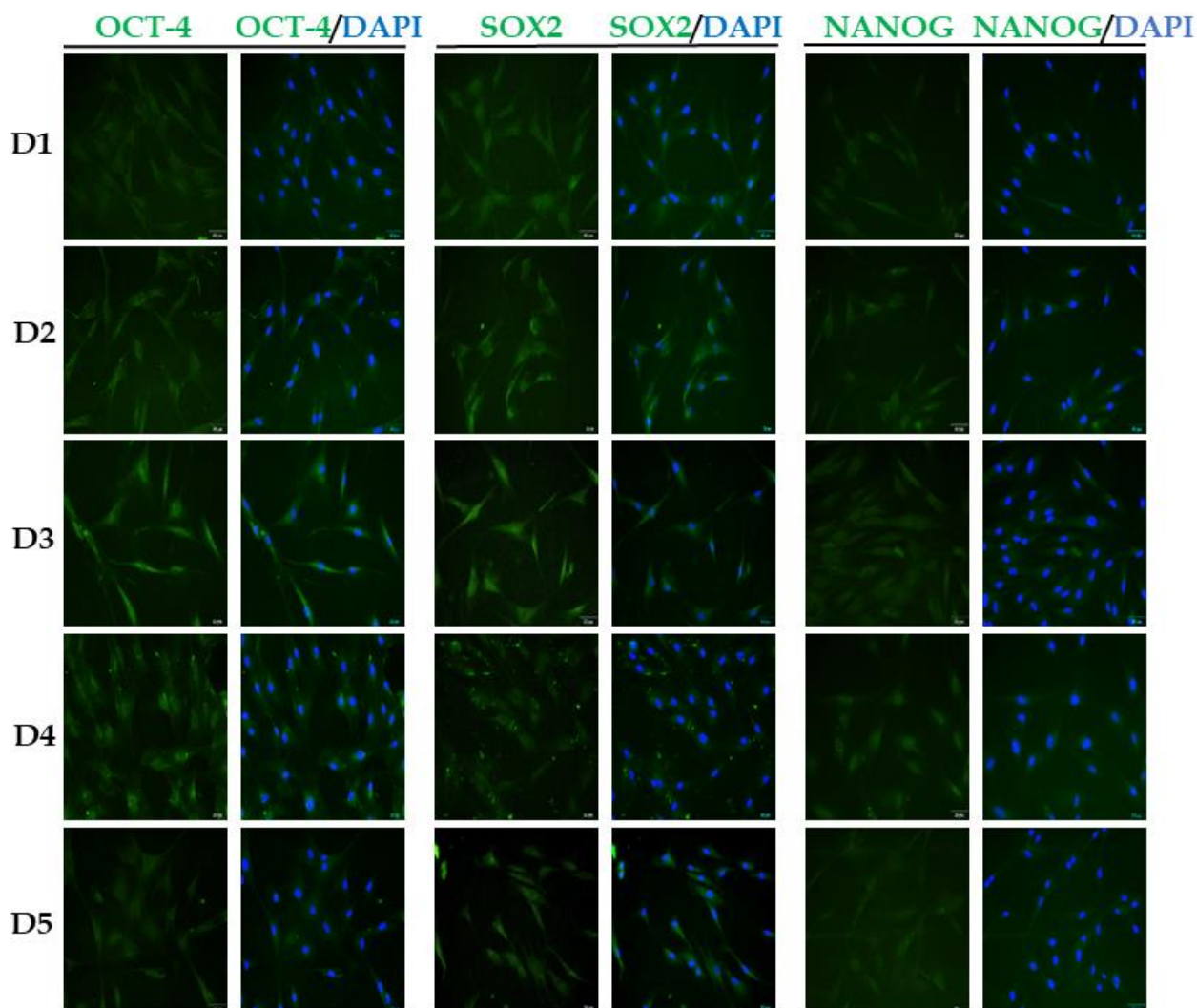


Slika 25. Klonogeni potencijal KS-MMĆ zdravih davalaca. U ploče za kultivaciju ćelija sa 6 bunarića zasejavano je 250 KS-MMĆ po bunariću. Posle 14 dana kultivacije u standardnim uslovima, kolonije su vizuelizovane nakon bojenja Kristal-violet bojom. A) Izgled CFU-F kolonija različitih davalaca. Prikazane su reprezentativne fotografije bunarića. B) Broj kolonija određivan posle bojenja. C) Efikasnost formiranja CFU-F kolonija određena kao odnos broja formiranih kolonija i broja zasejanih ćelija. Na graficima (B, C) su prikazane srednje vrednosti \pm SEM za tri nezavisna eksperimenta rađena u duplikatu.

4.2.6. Ekspresija markera pluripotentnosti u KS-MMĆ zdravih davalaca

Pored uporedne analize klonogenog potencijala, određivana je i ekspresija markera pluripotentnosti u KS-MMĆ zdravih davalaca indirektnim imunofluorescentnim obeležavanjem. Dobijeni rezultati, prikazani na Slici 26, pokazali su da KS-MMĆ svih davalaca konstitutivno eksprimiraju markere pluripotentnosti, kao što su OCT-4, SOX2 i NANOG. Iako je ekspresija ovih faktora pluripotentnosti detektovana u citoplazmi i jedru KS-MMĆ kod svih davalaca, primećene su inter-individualne razlike u ekspresiji ovih proteina. Tako je za OCT-4 protein, primećena dominantnija ekspresija u jedru i perinuklearnom regionu KS-MMĆ davalaca D3, D4 i D5, dok je kod davalaca D1 i D2 bila uočena slabija ekspresija u citoplazmi. Najviša ekspresija SOX2 proteina bila je detektovana kod KS-MMĆ davalaca D3 i D5 sa lokalizacijom u jedru i perinuklearnom regionu, dok je kod davalaca D1, D2 i D4 primećen nešto niži intenzitet ekspresije ovog proteina u perinuklearnom i citoplazmatskom ćelijskom odeljku. Rezultati uporedne analize ekspresije NANOG proteina su ukazali na razlike u lokalizaciji ovog proteina kod različitih davalaca. Naime, iako je NANOG detektovan kod svih davalaca, dominantna lokalizacija u jedru KS-

MMC pokazana je samo kod davaoca D4, dok je kod davaoca D1, D2, D3 i D5 ovaj faktor bio pretežno lociran u perinuklearnom i citoplazmatskom regionu KS-MMC.



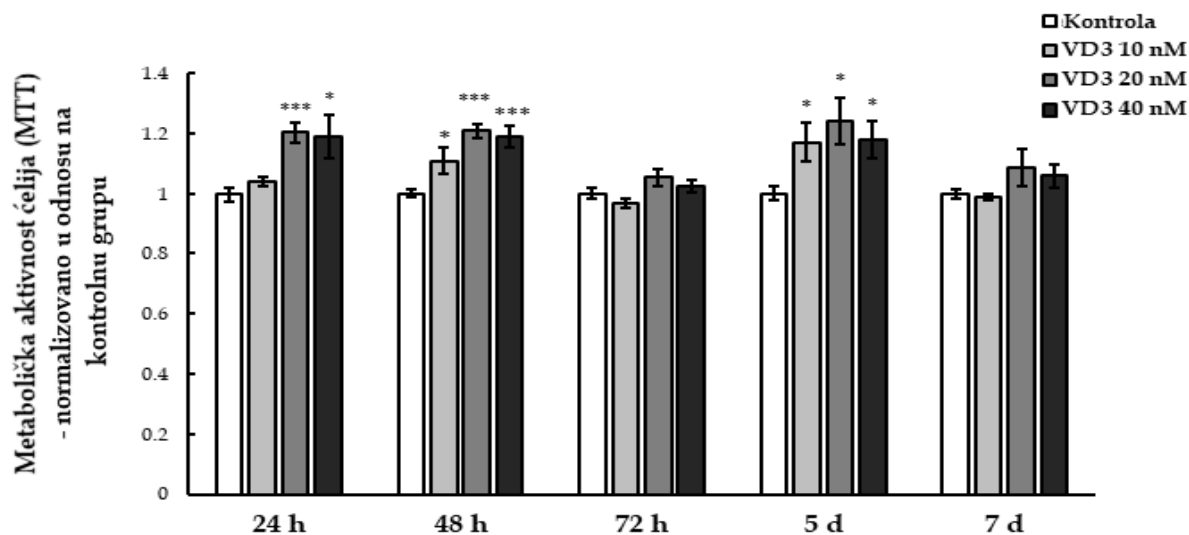
Slika 26. Unutarćelijska ekspresija i lokalizacija markera pluripotentnosti u KS-MMC zdravih davalaca detektovana indirektnim imunofluorescentnim obeležavanjem. U ploče za kultivaciju ćelija sa 24 bunarića postavljane su ljušpice na koje je zasejavano 3000 ćelija/ljušpici. Nakon 24 h kultivacije u standardnim uslovima kako bi ćelije adherirale, vršeno je imunofluorescentno obeležavanje KS-MMC najpre primarnim antitelima za OCT-4, SOX2, i NANOG, a zatim odgovarajućim sekundarnim FITC-konjugovanim antitelima (zeleni boja). Za obeležavanje jedara ćelija upotrebljena je fluorescentna DAPI boja (plavo). Predstavljene su reprezentativne fotografije slikane pomoću epifluorescentnog mikroskopa. Vrednost razmere: 20 µm.

4.3. UTICAJ VITAMINA D3 NA FUNKCIJE I SIGNALIZACIJU KS-MMC POVEZANU SA REGENERATIVNIM POTENCIJALOM

4.3.1. Uticaj VD3 na vijabilnost/metaboličku aktivnost KS-MMC

U cilju ispitivanja kapaciteta vitamina D3 da u formi holekalciferola (VD3) modifikuje funkcije KS-MMC povezane sa regenerativnim potencijalom, najpre je vršena

analiza vijabilnosti/metaboličke aktivnosti KS-MMĆ primenom MTT testa. U te svrhe KS-MMĆ ćelije su tretirane rastućim koncentracijama VD3 (10 nM, 20 nM i 40 nM) tokom različitih vremenskih perioda. Rezultati MTT testa su ukazali da VD3 ispoljava stimulatorni efekat na vijabilnost i/ili metaboličku aktivnost KS-MMĆ. Naime, u poređenju sa netretiranim ćelijama, značajno povećanje vijabilnosti KS-MMĆ je primećeno nakon 24 h tretmana sa 20 nM i 40 nM VD3, dok je stimulatorni efekat svih primenjenih koncentracija VD3 na vijabilnost/metaboličku aktivnost KS-MMĆ detektovan nakon tretmana koji su trajali 48 h i 5 dana. Sa druge strane, kada su ćelije tretirane sa VD3 tokom 72 h i 7 dana, nisu uočene značajne promene vijabilnosti tretiranih ćelija u poređenju sa kontrolnom, netretiranom grupom (Slika 27).

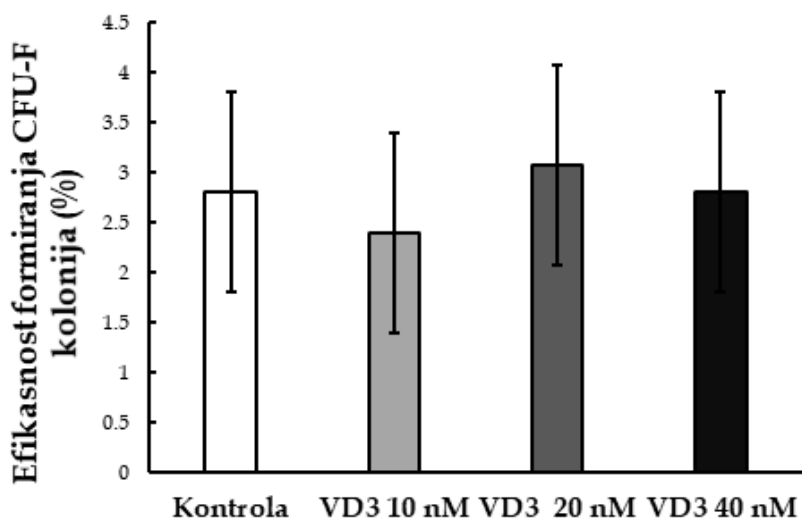


Slika 27. Uticaj VD3 na vijabilnost/metaboličku aktivnost KS-MMĆ. Ćelije su zasejavane u ploče za kulturu ćelija sa 96 bunarića u koncentraciji 1000 ćelija/bunariću. Nakon 24 h započinjan je tretman sa VD3 (10 nM, 20 nM ili 40 nM) koji je trajao 24 h, 48 h, 72 h, 5 dana ili 7 dana. Po završetku tretmana određivana je vijabilnost/metabolička aktivnost KS-MMĆ primenom MTT testa. Prikazani su rezultati najmanje tri nezavisna eksperimenta, rađena u triplikatu, koji su predstavljeni kao srednja vrednost \pm SEM. Rezultati su normalizovani u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu. Statistički značajne razlike prema Studentovom *t*-testu: * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu.

4.3.2. Uticaj VD3 na klonogeni kapacitet KS-MMĆ

U cilju procene uticaja različitih koncentracija VD3 (10 nM, 20 nM i 40 nM) na potencijal samoobnavljanja izolovanih KS-MMĆ zdravih davalaca, analiziran je njihov klonogeni potencijal primenom CFU-F testa. Nakon 14 dana kultivisanja u standardnim uslovima u prisustvu VD3 određivan je broj CFU-F kolonija i izračunavana efikasnost formiranja kolonija. Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da efikasnost formiranja CFU-F kolonija nije značajno varirala između različitih eksperimentalnih grupa krećući se u opsegu od 2,4 do 3% (Slika 28), što je ukazalo da tretman sa VD3 nije značajno uticao na klonogeni kapacitet KS-MMĆ.

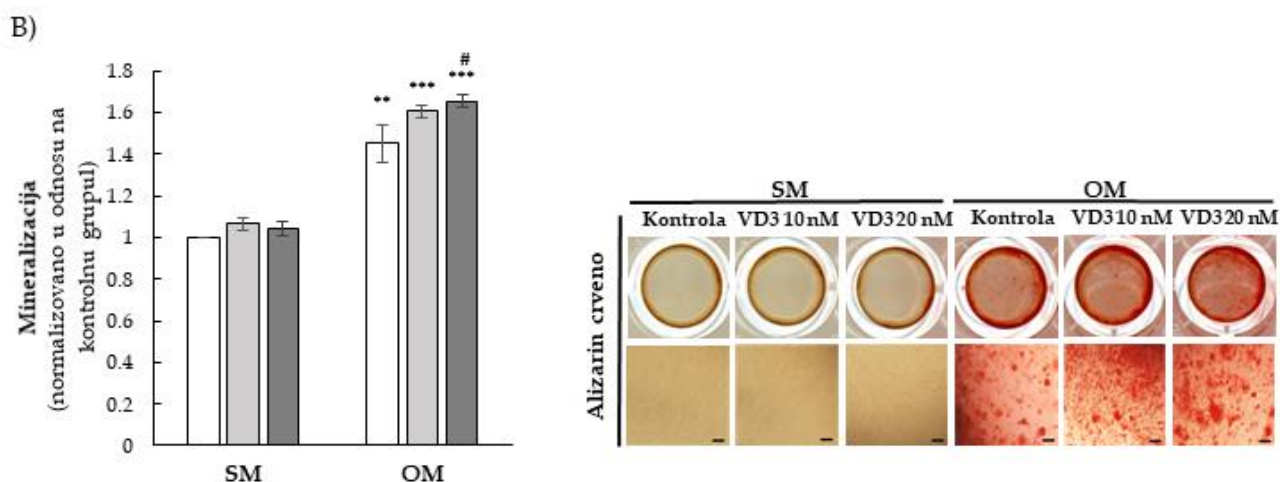
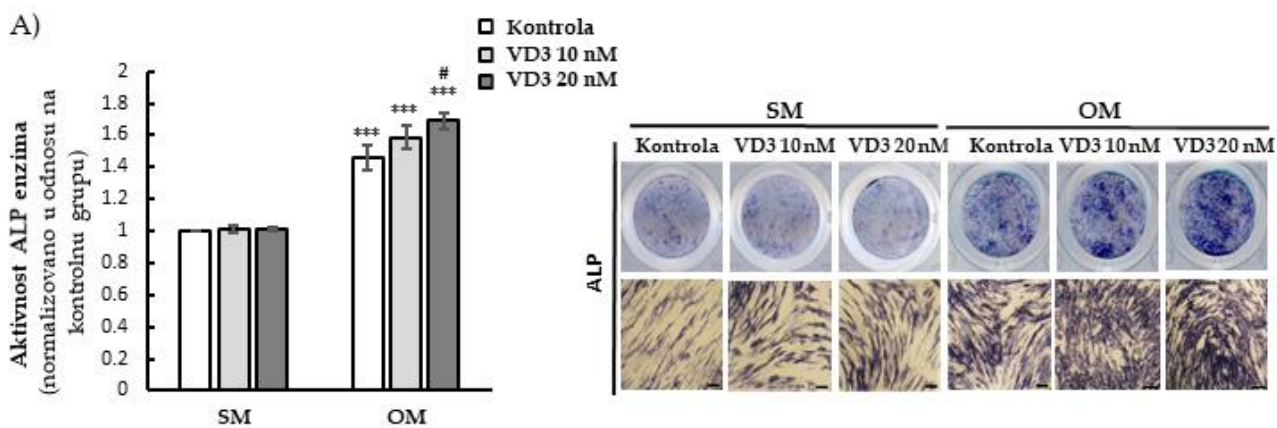
Kako u ovim i prethodnim eksperimentima pri tretmanu sa 40 nM VD3 nije primećeno dodatno povećanje vijabilnosti, odnosno klonogenog potencijala, u odnosu na tretmane nižim koncentracijama ovog vitamina, u daljim eksperimentima korišćene su koncentracije 10 nM i 20 nM VD3.



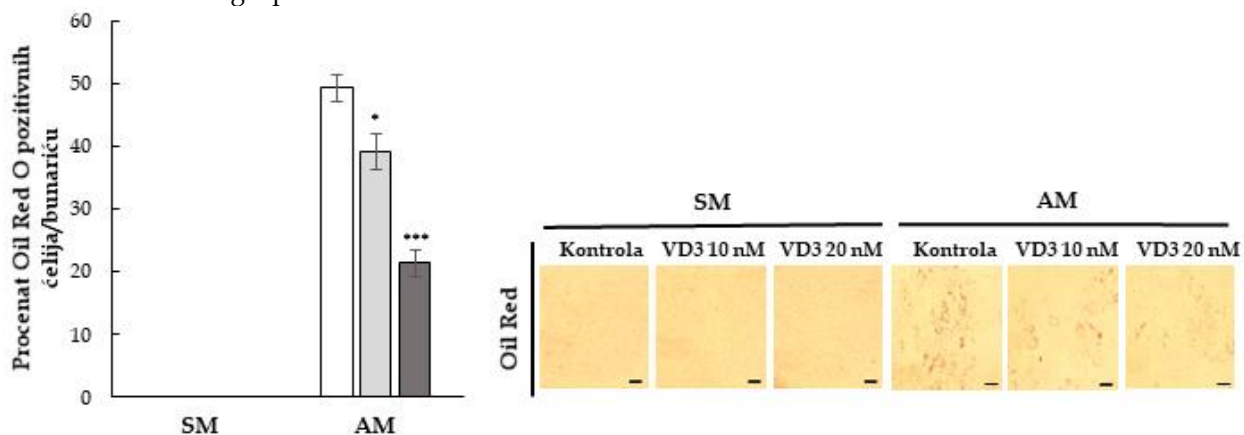
Slika 28. Uticaj VD3 na klonogeni kapacitet KS-MMĆ. Čelije su zasejavane u ploče za kultivaciju ćelija sa 6 bunarića u koncentraciji 250 ćelija/bunariću. Tretman sa VD3 (10 nM, 20 nM ili 40 nM) trajao je 14 dana tokom kojih su ćelije kultivisane u standardnim uslovima u SM. Po završetku ovog perioda određivan je broj kolonija primenom Kristal-violet boje. Efikasnost formiranja CFU-F kolonija izračunata na osnovu odnosa broja nastalih kolonija i broja zasejanih ćelija. Na grafiku su prikazane srednje vrednosti \pm SEM za 3 nezavisna eksperimenta rađena u duplikatu.

4.3.3. Uticaj VD3 na osteogeni i adipogeni potencijal diferencijacije KS-MMĆ

U daljem toku ispitivanja sposobnosti VD3 da moduliše regenerativna svojstva KS-MMĆ analiziran je uticaj ovog vitamina na diferencijacioni potencijal KS-MMĆ. Rezultati dobijeni histohemijskim bojenjem ALP i Alizarin crveno bojom, prikazani na Slici 29 A i 29 B, ukazali su na značajnu stimulaciju rane i kasne osteogeneze KS-MMĆ pri kultivaciji u osteogenom medijumu (OM) koji je sadržao VD3 (10 nM i 20 nM). Pri tome je najizraženija stimulacija osteogeneze uočena kod ćelija tretiranih sa 20 nM VD3 kada je pokazana statistički značajna razlika u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu kultivisanu u OM (Slika 29, A i B). Pored stimulatornog efekta VD3 na osteogenezu, rezultati ovih ispitivanja su ukazali na inhibitorni efekat VD3 na adipogenu diferencijaciju KS-MMĆ. Naime, utvrđeno da tretman sa VD3 tokom indukcije adipogene diferencijacije ispoljava dozno zavisin inhibitorni efekat na sposobnost adipogeneze KS-MMĆ, s obzirom da je najmanji procenat ćelija koje sadrže lipidna tela detektovan u kulturama gajenim u adipogenom medijumu sa 20 nM VD3 (Slika 30). Pored toga, kako u kulturama KS-MMĆ gajenim u kontrolnom, standardnom medijumu u prisustvu VD3 nisu pokazane promene u nivou aktivnosti ALP, mineralizacije, kao i formiranja unutarćelijskih lipidnih tela, može se zaključiti da sam VD3 ne podstiče spontanu diferencijaciju KS-MMĆ. Imajući u vidu sve navedeno, dobijeni rezultati su ukazali na sposobnost VD3 da stimuliše osteogenu diferencijaciju KS-MMĆ, dok su sa druge strane pokazali njegov inhibitorni efekat na potencijal adipogene diferencijacije ovih ćelija.



Slika 29. Uticaj VD3 na osteogeni potencijal KS-MMĆ. Ćelije su zasejavane u ploče za kulturu ćelija sa 96 bunarića u koncentraciji 5000 ćelija/bunariću. Po dostizanju subkonfluentnosti u medijum za indukciju osteogene diferencijacije (OM) ili standardni medijum (SM) dodavan je VD3 (10 nM ili 20 nM). A) Osteogeneza KS-MMĆ procenjena nakon 7 dana na osnovu aktivnosti ALP enzima histoheimijskim bojenjem. B) Osteogeneza KS-MMĆ detektovana nakon 21 dana bojenjem depozita kalcijuma Alizarin crveno bojom. Prikazane su reprezentativne slike. Vrednost razmernika je 50 μm . Na graficima A) i B) prikazani su rezultati kao srednja vrednost \pm SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta. Rezultati su normalizovani u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu ćelija (kultivisanu u SM bez VD3). Statistički značajne razlike prema Studentovom *t*-testu: $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ u odnosu na netretiranu grupu kultivisanu u SM; $\#p < 0.05$ u odnosu na netretiranu grupu kultivisanu u OM.

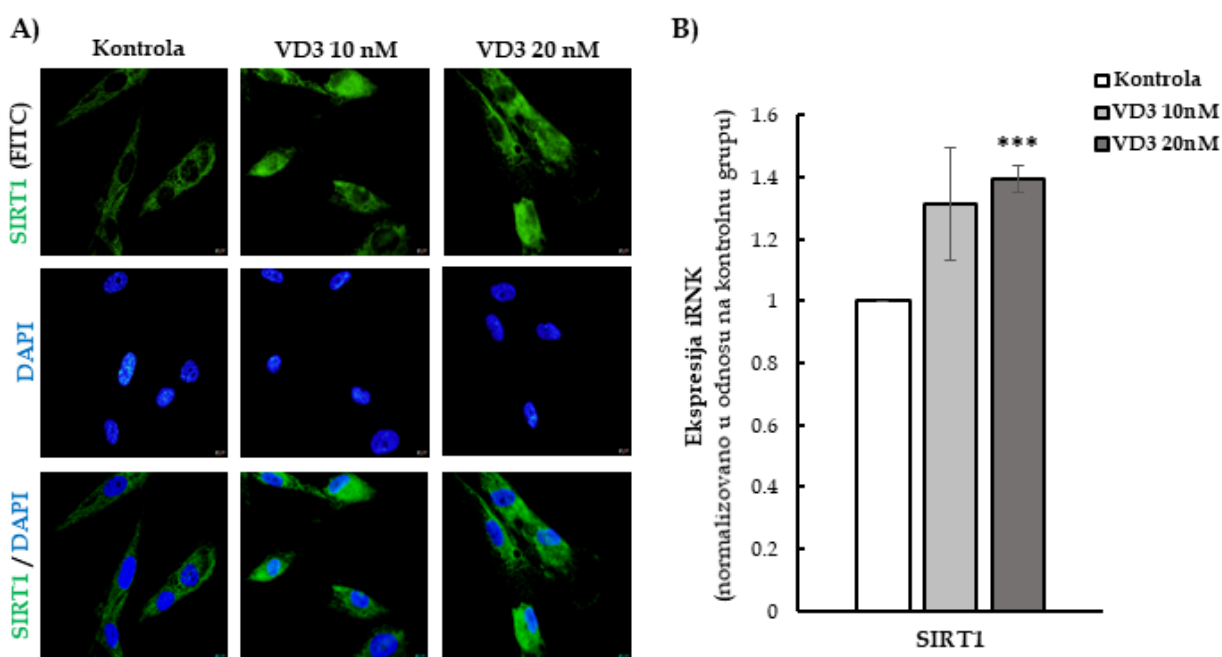


Slika 30. Uticaj VD3 na adipogeni potencijal KS-MMĆ. Ćelije su zasejavane u ploče za kulturu ćelija sa 96 bunarića u koncentraciji 5000 ćelija/bunariću. Po dostizanju subkonfluentnosti u medijum za indukciju

adipogene diferencijacije (AM) ili standardni medijum (SM) dodavan je VD3 (10 nM ili 20 nM). Adipogeneza je detektovana nakon 28 dana, Oil Red O bojenjem unutarćelijskih lipidnih tela. Prikazane su reprezentativne slike. Vrednost razmernika je 20 μ M. Kvantitativni prikaz na grafiku predstavlja procenat Oil Red O pozitivnih ćelija određivan po vizuelnom polju. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM najmanje tri eksperimenta. Statistički značajne razlike prema Studentovom *t*-testu: **p* < 0.05; ****p* < 0.001 u odnosu na netretiranu grupu kultivisanu u AM.

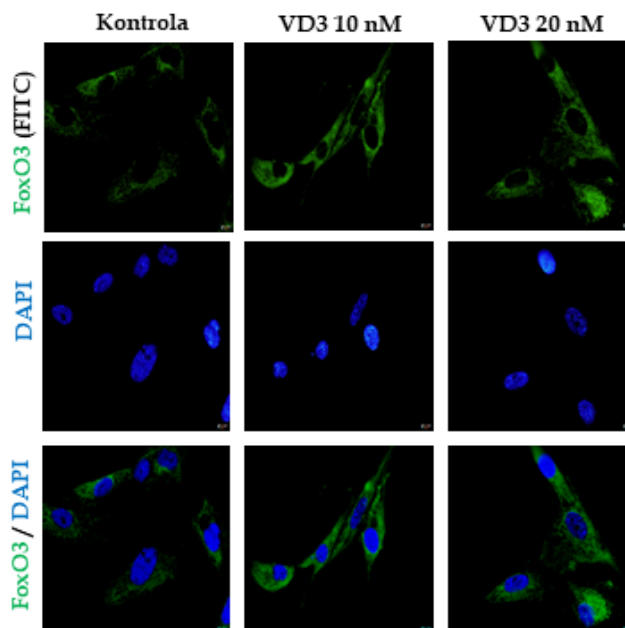
4.3.4. Uticaj VD3 na aktivaciju SIRT1-FoxO3 signalizacije u KS-MMĆ

Sa ciljem definisanja mehanizama koji leže u osnovi modulatornog delovanja VD3 na funkcijska svojstva KS-MMĆ, analiziran je efekat ovog vitamina na ekspresiju signalnih molekula SIRT1 i FoxO3 kao ključnih regulatora ćelijskih funkcija povezanih sa regenerativnim potencijalom MMĆ. Proteinska ekspresija SIRT1 i FoxO3 ispitivana je imunofluorescentnim bojenjem. Dobijeni rezultati su ukazali na konstitutivnu ekspresiju proteina SIRT1 i FoxO3 u KS-MMĆ sa dominantnom lokalizacijom u citoplazmi ispitivanih ćelija (Slika 31 i 32). Pored toga, rezultati dobijeni nakon 5 dana tretmana sa VD3 (10 nM ili 20 nM) pokazali su značajno povećanje ekspresije SIRT1 proteina, ne samo u citoplazmi KS-MMĆ nego i u jedru ovih ćelija (Slika 31 A). U skladu sa rezultatima imunofluorescentnog bojenja, rezultati dobijeni qRT-PCR analizom pokazali su povećanu ekspresiju iRNK za *SIRT1* nakon petodnevnog tretmana KS-MMĆ sa VD3. Pri tome je statistički značajno povećanje ekspresije *SIRT1* gena u odnosu na netretirane ćelije primećeno pri primeni 20 nM VD3 (Slika 31 B). Analizom ekspresije signalnih molekula takođe je pokazana stimulirana ekspresija FoxO3 proteina nakon 5 dana tretmana sa VD3 koja je detektovana predominantno u citoplazmatskom regionu ćelija i to pri primeni obe testirane koncentracije VD3. Međutim, posle tretmana sa 20 nM VD3 pojačana ekspresija FoxO3 proteina bila je uočljiva i u perinuklearnom regionu KS-MMĆ (Slika 32).



Slika 31. Uticaj VD3 na aktivaciju SIRT1 signalnog molekula u KS-MMĆ. KS-MMĆ su tretirane sa VD3 (10 nM ili 20 nM) tokom 5 dana u standardnim uslovima kultivacije. Proteinska ekspresija SIRT1 je detektovana indirektnim imunofluorescentnim obeležavanjem primarnim anti-SIRT1 antitelom i odgovarajućim sekundarnim FITC-konjugovanim antitelom (zeleno). Za bojenje DNK korišćena je DAPI boja (plavo). Prikazane su reprezentativne slike. Vrednost razmere je 10 μ m. B) Relativna ekspresija nivoa *SIRT1* iRNK

analizirana je metodom qRT-PCR. Dobijeni rezultati normalizovani su u odnosu na Ct vrednost konstitutivno eksprimiranog gena *GAPDH*. Za izračunavanje vrednosti korišćen je $2^{-\Delta\Delta CT}$ metod. Rezultati najmanje dva nezavisna eksperimenta predstavljeni su kao srednje vrednosti \pm SEM. Statistički značajna razlika prema Studentovom *t*-testu: *** $p < 0.001$ u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu.



Slika 32. Uticaj VD3 na aktivaciju FoxO3 signalnog molekula u KS-MMČ. KS-MMČ su tretirane sa VD3 (10 nM ili 20 nM) tokom 5 dana u standardnim uslovima kultivacije. Proteinska ekspresija FoxO3 je detektovana indirektnim imunofluorescentnim obeležavanjem primarnim anti-FoxO3 antitelom i odgovarajućim sekundarnim FITC-konjugovanim antitelom (zeleno). Za bojenje DNK korišćena je DAPI boja (plavo). Prikazane su reprezentativne slike. Vrednost razmere je 10 μ m.

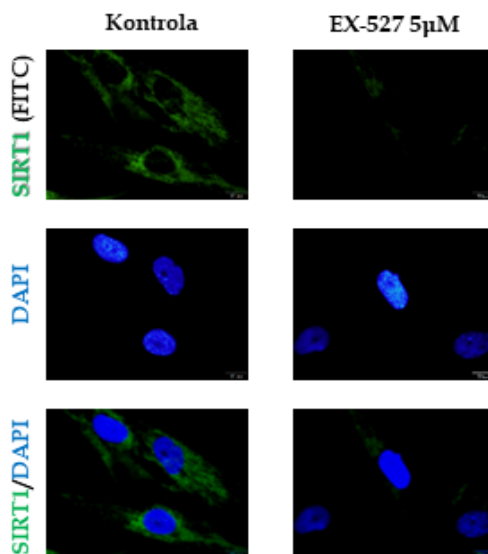
4.4. ULOGA SIRT1 SIGNALIZACIJE U DELOVANJU VD3 NA FUNKCIJE KS-MMČ POVEZANE SA REGENERATIVNIM POTENCIJALOM

4.4.1. Uloga SIRT1 signalizacije u delovanju VD3 na proliferativni kapacitet KS-MMČ

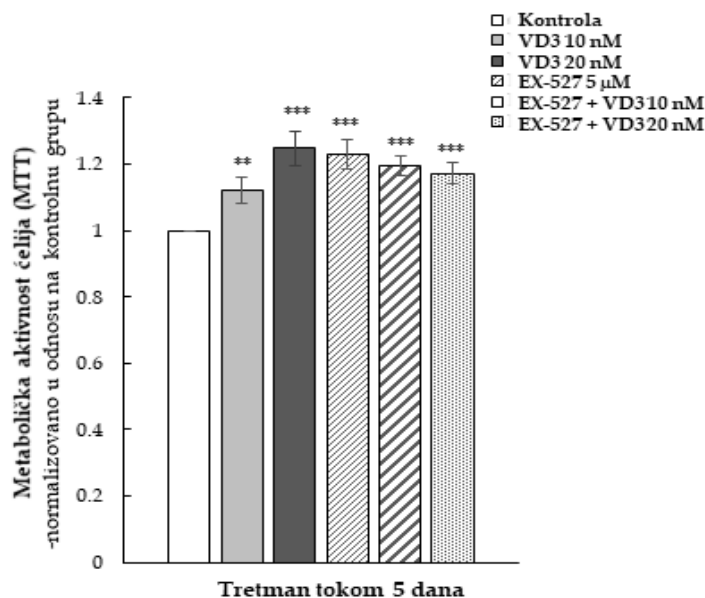
Imajući u vidu da su prethodni rezultati ukazali da VD3 indukuje aktivaciju SIRT1 signalizacije u KS-MMČ, u nastavku istraživanja se pristupilo ispitivanju učešća ovog signalnog puta u zapaženim efektima VD3 na funkcije KS-MMČ povezane sa regenerativnim potencijalom. U tom kontekstu, najpre je ispitivano učešće SIRT1 signalizacije u stimulaciji proliferativnog potencijala KS-MMČ posredovanoj VD3. Kako je prethodno MTT testom detektovana stimulirana vijabilnost/metabolička aktivnost KS-MMČ u prisustvu VD3 u periodu od 5 dana, za potrebe daljih istraživanja ćelije su podvrgnute tretmanu ovim vitaminom tokom 5 dana. Pored toga, radi definisanja učešća SIRT1 signalizacije u pokazanim efektima VD3 korišćen je selektivni inhibitor SIRT1, EX-527.

Efikasnost delovanja samog SIRT1 inhibitora proverena je analizom ekspresije SIRT1 proteina u KS-MMČ tretiranim EX-527 putem imunofluorescentnog obeležavanja. Dobijeni rezultati su pokazali da je ovaj farmakološki inhibitor primenjen u koncentraciji 5 μ M uspešno redukovao ekspresiju SIRT1 proteina u KS-MMČ posle 5 dana tretmana (Slika 33) potvrđujući efikasnost njegovog inhibitornog delovanja. Paralelno je pokazano da sam inhibitor nije ispoljio negativne efekte na vijabilnost KS-MMČ u ispitivanom periodu (Slika

34). Dalje analize vijabilnosti/metaboličke aktivnosti KS-MMĆ tretiranih 5 dana sa VD3 u kombinaciji bez ili sa SIRT1 inhibitorom, potvrdile su stimulatorni efekat VD3. Pored toga, utvrđeno je da je i sam inhibitor, EX-527, stimulisao vijabilnost/metaboličku aktivnost KS-MMĆ, ne modifikujući stimulatorni efekat VD3 na KS-MMĆ (Slika 34). Visoka metabolička aktivnost KS-MMĆ koja je primećena kada su ćelije tretirane kako sa VD3, tako i sa EX-527, ukazala je da je stimulatorni efekat ovog vitamina na metaboličku aktivnost ispitivanih ćelija nezavisan od SIRT1 signalizacije.

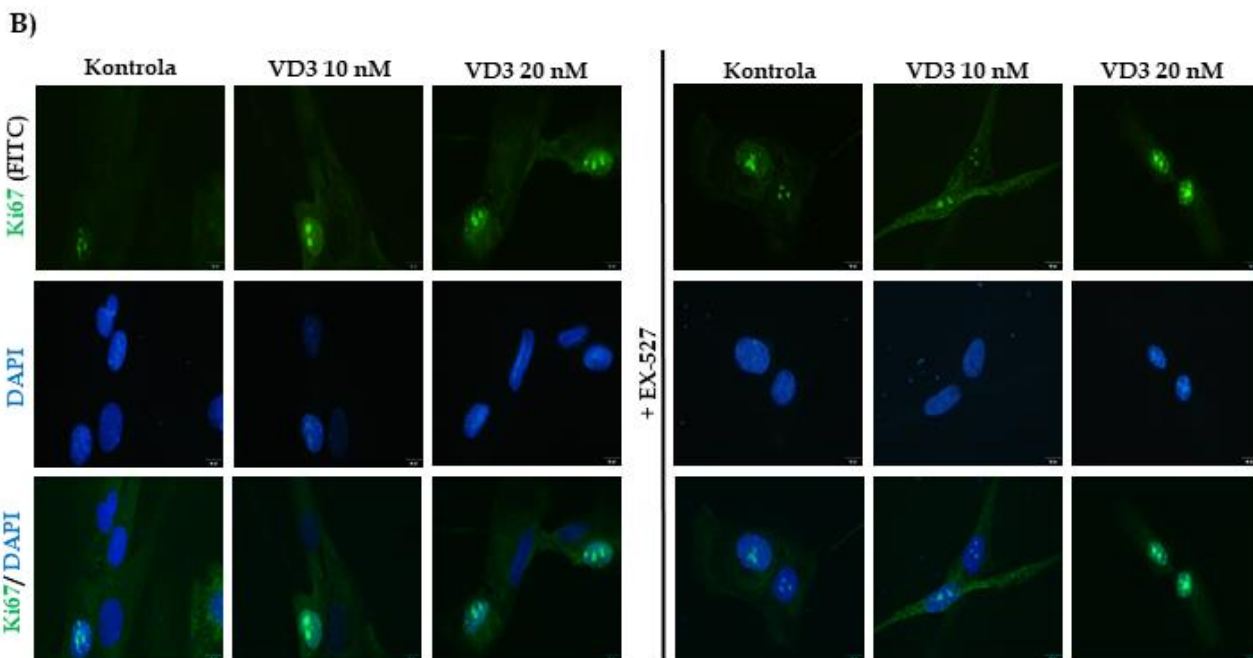
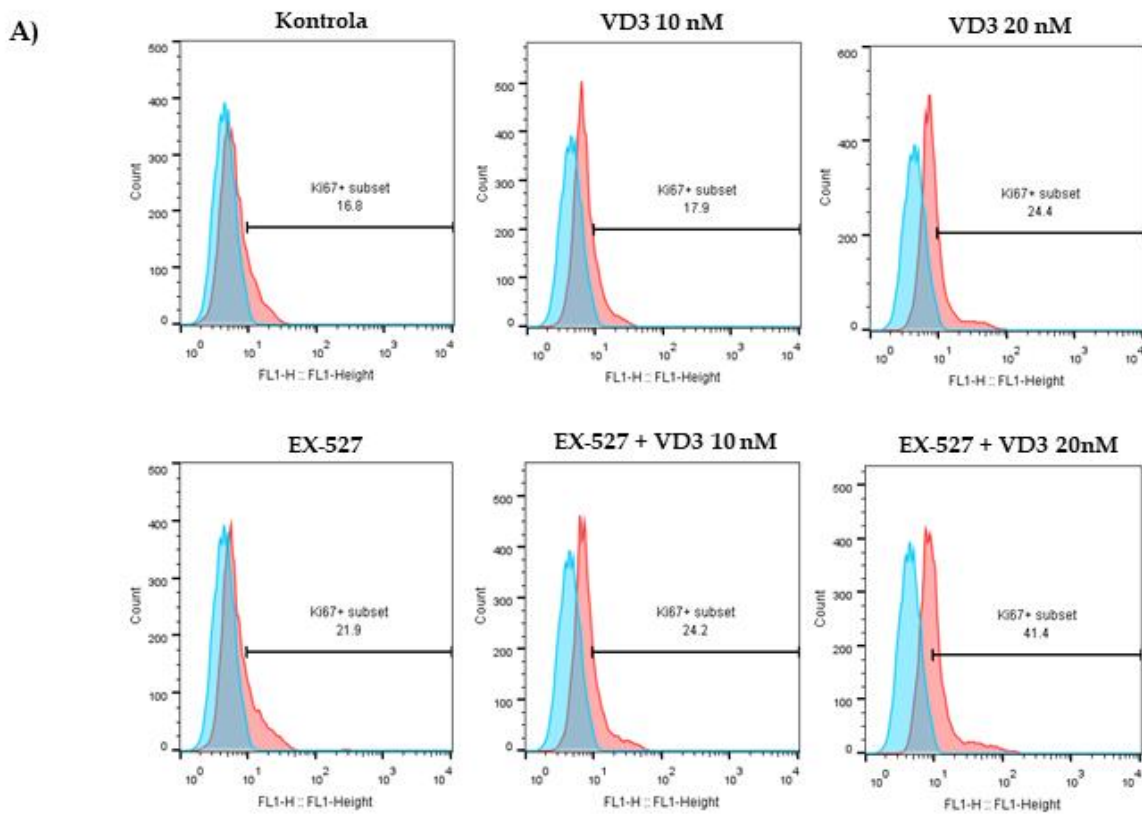


Slika 33. Uticaj EX-527 na ekspresiju SIRT1 signalnog molekula u KS-MMĆ. KS-MMĆ su tretirane sa EX-527 (5 µM) tokom 5 dana. Po završetku tretmana indirektnim imunofluorescentnim bojenjem detektovan je nivo ekspresije SIRT1 obeležavanjem primarnim anti-SIRT antitelom i odgovarajućim sekundarnim FITC-konjugovanim antitelom (zeleno). Za bojenje DNK korišćena je fluorescentna boja DAPI (plavo). Prikazane su reprezentativne slike iz tri nezavisna eksperimenta. Vrednost razmere je 20 µm.



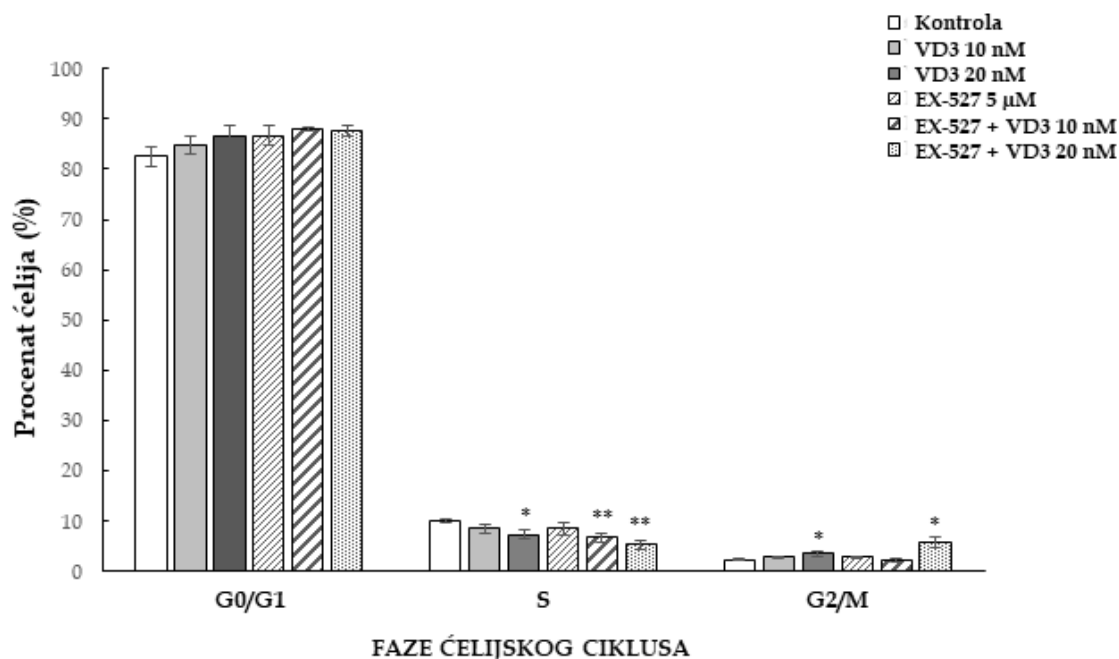
Slika 34. Uloga SIRT1 signalizacije u VD3-indukovanoj stimulaciji vijabilnosti/metaboličke aktivnosti KS-MMĆ. KS-MMĆ su zasejavane u ploče za kultivaciju ćelija sa 96 bunarića (1000 ćelija/bunariću). Nakon 24 h kultivacije pod standardnim uslovima u SM, započinjan je tretman sa VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 µM). Nakon 5 dana tretmana vijabilnost/metabolička aktivnost ćelija određena je MTT testom. Prikazani su rezultati najmanje tri nezavisna eksperimenta kao srednje vrednosti ± SEM. Rezultati su normalizovani u odnosu na kontrolnu netretiranu grupu. Statistički značajne razlike prema Studentovom *t*-testu: ***p* < 0.01; ****p* < 0.001 u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu.

U skladu sa podacima koji su dobijeni MTT testom, rezultati analize ekspresije markera proliferacije, proteina Ki67, ukazali su na sličan uticaj VD3 i EX-527 na proliferativnu aktivnost KS-MMĆ. Naime, nakon 5 dana tretmana KS-MMĆ sa VD3, metodom protočne citometrije detektovan je povećan procenat Ki67 pozitivnih ćelija, naročito u slučaju kada je primenjena veća koncentracija VD3 (20 nM) (Slika 35 A). Pored toga, povećan procenat Ki67 pozitivnih ćelija utvrđen je i nakon tretmana sa EX-527, dok je procentualna zastupljenost ovih ćelija bila najizraženija kada je EX-527 primenjen u kombinaciji sa 20 nM VD3 (Slika 35 A). Analiza ekspresije Ki67 proteina vršena je paralelno i imunofluorescentnom mikroskopijom, a dobijeni rezultati su potvrdili da VD3 indukuje povećanu ekspresiju ovog proteina u KS-MMĆ sa dominantnom lokalizacijom u jedru ćelija (Slika 35 B). S druge strane, kada su ćelije kultivisane u prisustvu EX-527 nije primećena promena pokazanog efekta VD3 na intenzitet ekspresije i lokalizaciju Ki67 proteina u tretiranim ćelijama. Ovi rezultati su potvrdili da je stimulatorni efekat VD3 na proliferaciju KS-MMĆ nezavisan od SIRT1 signalizacije.



Slika 35. Uloga SIRT1 signalizacije u VD3-indukovanoj stimulaciji proliferativne aktivnosti KS-MMĆ. Ekspresija markera proliferacije, Ki67, analizirana je nakon 5 dana tretmana KS-MMĆ sa VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μ M) metodom protočne citometrije i imunofluorescentnim obeležavanjem. A) Rezultati protočne citometrije predstavljeni su reprezentativnim histogramima iz tri nezavisna eksperimenta, na kojima je prikazan procenat Ki67-pozitivnih ćelija (roze osenčeno) u odnosu na nebojene ćelije koje su služile kao negativna kontrola (plavo osenčeno). (B) Ekspresija Ki67 proteina detektovana imunofluorescentnim obeležavanjem primarnim anti-Ki67 antitelom i odgovarajućim sekundarnim FITC-konjugovanim antitelom (zeleno). DNK je bojena fluorescentnom DAPI bojom. Prikazane su reprezentativne slike iz tri nezavisna eksperimenta rađena u duplikatu. Vrednost razmere je 10 μ M.

Uz ispitivanje proliferativne aktivnosti vršena je i analiza ćelijskog ciklusa metodom protočne citometrije kod KS-MMĆ tretiranih 5 dana sa VD3 u kombinaciji bez ili sa EX-527. Na osnovu dobijenih rezultata, ustanovljeno je da tretman sa 20 nM VD3 blago snižava procenat KS-MMĆ u S fazi ćelijskog ciklusa, dok istovremeno povećava procenat ćelija koje se nalaze u G2/M fazi ćelijskog ciklusa (Slika 36). I u ovom slučaju pokazani efekti VD3 nisu bili promenjeni u prisustvu EX-527 ukazujući da VD3 indukuje promene ćelijskog ciklusa KS-MMĆ nezavisno od SIRT1 signalizacije.



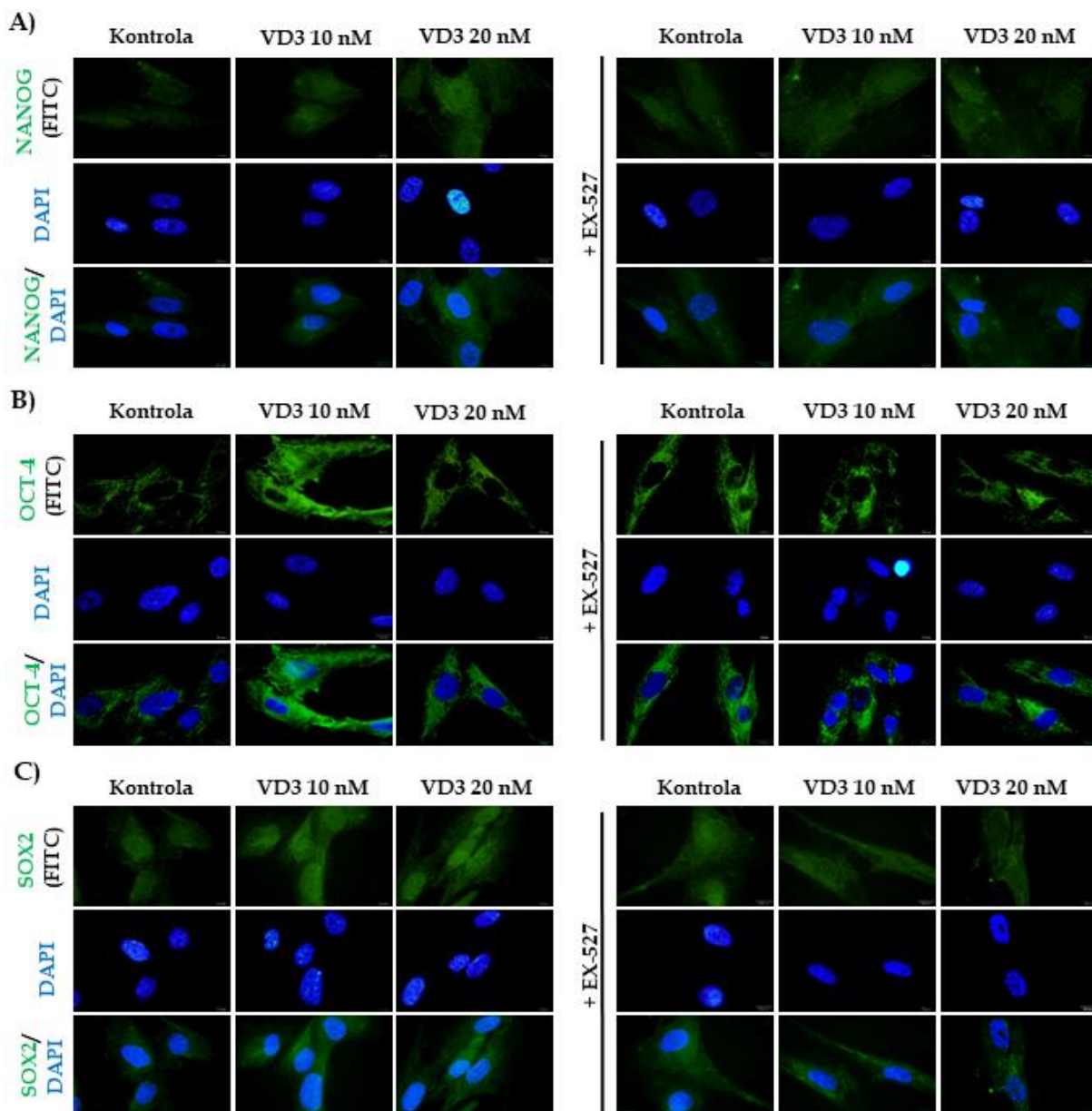
Slika 36. Uloga SIRT1 signalizacije u VD3-indukovanim promenama ćelijskog ciklusa KS-MMĆ. KS-MMĆ su zasejavane u ploče za kultivaciju ćelija sa 6 bunarića u koncentraciji 1×10^5 ćelija/bunariću i kultivisane u SM u standardnim uslovima. Nakon postizanja subkonfluentnosti ćelije su inkubirane u prisustvu VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 µM) tokom 5 dana. Po završetku tretmana ćelijski ciklus KS-MMĆ detektovan je protočnom citometrijom. Određivan je procenat ćelija koje se nalaze u različitim fazama ćelijskog ciklusa (G0/G1, S ili M) na osnovu bojenja DNK propidijum jodidom (PI). Rezultati iz najmanje tri nezavisna eksperimenta predstavljeni su kao srednja vrednost \pm SEM. Statistički značajne razlike prema Studentovom *t*-testu: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu.

4.4.2. Uloga SIRT1 signalizacije u stimulatornom delovanju VD3 na ekspresiju faktora pluripotentnosti u KS-MMĆ

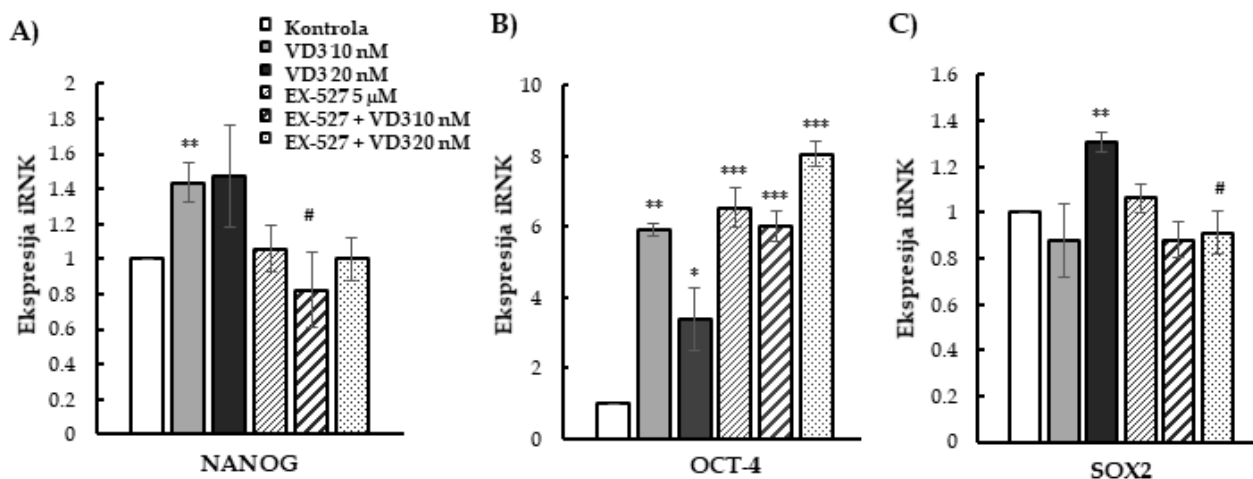
U cilju razjašnjavanja molekularnih mehanizama putem kojih VD3 ostvaruje efekte na regenerativni potencijal KS-MMĆ, analizirana je uloga SIRT1 signalizacije u VD3-posredovanoj regulaciji ekspresije markera pluripotentnosti (NANOG, OCT-4 i SOX2). U te svrhe, nakon 5 dana tretmana KS-MMĆ sa VD3 (10 nM ili 20 nM) u prisustvu ili odsustvu EX-527 (5 µM), određivan je nivo proteinske i genske ekspresije navedenih transkripcionih faktora koji imaju ključnu ulogu u regulaciji samoobnavljanja i pluripotentnosti matičnih ćelija. Rezultati analize proteinske ekspresije, dobijeni metodom imunofluorescentnog obeležavanja, prikazani na Slici 37, pokazuju da su sva tri analizirana transkripciona faktora konstitutivno ekspimirana u KS-MMĆ. Pri tome, za razliku od NANOG i SOX2 proteina čije prisustvo je detektovano u citoplazmi i jedru netretiranih ćelija, ekspresija OCT-4 proteina lokalizovana je samo u njihovoj citoplazmi. Takođe je utvrđeno da petodnevni tretman sa VD3 stimuliše ekspresiju NANOG, OCT-4 i SOX2 proteina u KS-MMĆ, ali su

uočene razlike u obrascu ekspresije ovih markera nakon tretmana. Naime, povišen nivo ekspresije NANOG proteina nakon tretmana sa VD3 bio je primetan kako u citoplazmi tako i u jedru ćelija, dok je ova stimulacija ekspresije smanjena u slučaju kada su ćelije tretirane istovremeno sa EX-527 (Slika 37). Slično je pokazano da obe koncentracije VD3 dovode do stimulacije ekspresije SOX2 proteina u jedru i citoplazmi KS-MMĆ, dok je kombinovani tretman sa EX-527 doveo do redukcije stimulatornog efekta VD3 na SOX2 ekspresiju, posebno u jedru ćelija (Slika 36). U oba slučaja je utvrđeno da sam EX-527 ne utiče na konstitutivnu ekspresiju NANOG i SOX2 faktora u KS-MMĆ. Sa druge strane, dobijeni rezultati su pokazali da tretman sa VD3 indukuje povišenu ekspresiju OCT-4 proteina u citoplazmi KS-MMĆ, pri čemu je ovaj efekat bio izraženiji kada je primenjena niža koncentracija VD3 (10 nM). Takođe je uočeno da sam inhibitor, EX-527, ima stimulatorni efekat na ekspresiju OCT-4 proteina u citoplazmi KS-MMĆ, dok u kombinaciji sa VD3 ne modifikuje stimulatorno dejstvo ovog vitamina na ekspresiju OCT-4 transkripcionog faktora (Slika 36). U skladu sa rezultatima proteinske ekspresije, rezultati qPCR analize su pokazali da je petodnevni tretman sa VD3 doveo do povišene ekspresije iRNK ispitivanih faktora pluripotentnosti u KS-MMĆ (Slika 38). Tako je na nivou genske ekspresije potvrđeno da je EX-527 značajno smanjio stimulatorni efekat VD3 na ekspresiju NANOG i SOX2 iRNK u ovim ćelijama, dok, s druge strane, nije otklonio efekat tretmana VD3 na ekspresiju OCT-4 iRNK. Baš naprotiv, najviši nivo ekspresije OCT-4 iRNK detektovan je u slučaju kada su KS-MMĆ tretirane sa EX-527 u kombinaciji bez ili sa VD3 (Slika 38).

Sagledani zajedno, navedeni rezultati su pokazali da VD3 ispoljava stimulatorni efekat na ekspresiju markera pluripotentnosti u KS-MMĆ, ukazujući na potencijalnu uključenost SIRT1 signalnog puta u stimulatornom delovanju VD3 na ekspresiju NANOG i SOX2, ali ne i na povezanost SIRT1 signalizacije sa VD3-indukovanom ekspresijom OCT-4 transkripcionog faktora u KS-MMĆ.



Slika 37. Uloga SIRT1 signalizacije u VD3-indukovanoj stimulaciji proteinske ekspresije faktora pluripotentnosti u KS-MMC. KS-MMC su tokom 5 dana inkubirane u standardnim uslovima u SM u prisustvu VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μ M). Imunocitohemijska detekcija transkripcionih faktora povezanih sa pluripotentijom: A) NANOG, B) OCT-4, C) SOX2. Ćelije su najpre obeležavane primarnim antitelima za NANOG, OCT-4 i SOX2, a zatim sa odgovarajućim FITC-konjugovanim sekundarnim antitelima (zeleno). Jedra ćelija obeležavana su fluorescentnom DAPI bojom. Prikazane su reprezentativne slike iz tri nezavisna eksperimenta uslikane epifluorescentnim mikroskopom. Vrednost razmere je 10 μ m.

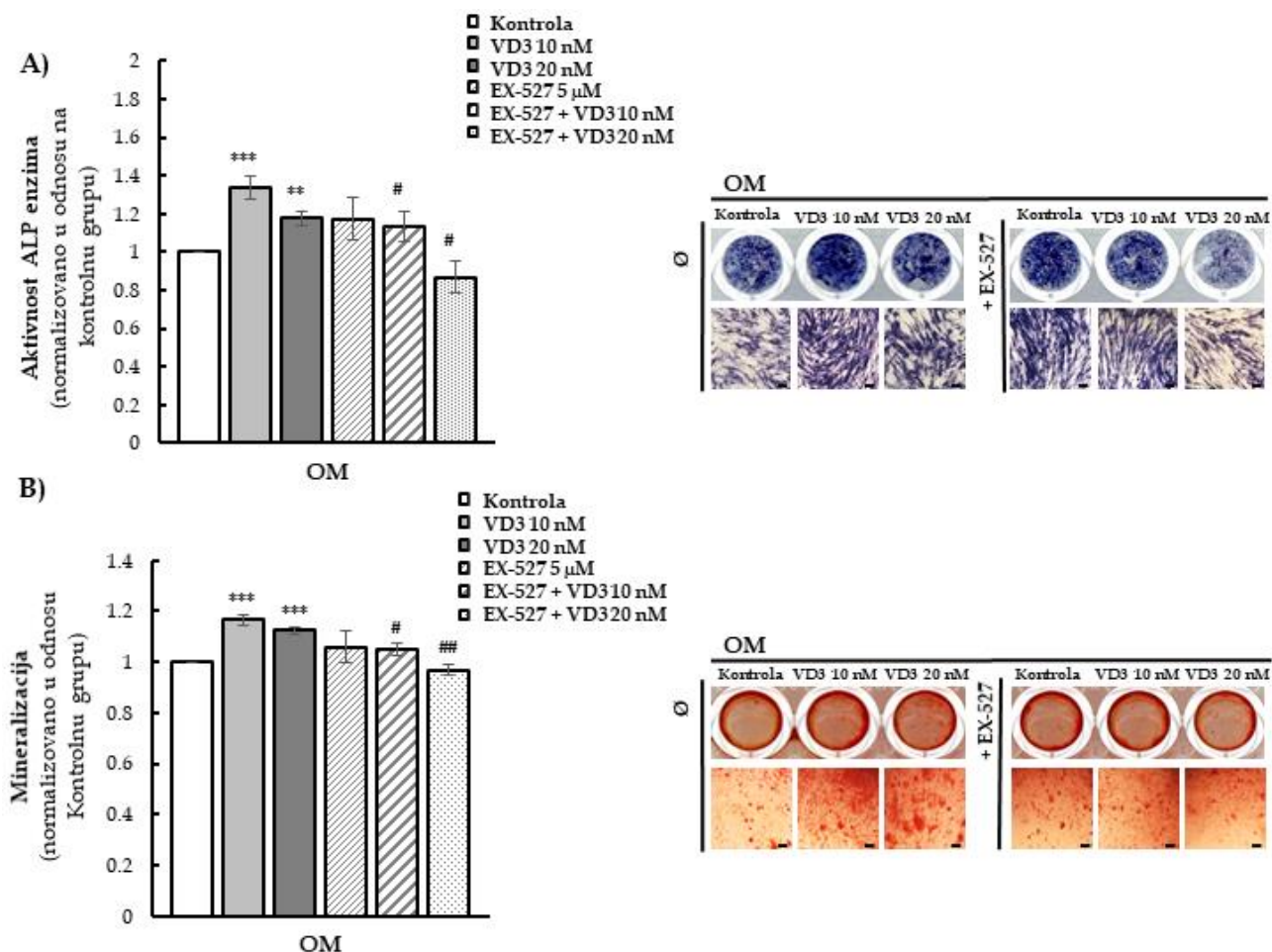


Slika 38. Uloga SIRT1 signalizacije u VD3-indukovanoj stimulaciji genske ekspresije faktora pluripotencije u KS-MMČ. KS-MMČ su tokom 5 dana inkubirane u standardnim uslovima u SM u prisustvu VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μM). Na graficima su prikazani rezultati ekspresije iRNK za A) *NANOG*, B) *OCT-4* i C) *SOX2* dobijeni qPCR analizom. Dobijeni rezultati normalizovani su u odnosu na Ct vrednost konstitutivno ekspimiranog *GAPDH* gena. Za izračunavanje vrednosti korišćen je $2^{-\Delta\Delta CT}$ metod. Rezultati najmanje dva nezavisna eksperimenta predstavljeni su kao srednje vrednosti \pm SEM. Statistički značajne razlike prema Studentovom *t*-testu: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu; # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću grupu tretiranu sa VD3 bez EX-527.

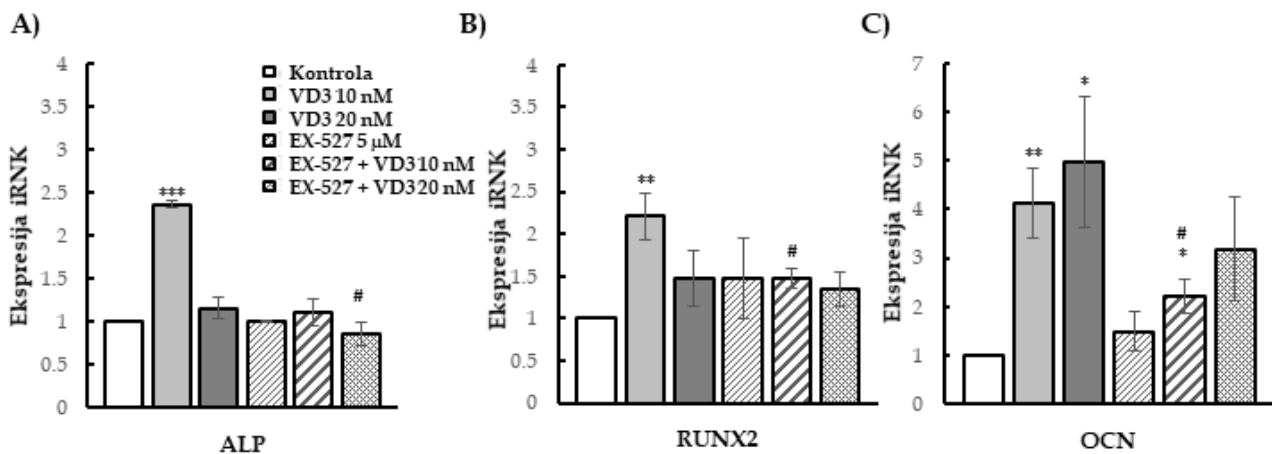
4.4.3. Uloga SIRT1 signalizacije u stimulatornom delovanju VD3 na osteogenu diferencijaciju KS-MMČ

Kako je prethodno pokazano da tretman sa VD3 tokom indukcije osteogeneze KS-MMČ ima stimulatorni efekat na ovaj proces, u daljem toku istraživanja je analizirano kakav uticaj ima pretretman sa VD3 na osteogenezu, kao i potencijalno učešće SIRT1 signalizacije u regulaciji ovog procesa. Sa tim ciljem, KS-MMČ su najpre pretretirane 5 dana sa VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μM) u SM, nakon čega je indukovana osteogena diferencijacija KS-MMČ kultivacijom u OM bez dodatnih faktora. Dobijeni rezultati su ukazali da VD3 u obe primenjene koncentracije, nakon 5 dana pretretmana, ispoljava značajan potencijal stimulacije osteogene diferencijacije KS-MMČ. Stimulatorni efekat pretretmana sa VD3 na osteogenezu potvrđen je kako detekcijom povećanja aktivnosti ALP enzima, tako i većim stepenom mineralizacije (detektovano Alizarin bojenjem) (Slika 39). Sa druge strane, kada su ćelije pretretirane samo sa EX-527, nije primećena promena osteogenog potencijala KS-MMČ, dok je u slučaju kombinovanog pretretmana sa EX-527 i VD3 primećeno da je EX-527 blokirao stimulatorni efekat VD3 na ekspresiju ALP enzima i formiranje depozita kalcijuma. Sposobnost EX-527 da blokira efekat VD3 bila je naročito primetna u slučaju pretretmana u kombinaciji sa 20 nM VD3 (Slika 39). U saglasnosti sa ovim rezultatima su i rezultati analize genske ekspresije specifičnih markera povezanih sa osteogenezom, uključujući *ALP*, *RUNX2* i *OCN*, dobijeni metodom qPCR koji su potvrdili osteo-induktivni efekat VD3 na KS-MMČ. Naime, dok je statistički značajna stimulacija ekspresije iRNK za *ALP* i *RUNX2* detektovana pri tretmanu sa 10 nM VD3, obe koncentracije VD3 značajno su stimulisale ekspresiju iRNK za *OCN* u tretiranim KS-MMČ (Slika 40). Sa druge strane, kada su ćelije tretirane sa VD3 u prisustvu EX-527, primećeno je da je stimulatorni efekat VD3 na ekspresiju iRNK sva tri markera osteogeneze skoro potpuno otklonjen. Dobijeni rezultati su ukazali da pretretman sa VD3,

primenjen čak i u nižim koncentracijama, može pospešiti osteogenu diferencijaciju KS-MMĆ, bar delimično posredstvom aktivacije SIRT1 signalizacije.



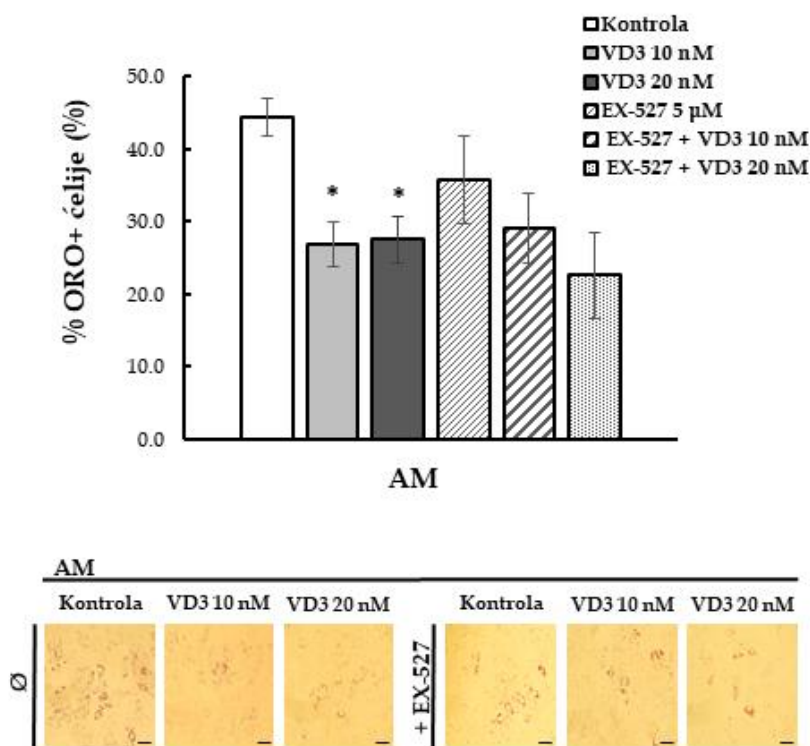
Slika 39. Uloga SIRT1 signalizacije u VD3-indukovanoj stimulaciji osteogene diferencijacije KS-MMĆ. KS-MMĆ su zajesavane u ploče za kulturu ćelija sa 96 bunarića u koncentraciji 5000 ćelija/bunariću. Ćelije su tokom 5 dana kultivisane u standardnim uslovima u SM u prisustvu VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μM), nakon čega je indukovana osteogena diferencijacija kultivacijom u OM. A) Aktivnost ALP enzima detektovana nakon 7 dana kultivacije histoheimijskim bojenjem, B) Depoziti kalcijuma bojeni Alizarin crveno bojom nakon 21 dana kultivacije u OM. Prikazane su reprezentativne slike. Vrednost razmernika je 50 μM. Na graficima je predstavljena kvantitativna analiza aktivnosti ALP enzima A) i nivoa mineralizacije B). Rezultati su normalizovani u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu i prikazani kao srednja vrednost ± SEM najmanje tri nezavisna eksperimenta. Statistički značajne razlike prema Studentovom *t*-testu: ***p* < 0.01; ****p* < 0.001 u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu; #*p* < 0.05, ##*p* < 0.01 u odnosu na odgovarajuću grupu tretiranu sa VD3 bez EX-527.



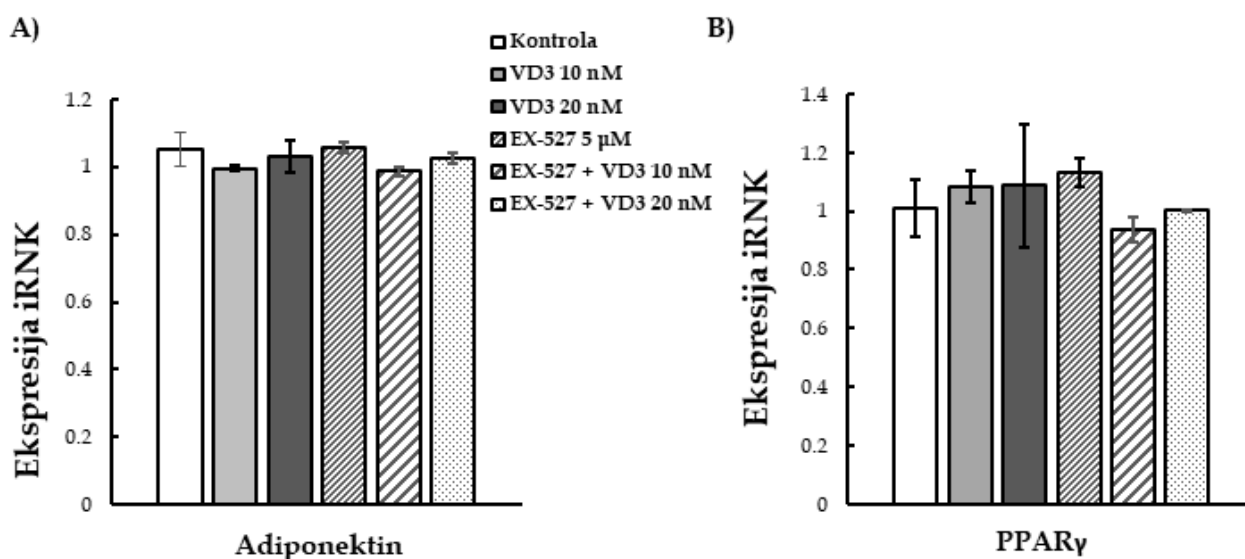
Slika 40. Uloga SIRT1 signalizacije u VD3-indukovanoj stimulaciji genske ekspresije osteogenih markera u KS-MMČ. Za qPCR analizu ekspresije iRNK za A) *ALP*, B) *RUNX2* i C) *OCN*, ćelije su zasejavane u ploče za kultivaciju ćelija sa 6 bunariča (1×10^5 ćelija/bunariću) i tokom 5 dana gajene u standardnim uslovima u SM u prisustvu VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μ M). Dobijeni rezultati relativne ekspresije gena normalizovani su u odnosu na Ct vrednost konstitutivno eksprimiranog *GAPDH* gena. Za izračunavanje vrednosti korišćen je $2^{-\Delta\Delta CT}$ metod. Rezultati najmanje dva nezavisna eksperimenta predstavljeni su kao srednje vrednosti \pm SEM. Statistički značajne razlike prema Studentovom *t*-testu: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu; # $p < 0.05$ u odnosu na odgovarajuću grupu tretiranu sa VD3 bez EX-527.

4.4.4. Uloga SIRT1 signalizacije u inhibitornom delovanju VD3 na adipogenu diferencijaciju KS-MMČ

S obzirom na prethodne rezultate koji su pokazali da tretman sa VD3 tokom indukcije adipogene diferencijacije KS-MMČ deluje inhibitorno na ovaj proces, u daljim istraživanjima je ispitivan uticaj petodnevno pretretmana sa VD3 na adipogenezu, kao i potencijalna uloga SIRT1 signalizacije u regulaciji ovog procesa. U te svrhe, KS-MMČ su pretretirane tokom 5 dana sa VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μ M) u SM, nakon čega je indukovana adipogena diferencijacija kultivacijom u AM bez dodatnih faktora. Step en adipogeneze analiziran je nakon 28 dana kultivacije na osnovu formiranja unutarćelijskih lipidnih tela pri čemu je zapaženo da petodnevni pretretman sa VD3 redukuje step en adipogene diferencijacije KS-MMČ. Međutim, u ovom slučaju, za razliku od rezultata dobijenih pri oste-indukciji, tretman sa EX-527 nije značajno uticao na efekte VD3 (Slika 41). Uz to, rezultati qPCR analize genske ekspresije markera adipogene diferencijacije, uključujući *Adiponektin* i *PPAR γ* su pokazali da VD3, u kombinaciji bez ili sa EX-527, nije imao značajan uticaj na promenu ekspresije navedenih gena (Slika 42). Sveobuhvatno, dobijeni rezultati su ukazali na to da je inhibitorni efekat pretretmana sa VD3 na adipogenezu KS-MMČ nezavisan od SIRT1 signalizacije.



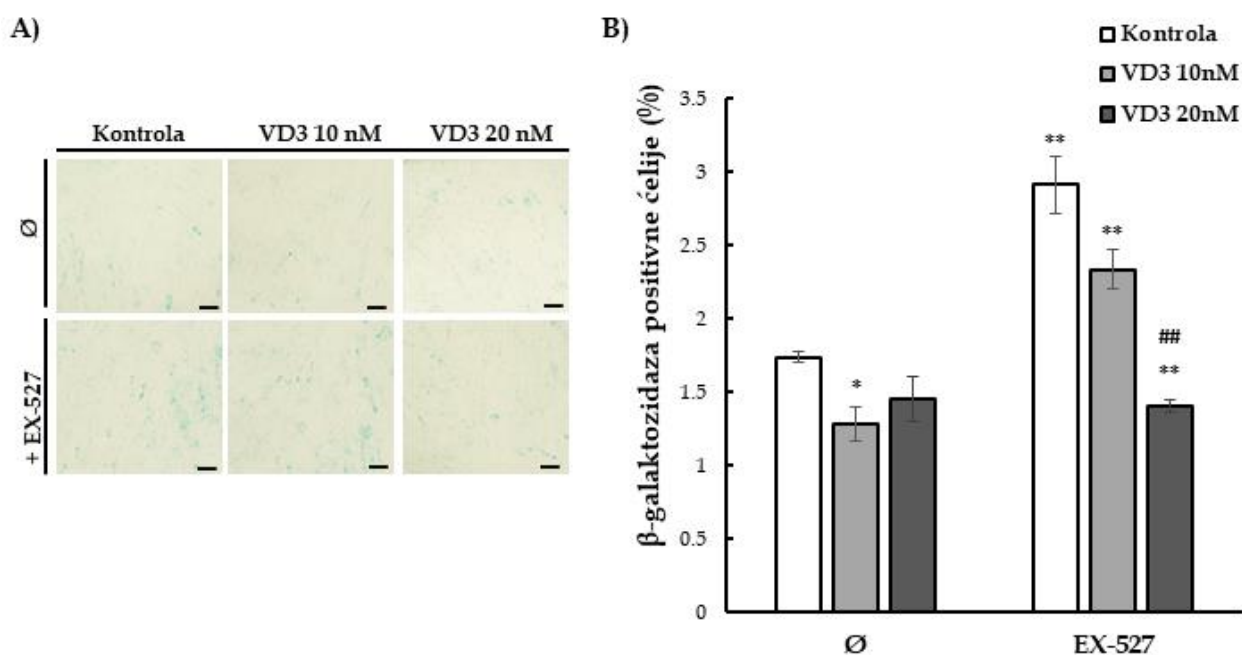
Slika 41. Uloga SIRT1 signalizacije u VD3-indukovanoj inhibiciji adipogene diferencijacije KS-MMĆ. KS-MMĆ su zajesavane u ploče za kulturu ćelija sa 96 bunarića u koncentraciji 5000 ćelija/bunariću. Ćelije su tokom 5 dana gajene u standardnim uslovima u SM u prisustvu VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μM) nakon čega je indukovana adipogena diferencijacija kultivacijom u AM. Nakon 28 dana formirana unutarćelijska lipidna tela detektovana su Oil Red O bojenjem. Prikazane su reprezentativne slike. Veličina razmera je 20 μm. Kvantitativni prikaz na grafiku predstavlja procenat Oil Red O pozitivnih (ORO+) ćelija određivan po vizuelnom polju. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SEM iz najmanje tri eksperimenta. Statistički značajne razlike prema Studentovom *t*-testu: **p* < 0.05 u odnosu na netretiranu grupu kultivisanu u AM.



Slika 42. Uloga SIRT1 signalizacije u VD3-indukovanoj regulaciji genske ekspresije adipogenih markera u KS-MMĆ. Za qPCR analizu ekspresije iRNK za A) *Adiponektin* i B) *PPARγ*, ćelije su zasejavane u ploče za kultivaciju ćelija sa 6 bunarića (1×10^5 ćelija/bunariću) i tokom 5 dana gajene u standardnim uslovima u SM u prisustvu VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μM). Dobijeni rezultati relativne ekspresije gena normalizovani su u odnosu na Ct vrednost konstitutivno eksprimiranog *GAPDH* gena. Za izračunavanje vrednosti korišćen je $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metod. Rezultati najmanje dva nezavisna eksperimenta predstavljeni su kao srednje vrednosti ± SEM.

4.4.5. Uloga SIRT1 signalizacije u delovanju VD3 na ćelijsko starenje KS-MMĆ

U kontekstu ispitivanja uticaja VD3 na ćelijsko starenje (sencenciju) KS-MMĆ, kao i potencijalne uloge SIRT1 signalizacije u regulaciji ovog procesa, nakon 5 dana inkubacije sa VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μ M), analizirana je ekspresija enzima β -galaktozidaze, kao markera senescencije. Dobijeni rezultati su pokazali da je nakon tretmana sa VD3 procenat β -galaktozidaza pozitivnih ćelija bio manji nego u kontrolnoj netretiranoj grupi, pri čemu je statistički značajna razlika utvrđena u slučaju primene 10 nM VD3 (Slika 43). S druge strane, kada je primenjen EX-527, inhibitor SIRT1, procenat β -galaktozidaza pozitivnih ćelija se povećao (Slika 43). Ovaj rezultat je bio očekivan, s obzirom na poznatu protektivnu ulogu SIRT1 u procesu ćelijskog starenja. Međutim, kada je EX-527 primenjen zajedno sa VD3, procenat senescentnih ćelija se smanjio u odnosu na vrednosti detektovane pri primeni samog EX-527. Statistički značajno smanjenje procentualne zastupljenosti β -galaktozidaza pozitivnih ćelija primećeno je u slučaju kada su ćelije bile tretirane sa kombinacijom EX-527 i 20 nM VD3. Ovi rezultati su ukazali da tretman sa VD3 može potencijalno odložiti replikativnu senescenciju KS-MMĆ nezavisno od SIRT1 signalizacije.

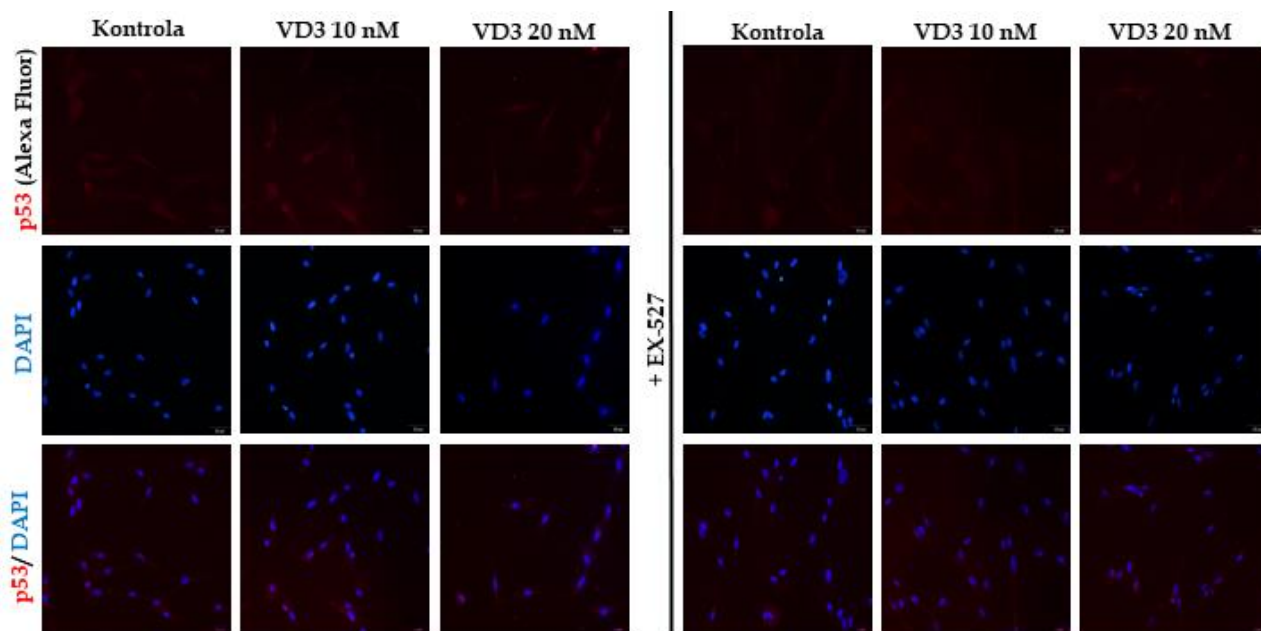


Slika 43. Uloga SIRT1 signalizacije u VD3-indukovanoj inhibiciji ćelijskog starenja KS-MMĆ. KS-MMĆ iz pasaža P5-P7 su zasejavane u ploče za kultivaciju ćelija sa 48 bunarića (2000 ćelija/bunariću). Nakon 5 dana tretmana sa VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μ M) analizirana je ekspresija β -galaktozidaze. A) Prikazane su reprezentativne slike β -galaktozidaza-pozitivnih ćelija. Vrednost razmernika je 50 μ m. B) Kvantitativni prikaz procenta β -galaktozidaza-pozitivnih ćelija po vidnom polju. Rezultati tri nezavisna eksperimenta prikazani su kao srednja vrednost \pm SEM. Statistički značajne razlike prema Studentovom *t*-testu: * p < 0.05; ** p < 0.01 u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu; ## p < 0.01 u odnosu na odgovarajuću grupu tretiranu sa VD3 bez EX-527.

4.4.6. Uticaj VD3 i SIRT1 signalizacije na ekspresiju p53 proteina u KS-MMĆ

S obzirom na pokazan inhibitorni uticaj VD3 na replikativnu senescenciju KS-MMĆ, u narednom koraku ispitivan je uticaj VD3 na ekspresiju važnog regulatora ćelijske proliferacije i starenja, p53 proteina, kao i uloga SIRT1 signalizacije u ovom procesu. Nakon

5 dana tretmana sa VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μ M), analizirana je ekspresija p53 proteina imunofluorescentnom mikroskopijom. Dobijeni rezultati su ukazali da VD3 primenjen u obe koncentracije nije imao značajan uticaj na ekspresiju ovog proteina u KS-MMĆ (Slika 44). S druge strane, pri tretmanu sa EX-527 pokazana je nešto slabija ekspresija p53 proteina u ovim ćelijama (Slika 44), što upućuje na potencijalnu ulogu SIRT1 signalizacije u regulaciji ekspresije p53 proteina.



Slika 44. Uticaj VD3 i SIRT1 signalizacije u regulaciji ekspresije p53 proteina u KS-MMĆ. Ekspresija i lokalizacija markera ćelijskog starenja, p53 proteina, analizirana je imunofluorescentnom mikroskopijom nakon 5 dana tretmana KS-MMĆ sa VD3 (10 nM ili 20 nM) u kombinaciji bez ili sa EX-527 (5 μ M). Ćelije su obeležavane sa primarnim antitelom za p53, a zatim sa odgovarajućim sekundarnim Alexa Fluor 555-konjugovanim antitelom (crveno). Da bi se obeležila jedra ćelja korišćena je fluorescentna DAPI boja (plavo). Predstavljene su reprezentativne fotografije iz tri nezavisna eksperimenta rađena u duplikatu, slikane pomoću epifluorescentnog mikroskopa. Vrednost razmere: 50 μ m.

5. DISKUSIJA

Zahvaljujući svojoj multipotentnosti, MMC su prepoznate kao obećavajući kandidati za terapijsku primenu u regeneraciji tkiva. Nakon izolacije iz različitih tkiva, ove ćelije se mogu relativno lako umnožiti i diferencirati u osteoblaste, hondroците ili adipocite *in vitro* (Kolf et al., 2007; Andrzejewska, Lukomska, et al., 2019). Pored ove njihove karakteristike, interesovanje za terapijsku primenu MMC je podstaknuto važnom ulogom ovih ćelija *in vivo* u održavanju tkivne homeostaze i stvaranju regenerativnog okruženja putem sekrecije mnogobrojnih biološki aktivnih faktora i privlačenja drugih ćelija važnih za reparaciju tkiva (Lin et al., 2019). U fokusu ispitivanja potencijala njihove terapijske primene, MMC su se takođe našle zbog svog imunomodulatornog potencijala. Imunomodulatorna svojstva MMC pokazala su obećavajuće rezultate za potencijalnu primenu u lečenju bolesti koje karakteriše izraženo inflamatorno mikrookruženje, kao što su bolest kalem protiv domaćina (Le Blanc et al., 2008) i autoimuni poremećaji (Duijvestein et al., 2010). Kako su MMC izolovane prvenstveno iz KS, ove ćelije predstavljaju „zlatni standard“ u mnogim ispitivanjima. Iako su tokom poslednje decenije pokrenute brojne prekliničke i kliničke studije (<https://www.clinicaltrials.gov> i <https://www.clinicaltrialsregister.eu>), biologija KS-MMC, kao i mehanizmi koji se nalaze u osnovi njihovih osobina i dalje nisu u potpunosti poznati. Uprkos mnogobrojnim istraživanjima, nedoumice u vezi procene njihovog terapijskog potencijala u najvećoj meri proizilaze iz heterogenosti MMC koja je pokazana kako između različitih davalaca i različitih tkiva iz kojih su ćelije izolovane, tako i između različitih subpopulacija KS-MMC u okviru istog uzorka. Kada se uzme u obzir nedostatak jedinstvenih kriterijuma i standarda za izolaciju i kultivaciju ovih ćelija, postaje jasno da su to osnovni razlozi otežanog poređenja rezultata različitih istraživačkih grupa i usporenog napretka u ovoj oblasti. Uzimajući u obzir sve potencijalne razloge koji leže u osnovi ovih razlika, naša početna istraživanja bila su usmerena ka optimizaciji izolovanja MMC iz KS zdravih davalaca, karakterizaciji i proceni razlika svojstva i funkcija KS-MMC između davalaca na osnovu analize njihovog proliferativnog i klonogenog kapaciteta, kao i potencijala diferencijacije.

Za potrebe ovog istraživanja, MMC su izolovane iz aspirata KS davalaca uzrasta od 2 do 13 godina na način opisan u odeljku Materijal i metodi. Na osnovu istraživanja Yang i saradnika, koji su приметili da je pri kultivaciji u α -MEM medijumu morfologija KS-MMC bila očuvana duži vremenski period nego u slučaju kada su MMC gajene u DMEM (Yang et al., 2018), kultivacija izolovanih ćelija je vršena u α -MEM sa dodatkom 10% FBS. Pri ispitivanju morfologije izolovanih ćelija, posmatranjem pod fazno-kontrastnim mikroskopom, nisu uočene razlike u veličini, niti u obliku adherentnih ćelija između različitih davalaca. Naime, tokom kultivacije *in vitro* adherentne ćelije izolovane iz KS svih davalaca imale su karakterističan oblik sličan fibroblastima (Maeschi et al., 2006; Baghaei et al., 2017; Song et al., 2018; Yang et al., 2018; Mennan et al., 2019; Bhat et al., 2021). Na taj način je pokazano da su izolovane ćelije zadovoljavale prvi minimalni kriterijum za definisanje MMC prema Komitetu za mezenhimske i tkivne matične ćelije Međunarodnog društva za ćelijsku terapiju (Dominici et al., 2006).

U skladu sa rezultatima drugih grupa u našem istraživanju je kod izolovanih ćelija svih davalaca detektovan visok nivo ekspresije površinskih molekula koje tipično eksprimiraju MMC (CD29, CD73, CD90 i CD105), uz odsustvo ekspresije markera zrelih hematopoetskih ćelija CD45 i HLA-DR. Na taj način je utvrđeno da izolovane adherentne ćelija ispunjavaju drugi zahtev Komiteta za identifikaciju MMC (Dominici et al., 2006). U studijama u kojima je ispitivan imunofenotip MMC izolovanih iz KS odraslih osoba takođe

je primećena visoka ekspresija CD73, CD90 i CD105 markera (Baghaei et al., 2017; Song et al., 2018; Yang et al., 2018; Mennan et al., 2019; Petrenko et al., 2020; Bhat et al., 2021), kao i visoka ekspresija CD29 markera (Yang et al., 2018; Petrenko et al., 2020). Nizak procenat CD45 i HLA-DR pozitivnih ćelija koji je ustanovljen u našoj studiji u skladu je sa rezultatima drugih istraživača (Mennan et al., 2019; Petrenko et al., 2020; Bhat et al., 2021). Na osnovu ovih zapažanja potvrđeno je da je imunofenotip KS-MMĆ pedijatrijskih davalaca sličan kao i kod odraslih (Mareschi et al., 2006), a takođe i uporediv sa imunofenotipom MMĆ koje potiču iz drugih tkiva (Kern et al., 2006; Araújo et al., 2017; Petrenko et al., 2020).

Kao treći kriterijum za identifikaciju MMĆ, ispitivan je kapacitet multipotentne diferencijacije izolovanih ćelija. Rezultati ovih analiza su ukazali na sličan diferencijacioni potencijal KS-MMĆ svih davalaca, s obzirom da nije bilo vidljivih razlika između davalaca u pogledu potencijala za osteogenu, adipogenu ili hondrogenu diferencijaciju. Dobijeni rezultati su u skladu sa podacima drugih istraživača koji su pokazali diferencijacioni potencijal KS-MMĆ odraslih donora za osteogenezu, adipogenezu i hondrogenezu (Mareschi et al., 2006; Baghaei et al., 2017; Ghaneialvar et al., 2018; Yang et al., 2018; Mennan et al., 2019; Bhat et al., 2021). Pored toga, tokom *in vitro* kultivacije u standardnom medijumu pokazali smo da nije bilo spontane diferencijacije izolovanih ćelija ni ka jednoj ćelijskoj lozi, slično izveštajima drugih istraživačkih grupa (Pittenger et al., 1999; Mareschi et al., 2006; Meppelink et al., 2016).

Dobijeni rezultati su potvrdili da izolovane ćelije ispunjavaju sva tri kriterijuma Komiteta, čime je dokazano da su MMĆ uspešno izolovane iz KS svih davalaca. Prema istraživanju Mareschi i saradnika, KS-MMĆ davalaca pedijatrijskog uzrasta i mladih odraslih davalaca nisu se značajno razlikovale u pogledu kriterijuma za ćelijsku karakterizaciju (Mareschi et al., 2006). Naši rezultati su u skladu sa navedenim i ne ukazuju na značajne razlike u pogledu karakterizacije KS-MMĆ različitih davalaca uzrasta 2-12 godina. Naime, KS-MMĆ izolovane iz svih davalaca imale su sličnu morfologiju, ekspresiju površinskih markera i potencijal diferencijacije, nezavisno od pola, krvne grupe i godina.

U sklopu ispitivanja morfoloških karakteristika izolovanih KS-MMĆ različitih davalaca, i njihove veze sa funkcijskim odlikama ovih ćelija, analizirali smo ekspresiju aktina u KS-MMĆ. Naime, poznato je da se u odgovoru na hemijske i fizičke uticaje iz vanćelijskog okruženja, prenos signala koji utiču na ekspresiju gena u MMĆ delimično sprovodi posredstvom aktinskog citoskeleta (Sen et al., 2017). Pri tome aktin prisutan u jedru ima ulogu u regulisanju lokalizacije heterohromatina i aktivnosti RNK polimeraze, čime utiče na transkripciju gena (Ramdas & Shivashankar, 2015). Takođe, u jedru aktin može da stupi u interakciju sa različitim faktorima transkripcije i na taj način da utiče na specifičan ćelijski fenotip (Sharili et al., 2016). Ustanovljeno je da je smanjenje nivoa aktina u jedru povezano sa nižom stopom proliferacije i sa uspostavljanjem stanja mirovanja ćelija (eng. *Quiescence*) (Spencer et al., 2011). Rezultati pojedinih istraživanja takođe dovode u vezu remodeliranje aktina sa jedne strane i ćelijsko starenje i usmerenu diferencijaciju MMĆ u zrelije ćelije sa druge strane (Mishra et al., 2019). Aktin ima važnu ulogu u održavanju oblika kako jedra tako i same ćelije, a učestvujući u regulaciji promene oblika ćelije, povezan je i sa regulacijom diferencijacionog potencijala MMĆ (Khan et al., 2020). Brojni podaci u naučnoj literaturi sugerišu da polimerizacija/depolimerizacija aktina može biti veoma važna za regulaciju adipogeneze i osteogeneze. Poremećaj aktinskog citoskeleta izazvan citohalazinom D rezultirao je translokacijom aktina u jedro i povećanom ekspresijom osteogenih i adipogenih gena (Sen et al., 2017). Dok je za osteogenu diferencijaciju pokazana karakteristična polimerizacija aktina, stabilizacija i stvaranje vlakana, tokom adipogeneze dolazi do depolimerizacije aktina i njegove redukovane organizacije (Khan et al., 2020). Sve

navedeno nas je navelo da ispitamo da li postoje razlike u pogledu lokalizacije ili nivoa ekspresije aktina između KS-MMĆ različitih davalaca. Dobijeni rezultati detekcije aktina nakon fluorescentnog imunocitohemijskog bojenja ukazali su da je nivo ekspresije F-aktina u citoplazmi i u jedru ćelija bio ujednačen kod svih ispitivanih davaoca.

U sledećem koraku, u cilju analize kapaciteta samoobnove KS-MMĆ različitih davalaca, ispitivan je njihov klonogeni potencijal. Dobijeni rezultati su pokazali da izolovane ćelije svih davalaca formiraju CFU-F tipične, ali heterogene morfologije. Broj CFU-F kolonija bio je ujednačen između različitih davaoca sa efikasnošću formiranja kolonija od oko 3%. Mada su prethodna istraživanja drugih grupa pokazala da efikasnost formiranja kolonija može varirati u zavisnosti od uslova kultivacije (Meuleman et al., 2006; Bhat et al., 2021), kao i od broja pasaža (Dmitrieva et al., 2012; Vishnubalaji et al., 2012), naši rezultati su uporedivi sa objavljenim podacima drugih istraživača. Naime, u studiji u kojoj su korišćene KS-MMĆ iz četvrte pasaže efikasnost formiranja kolonija iznosila je oko 5%-8% CFU-F (Dmitrieva et al., 2012; Vishnubalaji et al., 2012). Isto tako, prema rezultatima Alcayaga-Miranda i saradnika u pasažama P3-P6 efikasnost formiranja CFU-F kolonija je bila oko 5% (Alcayaga-Miranda et al., 2015), a slični rezultati su dobijeni i kada je bio ispitivan klonogeni potencijal KS-MMĆ iz šeste pasaže (Bhat et al., 2021). S obzirom da se navedeni podaci odnose na MMĆ koje su izolovane iz KS starijih davalaca, naši rezultati ukazuju na to da je klonogeni potencijal KS-MMĆ zdravih davalaca uzrasta 2-12 godina sličan kao i kod odraslih.

Transkripcioni faktori povezani sa pluripotencijom, uključujući NANOG, OCT-4 i SOX2, imaju ključnu ulogu u održavanju EMĆ u stanju matičnosti (Boiani & Schöler, 2005; Boyer et al., 2005), a povezuju se takođe i sa karakteristikama matičnosti MMĆ. Iako su prethodne studije pokazale da markeri pluripotencije mogu funkcionisati i kao regulatori samoobnavljanja i višelinijuskog kapaciteta diferencijacije adultnih matičnih ćelija (Tsai et al., 2012; Seo et al., 2013), značaj ekspresije NANOG, OCT-4 i SOX2 u KS-MMĆ nije u potpunosti razjašnjen. Naime, postoje nedoslednosti u rezultatima različitih istraživačkih grupa po pitanju ekspresije ovih markera pluripotencije u humanim KS-MMĆ. Za razliku od istraživača koji su identifikovali prisustvo sva tri navedena faktora pluripotencije u KS-MMĆ (Malvicini et al., 2019), rezultati pojedinih grupa su drugačiji. Pierantozzi i saradnici su u KS-MMĆ detektovali samo prisustvo NANOG faktora (Pierantozzi et al., 2011), dok su Heo i saradnici pokazali ekspresiju SOX2 i NANOG u ovim ćelijama (Heo et al., 2016). S druge strane, prema istraživanjima Riekstina i saradnika, u humanim KS-MMĆ utvrđena je ekspresija NANOG i OCT-4 transkripcionih faktora (Riekstina et al., 2009). Uočene razlike u ekspresiji markera pluripotencije mogu biti posledica heterogenosti KS-MMĆ i različitih uslova kultivacije *in vitro*. Naši rezultati pokazuju da MMĆ koje su izolovane iz KS zdravih davalaca uzrasta 2-12 godina konstitutivno eksprimiraju sva tri navedena markera povezana sa pluripotencijom (OCT-4, NANOG i SOX2). Pored toga, zanimljivo je da su u našim istraživanjima uočene izvesne razlike u ekspresiji ovih markera. Naime, u poređenju sa ostalim davaocima, kod davalaca D1 i D2 detektovan je nešto niži intenzitet ekspresije NANOG, SOX2 i OCT-4 proteina, čija ekspresija je bila lokalizovana u perinuklearnom regionu i citoplazmi ćelija. Kod davaoca D3 utvrđena je slična lokalizacija i nivo ekspresije NANOG proteina kao i kod davalaca D1 i D2, dok je intenzitet ekspresije OCT-4 i SOX2 proteina bio viši sa dominantnom lokalizacijom u jedru i perinuklearnom regionu ćelija. S druge strane, kod davaoca D4 detektovan je visok nivo NANOG proteina u jedru i OCT-4 proteina u jedru i perinuklearnom regionu KS-MMĆ, dok je ekspresija SOX2 proteina bila nešto niža u poređenju sa drugim davaocima i lokalizovana u perinuklearnom regionu i citoplazmi ćelija. KS-MMĆ davaoca D5 eksprimirale su OCT-4 i SOX2 proteine u visokom

nivou u jedru i perinuklearnom regionu, dok je intenzitet ekspresije NANOG proteina bio nešto niži, sa dominantnom lokalizacijom u citoplazmi i perinuklearnom regionu ćelija. Uočene razlike u nivou ekspresije i lokalizaciji markera povezanih sa pluripotencijom mogu ukazivati na varijacije u potencijalu samoobnavljanja KS-MMĆ među različitim davaocima, što ostaje da bude ispitano dodatnim ispitivanjima. Zaista, podaci o uticaju subćelijske lokalizacije ispitivanih faktora pluripotencije na karakteristike matičnih ćelija su uglavnom oskudni i nejasni (Jauković et al., 2021). Mogući značaj koji bi obrazac ekspresije NANOG, SOX2 i OCT-4 transkripcionih faktora mogao imati pri izboru adekvatnog davaoca radi potencijalne terapije različitih oboljenja treba detaljnije ispitati.

U sklopu uporedne analize funkcijskih osobina KS-MMĆ različitih davalaca, u nastavku istraživanja je upoređivan proliferativni kapacitet ovih ćelija. Rezultati našeg istraživanja su ukazali da KS-MMĆ različitih davalaca imaju sličnu metaboličku aktivnost. Takođe, uz sličnu vijabilnost ćelija pokazana je i ujednačena stopa proliferacije KS-MMĆ. Naime, ispitivane KS-MMĆ svih davalaca ispoljile su sličnu brzinu rasta tokom produžene *in vitro* kultivacije. Vreme potrebno za udvostručavanje populacije (PDT) KS-MMĆ svih davalaca kretalo se u opsegu od 60 do 70 h tokom pasažiranja do šeste pasaže, P6. Navedeni rezultati u skladu su sa objavljenim podacima drugih istraživača (Li et al., 2014; Yang et al., 2018; Bhat et al., 2021). U saglasnosti sa rezultatima PDT testa koji ukazuju na aktivni proliferativni kapacitet ćelija su i rezultati dobijeni procenom procesa senescencije praćenjem aktivnosti β -galaktozidaze. Analizom aktivnosti ovog enzima kod KS-MMĆ iz P5, utvrđeno je da je broj senescentnih ćelija kod svih davalaca mali, slično drugim podacima iz literature (Kundrotas et al., 2016).

Rezultati analiza ćelijske proliferacije KS-MMĆ dodatno su potvrđeni na molekularnom nivou. Naime, rezultati dobijeni imunofluorescentnim obeležavanjem su pokazali da je marker proliferacije Ki67 konstitutivno eksprimiran u KS-MMĆ svih davalaca. Međutim, uz to su zapažene razlike u lokalizaciji Ki67 proteina između davalaca. Dok je kod davalaca D1, D2 i D3 marker proliferacije Ki67 bio eksprimiran u jedru i citoplazmi KS-MMĆ, kod davalaca D4 i D5 utvrđena je dominantna lokalizacija Ki67 u citoplazmi ovih ćelija. Iako se Ki67 smatra nuklearnim proteinom (Chierico et al., 2017), podaci prethodnih studija su pokazali da je u bazalnim uslovima ekspresija Ki67 proteina u dentalnim matičnim ćelijama lokalizovana pretežno u ćelijskoj citoplazmi (Kukolj et al., 2019), dok je u slučaju matičnih ćelija izolovanih iz masnog tkiva ekspresija Ki67 proteina primećena kako u citoplazmi, tako u jedru ćelija (Nawrocka et al., 2017). Tradicionalno se Ki67 protein smatra markerom ćelijske proliferacije zbog njegovog prisustva u jedru tokom svih aktivnih faza ćelijskog ciklusa (G1, S, G2 i M) (Miller et al., 2018), usled čega je uloga Ki67 najviše izučavana i posebno dobro opisana kod ćelija kancera (Li et al., 2014; Remnant et al., 2021). Pokazano je da Ki67 ima ulogu u formiranju perihromozomskog sloja na mitotičkim hromozomima (Booth et al., 2014), kao i da je važan za kondenzaciju i dekonenzaciju hromozoma u mitozu (Cuylen et al., 2016), održavanje strukture heterohromatina i progresiju kroz ćelijski ciklus (Sobecki et al., 2016). Takođe, prema pojedinim istraživanjima odsustvo ekspresije Ki67 proteina može ukazivati na senescenciju ćelija, a primećeno je i da broj Ki67 pozitivnih ćelija kontinuirano opada pri umnožavanju humanih fibroblasta i mezotelijalnih ćelija (Correia-Melo et al., 2013). Međutim, nedavno sprovedena istraživanja ukazuju da Ki67 ne treba smatrati samo markerom ćelijske proliferacije (Sales Gil & Vagnarelli, 2018; Sun & Kaufman, 2018). Sa druge strane, prema istraživanjima Sales i saradnika, tokom perioda koji ćelija provodi u mirovanju (eng. *quiescent*) nivo Ki67 proteina opada, a ćelije mogu imati različit nivo ekspresije Ki67 proteina u zavisnosti od toga koliko su dugo vremena provele u stanju mirovanja pre ulaska u ćelijski

ciklus. Ova ispitivanja ukazuju da nivo ekspresije Ki67 proteina zavisi ne samo od faze ćelijskog ciklusa u kom se ćelija nalazi, već i od njene „prošlosti“. Dakle, postoje indikacije da bi precizna procena nivoa ekspresije Ki67 mogla pružiti više informacija, a ne samo odgovor na pitanje da li se ćelija nalazi u proliferativnom stanju ili ne. Istraživanja ukazuju da bi se na ovaj način mogle razlikovati ćelije koje se brzo i često dele od ćelija koje provode duže periode u stanju mirovanja pre nego što ponovo uđu u ćelijski ciklus (Sales Gil & Vagnarelli, 2018). Kada su Chierico i saradnici proučavali puteve regulacije signalizacije Ki67 proteina izvan jedra kod tumorskih i normalnih ćelija (humani fibroblasti kože i endotelne ćelije pupčane vrpce), dobili su rezultate koji su sugerisali da u normalnim ćelijama Ki67 protein može biti translociran izvan jedra, što dovodi do njegove akumulacije najpre u endoplazmatičnom retikulumu, a kasnije i u Goldžijevom aparatu. Sa druge strane, translokacija Ki67 proteina bila je znatno manje primetna u tumorskim ćelijama. Navedena zapažanja ukazala su na moguću regulaciju degradacije Ki67 izvan jedra, kao i mogućnost translokacije ovog proteina tokom različitih faza interfaze ćelijskog ciklusa (Chierico et al., 2017). Iz svega navedenog proizilazi da su neophodna dodatna istraživanja kako bi se razjasnila povezanost jedarne i citoplazmatske lokalizacije Ki67 sa karakteristikama adultnih matičnih ćelija, kao i značaja primećene različite lokalizacije ovog proteina u KS-MMĆ različitih davalaca.

Pored ekspresije Ki67 proteina ispitivana je i ekspresija p53, proteina koji je uključen u procese senescencije, starenja (Hafner et al., 2019; Xia et al., 2020) i diferencijacije MMĆ, održavanja homeostaze kostiju (Velletri et al., 2016), kao i regulaciju drugih funkcija MMĆ (Boregowda et al., 2018). Naši rezultati su potvrdili bazalnu ekspresiju p53 u KS-MMĆ davalaca uzrasta 2-12 godina, pri čemu su među davaocima primećene razlike u njegovoj ćelijskoj lokalizaciji. Naime, p53 je bio lokalizovan u jedru davalaca D4 i D5, dok je kod davalaca D1, D2 i D3 ovaj protein bio ekspimiran pretežno u citoplazmi. Regulacija ćelijske lokalizacije p53 uslovljena je mnogim signalnim faktorima koji utiču na njegov transport u i iz jedra, i tako subnuklearnu i citoplazmatsku lokalizaciju (O'Brate & Giannakakou, 2003; Solozobova & Blattner, 2011; Gu et al., 2013). Kada je u pitanju lokalizacija p53 proteina u matičnim ćelijama, postoje indikacije da je p53 lokalizovan pretežno u citoplazmi u proliferišućim embrionalnim matičnim ćelijama, dok se nakon oštećenja DNK indukuje njegova akumulacija u jedru što dovodi do transkripcione aktivacije gena uključenih u zaustavljanje ćelijskog ciklusa (Solozobova et al., 2009). Studija koju su sproveli Gu i saradnici je pokazala da KS-MMĆ pacijenata sa sistemskim eritematoznim lupusom pokazuju karakteristike ćelijskog starenja, pri čemu su p53 i p21 uglavnom lokalizovani u jedru ovih ćelija (Gu et al., 2013). Veća lokalizacija p53 u jedru takođe je otkrivena u MMĆ dobijenim iz periosta starijih pacijenata (Ferretti et al., 2015) što ukazuje na potencijalnu povezanost lokalizacije p53 proteina i uzrasta davaoca. Međutim, još uvek postoje otvorena pitanja u vezi sa preciznom ulogom p53 u različitim ćelijama i tkivima, kao i regulacijom aktivnosti p53 kod ljudi u zavisnosti od pola, starosti ili metaboličkog stanja (Sullivan et al., 2018). Iako je ćelijska lokalizacija promenljiva, potrebne su dalje studije da bi se detaljnije ustanovilo kakav uticaj lokalizacija ovog proteina ima na funkcijske karakteristike MMĆ, kao i da bi se procenila potencijalna korelacija ekspresije/lokalizacije p53 sa obrascem ekspresije/lokalizacije Ki67 proteina.

U celini gledano, rezultati standardnih bioloških testova koji su korišćeni za uporednu analizu svojstava i funkcija KS-MMĆ pokazuju da izolovane ćelije ispunjavaju sve uslove neophodne za karakterizaciju MMĆ, kao i da između davaoca ne postoje razlike po pitanju morfologije, fenotipa, multipotentnog potencijala diferencijacije (u pravcu osteogene, adipogene i hondrogene loze) i kapaciteta za formiranje kolonija. S druge strane,

rezultati indirektnog imunofluorescentnog bojenja transkripcionih faktora pluripotentnosti (NANOG, SOX2 i OCT-4), markera proliferacije Ki67 i regulatora ćelijskog ciklusa i starenja p53, ukazuju na fine razlike u ekspresiji i subćelijskoj lokalizaciji ovih molekula u KS-MMĆ koje zahtevaju detaljnije ispitivanje. Da bi se u potpunosti opisala heterogena populacija MMĆ, postoji potreba za primenom naprednijih tehnologija koje bi mogle da obezbede podatke o svakoj analiziranoj ćeliji (analiza pojedinačnih ćelija). Većina tehnika ćelijske i molekularne biologije veoma je zahtevna u pogledu pripreme uzorka i trajanja procesa kultivacije pre izvođenja eksperimenata (Lähnemann et al., 2020; Zheng et al., 2020). Upotreba tehnologija koje bi omogućile jednostavnu, brzu, reproduktivnu, nedestruktivnu i informacijama bogatu karakterizaciju svake ćelije u populaciji MMĆ bila bi veoma značajna za osnovna istraživanja i upotpunila bi saznanja o varijabilnosti ovih ćelija.

Pored kompleksne heterogenosti populacije KS-MMĆ najveći ograničavajući faktor za terapijsku primenu KS-MMĆ, uprkos brojnim istraživanjima, predstavlja neophodnost *ex vivo* ekspanzije kako bi se dobio dovoljan i adekvatan broj ćelija za njihovu potencijalnu primenu. Naime, primećeno je da dugotrajna kultivacija može dovesti do ćelijskog starenja KS-MMĆ i time negativno uticati na kvalitet ćelija, odnosno smanjiti efikasnost potencijalne ćelijske terapije. Da bi se ovaj problem bar delimično eliminisao, preporuka je da se kliničke studije ograničavaju na upotrebu KS-MMĆ do četvrte pasaže (Dominici et al., 2006). Iako se na ovaj način smanjuje rizik od alteracija ćelija i održava efikasnost pri *in vivo* primeni, da bi se dobio adekvatan broj KS-MMĆ potrebno je izdvojiti veliki broj MMĆ od pacijenta ili davaoca. Takođe je važno uzeti u obzir da kada se KS-MMĆ izoluju, njihove karakteristike mogu uveliko varirati u zavisnosti od uslova kultivacije, uključujući fizičke i hemijske faktore. Ovo otvara nove mogućnosti za modifikaciju potencijala KS-MMĆ kroz pre-kondicioniranje (Costa et al., 2021). Koncept pre-kondicioniranja ili pretretmana je veoma dobro poznat na polju imunologije. Da bi se poboljšale imunomodulatorne sposobnosti MMĆ jedna od najčešće korišćenih strategija je njihov pretretman sa pro-inflamatornim medijatorima, uključujući IFN- γ , TNF- α , IL-1 α i IL-1 β (Zhou et al., 2021). Definisane faktora koji mogu uticati na regenerativni potencijal KS-MMĆ i razumevanje mehanizama koji se nalaze u osnovi njihovog delovanja, može imati veliki značaj i dati važan doprinos uspostavljanju široko rasprostranjenih, uspešnih kliničkih terapija. Međutim, da bi se pristupi koji se zasnivaju na pretretmanu MMĆ mogli primeniti u ćelijskoj terapiji potrebno je prevazići postojeća ograničenja koja se zasnivaju na promenljivim efektima ovih tretmana usled heterogenosti ćelija i različitih uslova kultivacije, odnosno zbog nedostatka dobre proizvođačke prakse (eng. *Good Manufacturing Practice*, GMP) neophodne za potencijalnu kliničku primenu. Dugoročni efekti pre-kondicioniranja ćelija takođe moraju biti utvrđeni (Zhou et al., 2021).

Nedavno sprovedene naučne studije impliciraju značaj primene holekalciferola (VD3) u tkivnom inženjerstvu, pokazujući da primena VD3 u sklopu različitih hibridnih bionosača može poboljšati regenerativni potencijal MMĆ (Chen, Ji, et al., 2020; Mahdavi et al., 2020; Vu & Bose, 2020). Ipak, biološki potencijal koji bi tretman ili pretretman ovim vitaminom mogao imati u okviru regenerativne medicine nije dovoljno istražen. Pretretman, odnosno procedura pre-kondicioniranja, predstavlja jednu od ključnih strategija za poboljšanje funkcija MMĆ. Efikasne metode pre-kondicioniranja/pretretmana MMĆ kojima bi se poboljšale njihove regenerativne sposobnosti mogu imati veliki značaj i omogućiti uspešniju primenu ovih ćelija u potencijalnoj kliničkoj praksi. Potencijalna upotreba VD3 kao faktora pretretmana u protokolima transplantacije KS-MMĆ do sada nije istraživana. Stoga je jedan od postavljenih ciljeva našeg istraživanja bio da se procene efekti tretmana VD3 na funkcijske karakteristike KS-MMĆ, kao i da se ispita potencijalno učešće

SIRT1 signalnog puta u ovim efektima. U tu svrhu, nakon petodnevnog tretmana sa VD3 analizirani su kapacitet proliferacije KS-MMĆ, ekspresija markera povezanih sa pluripotencijom i starenjem, kao i potencijal diferencijacije KS-MMĆ.

Podaci koji se mogu naći u naučnoj literaturi, a koji se odnose na uticaj vitamina D3 na proliferaciju MMĆ, veoma su varijabilni. Rezultati se razlikuju u zavisnosti od izvora MMĆ, odnosno od životinjske vrste i tkiva iz kojih su ćelije izolovane, kao i od toga u kojoj je koncentraciji i formi vitamin D3 primenjivan. Naime, pokazano je da vitamin D3 može ispoljavati i stimulatorne i inhibitorne efekte na ćelijsku proliferaciju, pri čemu dovodi do promena različitih procesa, uključujući progresiju ćelijskog ciklusa, apoptozu i ćelijsko starenje. Razlike u navedenim efektima VD3 na ove procese zavisile su od vrste organizma iz kojih su MMĆ izolovane i tipa ćelja na kojima su sprovedena istraživanja (Gil et al., 2018; Umar et al., 2018). Konkretno, stimulatorni efekat VD3 metabolita, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, na rast MMĆ izolovanih iz KS pacova, bio je vidljiv nakon jednodnevne inkubacije pri koncentracijama od 100 nM i 1 μM , kao i nakon 3 dana u slučaju primene niže koncentracije (10 nM) (Jiang et al., 2017; Ye et al., 2020). Pored toga, takođe je primećena povećana proliferacija ljudskih i mišjih KS-MMĆ kao rezultat tretmana sa $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ uz istovremeno smanjenje nivoa ćelijskog starenja (Sun et al., 2020; Yang et al., 2020). Međutim, dok je veći broj studija ispitivao uticaj njegovih aktivnih metabolita, veoma mali broj autora je proučavao efekte vitamina D3 u njegovom nativnom obliku (VD3, holekalciferol). U nedavnoj studiji, Chen i saradnici su dizajnirali i proizveli hibridni bionosač koji se sastojao od kalcijum citrata i kalcijum sulfata u koji je integrisan VD3. Njihova ispitivanja su pokazala da se VD3 oslobađao polako i kontrolisano iz bionosača, na način koji nije zavisio od količine VD3. Pored toga, utvrdili su da VD3 primenjen u sklopu hibridnih bionosača ispoljava stimulatorni efekat na vijabilnost i brzinu proliferacije mišjih KS-MMĆ (Chen, Ji, et al., 2020). Dodatno, kada su ispitivani efekti tretmana različitim koncentracijama VD3 ili njegovih metabolita na funkcijske karakteristike osteoblasta izolovanih iz kalvarije (lat. *calvaria*) neonatalnih pacova, pokazano je da je samo tretman sa 200 nM VD3 značajno potpomogao proliferaciju osteoblasta, dok niže koncentracije VD3 i njegovih metabolita nisu ispoljile značajan uticaj (Wang et al., 2019). S druge strane, ispitivanja sprovedena na C3H10T1/2, multipotentnim mezenhimskim ćelijama miša, ukazala su na antiproliferativne efekte metabolita vitamina D3, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, prilikom tretmana sa koncentracijama u rasponu od 25 do 100 nM (Artaza et al., 2010). Slični rezultati dobijeni su u studijama koje su ispitivale uticaj $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na humane KS-MMĆ. Naime, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ispoljio je antiproliferativni efekat na KS-MMĆ nakon 3 dana tretmana sa višim koncentracijama, dok je za detekciju antiproliferativnog efekta u slučaju primene nižih koncentracijama bio potreban duži, petodnevn period inkubacije (Tang & Meng, 2009; Klotz et al., 2012). Primećene razlike u efektima koji je tretman sa vitaminom D3 imao na proliferaciju MMĆ mogu se pripisati različitim izvorima tkiva iz kojih su MMĆ izolovane, različitoj starosti davalaca, kao i različitim koncentracijama i/ili formama vitamina D3 koje su korišćene u eksperimentima.

Dokazano je da humane MMĆ mogu da eksprimiraju sve hidrosilaze koje su uključene u metabolizam VD3 (CYP2R1, CYP27A1, CYP27B1 i CYP24A1) i potrebne za njegovu konverziju u aktivni oblik, pri čemu je takođe utvrđeno da ovi enzimi nisu eksprimirani u podjednako meri kod svih MMĆ (Geng et al., 2013). Kod humanih KS-MMĆ sa visokom konstitutivnom ekspresijom CYP27B1 (1α -hidrosilaze), tretmani sa $25(\text{OH})\text{D}_3$, kao i sa $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, smanjili su njihovu proliferaciju na način koji je zavisio od primenjene doze. Sa druge strane, kod KS-MMĆ sa niskim nivoom ekspresije CYP27B1 enzima, tretmani sa metabolitima vitamina D3 nisu imali efekta (Geng et al., 2011). Rezultati

predstavljani u našoj studiji pokazuju da je tretman sa VD3 doveo do stimulacije proliferacije humanih MMĆ izolovanih iz KS mladih davalaca već nakon jednodnevnog tretmana u slučaju primene većih koncentracija (20 nM i 40 nM). Povećanje proliferacije KS-MMĆ bilo je primetno nakon primene svih koncentracija VD3 tokom dužeg, dvodnevnog i petodnevnog perioda inkubacije. Najuočljiviji efekat je primećen u slučaju primene VD3 koncentracije 20 nM nakon 5 dana tretmana, što je dokazano povećanjem metaboličke aktivnosti i nivoa ekspresije Ki67 proteina u tretiranim KS-MMĆ. S druge strane, tretman sa VD3 u našoj studiji nije značajno uticao na klonogeni kapacitet KS-MMĆ, što je u saglasnosti sa rezultatima istraživanja koje su sproveli Klotz i saradnici (Klotz et al., 2012). Još jedna specifičnost naše studije, pored primene vitamina D3 u formi holekalciferola, predstavlja činjenica da su davaoci KS-MMĆ bili mladi, dok je većina drugih studija sprovedena na humanim KS-MMĆ pacijenata podvrgnutih proceduri artroplastike kuka, sa različitim kliničkim karakteristikama koje bi mogle uticati na kapacitet proliferacije MMĆ i njihov odgovor na tretman sa vitaminom D3 (Zhou et al., 2012).

Tokom protekle decenije, mnoge studije su ukazale na važnu ulogu SIRT1 signalizacije u samoobnavljanju MMĆ, pokazujući zaštitne efekte protiv oštećenja DNK, reaktivnih vrsta kiseonika i različitih inflamatornih i apoptotičkih stimulusa (Zainabadi, 2018). Istraživanja ukazuju na povezanost SIRT1 signalizacije i proliferacije mišjih i humanih KS-MMĆ, a uloga SIRT1 signalnog puta u homeostazi kostiju je dobro poznata (Sun et al., 2018; Wang et al., 2019; Chen, Hu, et al., 2020; Y. Chen et al., 2021). Takođe je pokazano da vitamin D3 može povećati ekspresiju SIRT1 signalnog molekula putem transkripcije povezane sa VDR i na taj način ostvariti svoje efekte na MMĆ (Zhou et al., 2018; Chen, Hu, et al., 2020). Shodno navedenom, naši rezultati su takođe potvrdili sposobnost VD3 da stimuliše ekspresiju SIRT1 i FoxO3 signalnih molekula u KS-MMĆ. Iako se u većini tipova ćelija ekspresija SIRT1 lokalizuje u jedru, ovaj protein može biti detektovan i u citoplazmi ćelija, odnosno moguća je njegova translokacija (Tanno et al., 2007). Zaista, u našoj studiji detektovana je konstitutivna ekspresija SIRT1 u citoplazmi KS-MMĆ, ali i u njihovom jedru nakon tretmana sa VD3. Ipak, potrebno je sprovesti detaljnija ispitivanja kako bi se razjasnila uloga lokalizacije SIRT1 u regulaciji funkcijskih karakteristika KS-MMĆ. Međutim, u kontekstu ispitivanja efekata VD3 na proliferativni kapacitet KS-MMĆ, naša studija je pokazala da tretman sa SIRT1 inhibitorom, EX-527, nije blokirao stimulatívni efekat VD3 na proliferaciju ovih ćelija, sugerišući da pokazan stimulatorni uticaj VD3 nije posredovan SIRT1 signalizacijom.

U daljem toku istraživanja fokusiranom na razjašnjavanje molekularnih mehanizama putem kojih VD3 ostvaruje efekte na regenerativni potencijal KS-MMĆ, ispitivan je uticaj VD3 na ekspresiju transkripcionih faktora povezanih sa puripotencijom matičnih ćelija (NANOG, SOX2 i OCT-4). Dobijeni rezultati su ukazali na sposobnost VD3 da stimuliše ekspresiju sva tri ispitivana markera pluripotentnosti u KS-MMĆ na proteinskim i genskom nivou. Slično našim rezultatima, nekoliko studija je takođe pokazalo stimulatívni efekat $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ na ekspresiju NANOG u humanim KS-MMĆ (Klotz et al., 2012), kao i na ekspresiju OCT-4 gena u mišjim KS-MMĆ (L. Chen, A. Samanta, et al., 2021). S druge strane, u pojedinim studijama u kojima je ispitivan uticaj tretmana sa vitaminom D3 na ekspresiju markera pluripotentnosti u MMĆ izolovanim iz masnog tkiva, nisu ustanovljene značajne razlike u ekspresiji NANOG, SOX2 i OCT-4 na nivou iRNK (Doering et al., 2019). Uzeti zajedno, rezultati naših istraživanja i prethodno sprovedenih studija ukazuju na to da se uticaj vitamina D3 na ekspresiju faktora povezanih sa pluripotencijom u MMĆ može razlikovati u zavisnosti od tkiva iz kojih su ćelije izolovane. Pored toga, Liu i saradnici su ustanovili da postoji pozitivna korelacija između ćelijske proliferacije humanih KS-MMĆ i

nivoa ekspresije *NANOG* i *OCT-4*, kao i između nivoa ekspresije ovih faktora i efikasnosti formiranja CFU-F kolonija. Ovi eksperimenti vršeni su na humanim KS-MMĆ u kojima je pomoću transdukcije lentivirusnog vektora postignut visok nivo ekspresije (eng. *Overexpressed*) transkripcionih faktora *NANOG* i *OCT-4* (Liu et al., 2009). Takođe su Go i saradnici vršili eksperimente sa humanim KS-MMĆ, kultivisanim *in vitro*, koje su transdukcijom retrovirusnog vektora podstaknute da eksprimiraju *SOX2* i *NANOG*. Njihovi rezultati su pokazali da testirani faktori pluripotencije utiču na ekspanziju i potencijal diferencijacije humanih KS-MMĆ, kao i da *NANOG* ima veći uticaj na osteogeni diferencijacioni potencijal nego *SOX2* (Go et al., 2008). Prema Piccinato i saradnicima, niska ekspresija p16INK4A proteina i visoka ekspresija *OCT-4* gena mogu biti potencijalni prediktori produženog životnog veka i potencijala rasta KS-MMĆ kultivisanih *in vitro* (Piccinato et al., 2015). Da bi se definitivno razjasnilo da li detektovana povećana ekspresija transkripcionih faktora *NANOG*, *OCT-4* i *SOX2* nakon tretmana VD3 u KS-MMĆ uočena u našoj studiji može biti povezana sa pokazanom povećanom proliferacijom i metaboličkom aktivnošću tretiranih ćelija, neophodno je sprovesti dodatna ispitivanja.

Pojedine prethodno sprovedene studije ukazale su na moguće učešće SIRT1 signalizacije u regulaciji ekspresije markera povezanih sa pluripotencijom matičnih ćelija. Naime, objavljeno je da je tretman sa SIRT1 aktivatorom, resveratrolom, poboljšao stabilnost *SOX2* u humanim KS-MMĆ (Yoon et al., 2014). Sa druge strane, tretman sa selektivnim inhibitorom SIRT1, EX-527, smanjio je ekspresiju *NANOG*, *SOX2* i *OCT-4* na nivou gena u mišjim pluripotentnim ćelijama P19 (Kim et al., 2016). Za razliku od rezultata Kim i saradnika, naši rezultati ne ukazuju na smanjenu ekspresiju ispitivanih markera pluripotencije u humanim KS-MMĆ nakon tretmana sa EX-527. Međutim, u našoj studiji detektovano je da je EX-527 umanjio pozitivan efekat VD3 na ekspresiju *NANOG* i *SOX2* na nivou proteina i iRNK, što ukazuje na moguću ulogu SIRT1 signalizacije u stimulatornom efektu VD3 na ekspresiju ovih faktora. S druge strane, inhibitor EX-527 nije izmenio efekat tretmana sa VD3 na ekspresiju *OCT-4*. Naime, nakon tretmana sa EX-527, u kombinaciji bez ili sa VD3, ekspresija *OCT-4* u KS-MMĆ bila je povećana, posebno na nivou iRNK. Na osnovu ovog ishoda, možemo pretpostaviti da je za uticaj VD3 na ekspresiju *OCT-4* u KS-MMĆ odgovoran signalni put nezavisan od SIRT1 signalizacije, što ostaje da se ispita dodatnim eksperimentima. Slično našim rezultatima, Wang i saradnici su pokazali da je inhibicija SIRT1, koja je postignuta trihostatinom i vorinostatom, kod MMĆ izolovanih iz masnog tkiva koza dovela do hiperacetilacije histona H3 u lizinu 9 (H3K9), indukujući tako povećanje nivoa transkripcije *OCT-4* gena bez značajnog uticaja na ekspresiju proteina (X. Wang et al., 2016). U okviru iste studije takođe je ustanovljeno smanjenje ekspresije *SOX2* na nivou iRNK i proteina, ali i povećanje ekspresije *NANOG* nakon inhibicije SIRT1.

U sklopu našeg istraživanja je takođe analizirana ćelijska lokalizacija *NANOG*, *SOX2* i *OCT-4* proteina u KS-MMĆ. U skladu sa rezultatima prethodnih studija u kojima je ustanovljeno da je *OCT-4* protein pretežno eksprimiran u citoplazmi KS-MMĆ (Riekstina et al., 2009), naši rezultati pokazuju da je prisustvo *OCT-4* uočeno samo u citoplazmi KS-MMĆ nakon imunofluorescentnog bojenja, dok su *NANOG* i *SOX2* proteini detektovani takođe i u jedru ćelija. Tretman sa VD3 u kombinaciji bez ili sa EX-527 nije imao efekta na promenu lokalizacije navedenih transkripcionih faktora. Uticaj subćelijske distribucije ispitivanih faktora pluripotencije na karakteristike matičnih ćelija je u velikoj meri nerazjašnjen i zaslužuje detaljnija istraživanja (Jauković et al., 2021).

Vitamin D takođe igra značajnu ulogu u regulaciji procesa starenja. Smatra se da ovaj vitamin može doprineti prevenciji različitih bolesti povezanih sa starenjem, zbog uticaja na različite mehanizme koji, posledično, doprinose ovom procesu (Zhu et al., 2012; Berridge,

2017; Bima et al., 2021). Na ćelijskom nivou, otkriveno je da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ smanjuje proces ćelijskog starenja putem inhibicije oksidativnog stresa i oštećenja DNK, „utišavanjem“ (eng. *Silencing*) p16/Rb i p53/p21 signalizacije i snižavanjem nivoa ćelijskog starenja i sekretornog fenotipa povezanog sa ćelijskim starenjem (SASP, eng. *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (Chen et al., 2019). Kada su u pitanju KS-MMĆ, prethodna ispitivanja su pokazala da se prilikom tretmana sa 100 nM $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ značajno smanjuje replikativno starenje koje inače nastaje usled dugotrajne kultivacije i ekspanzije ćelija (Klotz et al., 2012). Nedavno objavljeni rezultati takođe su pokazali da ovaj metabolit inhibira starenje KS-MMĆ preko VDR-posredovane transkripcione regulacije Ezh2 i inhibicije p16/p19 signalizacije (Yang et al., 2020). Rezultati naše studije su u skladu sa ovim podacima, s obzirom na to da smo primetili značajno smanjenje broja „starijih“, β -galaktozidaza pozitivnih KS-MMĆ nakon petodnevnog tretmana sa VD3. Naši rezultati su takođe pokazali da inhibicija SIRT1 stimuliše ćelijsko starenje KS-MMĆ. Ovo zapažanje je u skladu sa podacima iz prethodnih istraživanja u kojima je dokazan doprinos SIRT1 u prevenciji procesa starenja MMĆ (Chen, Liu, Zhu, et al., 2014; Zhou et al., 2015; Ma et al., 2017; Sun et al., 2018). Međutim, naši rezultati nisu potvrdili literaturne podatke koji pokazuju da inhibicija starenja posredovana vitaminom D3 uključuje aktivaciju SIRT1 signalizacije, kao što je to pokazano u slučaju endotelnih ćelija (L. Chen, R. Holder, et al., 2021; Raj et al., 2021) i KS-MMĆ koje su izolovane iz mandibularne kosti (Chen, Hu, et al., 2020). U našoj studiji je utvrđeno da, čak i u prisustvu EX-527, VD3 dovodi do značajne inhibicije starenja KS-MMĆ, što je ukazalo na to da je VD3 ispoljio svoj efekat na inhibiciju procesa starenja u KS-MMĆ preko aktivacije drugih signalnih puteva što ostaje da bude potvrđeno dodatnim eksperimentima. Iako neke studije ukazuju na korelaciju između povećane ekspresije markera pluripotencije i odloženog starenja MMĆ (Piccinato et al., 2015; Yoon et al., 2018), potrebna su dalja istraživanja kako bi se potvrdila ova korelacija u našim eksperimentalnim uslovima.

S obzirom na dobro poznatu ulogu p53 u regulaciji ćelijske proliferacije i starenja, dalja ispitivanja su obuhvatila analizu uticaja VD3 na ekspresiju ovog proteina u KS-MMĆ, kao i učešće SIRT1 signalizacije u ovom procesu. Naime, studija sprovedena na $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -deficijentnim [$1\alpha(\text{OH})\text{ase}/-$] miševima, ukazala je da metabolit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ utiče na redukciju procesa starenja, između ostalog putem inaktivacije p53/p21 signalizacije (Chen et al., 2019). Takođe je pokazano da je ekspresija p53 proteina značajno snižena u MMĆ izolovanim iz KS miševa koji su tretirani sa $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, kao i da je procenat β -galaktozidaza pozitivnih ćelija značajno smanjen (Yang et al., 2020) što ukazuje na moguću povezanost ovih procesa. U prethodnim istraživanjima utvrđeno je da tretman humanih KS-MMĆ sa 100 nM $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ dovodi do povećanja ekspresije *TP53* gena koji kodira iRNK za p53 protein za 1,9 puta (Klotz et al., 2012), dok je primena $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ i CaCl_2 dovela do 1,29 puta snižene ekspresije *TP53* u slučaju MT-MMĆ (Pesarini et al., 2018). Uzevši u obzir da naši rezultati ne ukazuju na značajan uticaj holekalciferola na ekspresiju p53 proteina koji je primećen u slučaju upotrebe njegovih metabolita, potrebno je ispitati da li bi tretman sa nativnom formom vitamina D3 tokom različitih vremenskih termina imao drugačiji efekat. Vezano za ulogu SIRT1 signalizacije u VD3-posredovanoj ekspresiji p53 molekula, literaturni podaci upućuju na ulogu SIRT1 signalnog puta u regulaciji ekspresije ovog proteina. Naime, rezultati sprovedeni na MMĆ izolovanim iz mandibularne kosti miševa su pokazali da aktivator SIRT1, resveratrol, smanjuje ekspresiju p53, dok EX-527 utiče na povećanje ekspresije p53 proteina (Chen, Hu, et al., 2020). Sa druge strane, u našem istraživanju primećena je smanjena ekspresija p53 proteina u KS-MMĆ tretiranih sa EX-527, te je razloge za primećeni fenomen potrebno utvrditi u budućim eksperimentima.

Podaci iz literature o uticaju vitamina D3 na osteogenu diferencijaciju, ukazuju na njegov stimulatívni efekat na osteogenezu. Međutim, dok je većina studija sprovedena sa metabolitima vitamina D3, vrlo je malo podataka o uticaju nativnog oblika ovog vitamina, holekalciferola – VD3, na potencijal osteogene diferencijacije MMĆ. Naime, studija Wang i saradnika je pokazala da VD3 nije modifikovao ekspresiju osteogenih markera u osteoblastima izolovanim iz kalvarije pacova. Međutim, kada su u okviru iste studije ove ćelije tretirane sa metabolitima vitamina D3, 25(OH)D3 i 1 α ,25(OH) $_2$ D3, primećena je povećana ekspresija ranih osteogenih markera ALP i RUNX2, dok je samo tretman sa 25(OH)D3 povećao nivo mineralizacije paralelno sa OCN ekspresijom (D. Wang et al., 2018). Pored toga, kada su humani osteoblasti pretretirani 2 dana sa 50 nM 1 α ,25(OH) $_2$ D3, otkriveno je da je ekspresija OCN gena povećana 14 puta (Viereck et al., 2002). Na osnovu saznanja da humane MMĆ ekspimiraju sve enzimske komponente koje im omogućavaju ne samo da reaguju na 1 α ,25(OH) $_2$ D3, već i da ga proizvode, pretpostavljena je potencijalna autokrína/parakrína uloga metabolizma vitamina D3 u osteogenezi (Geng et al., 2013). Naime, Geng i saradnici su dokazali da humane KS-MMĆ ekspimiraju sve enzimske komponente neophodne za metabolisanje VD3 i da osteogeneza MMĆ *in vitro* može biti stimulísana sa 25(OH)D3 na način zavisán od 1 α -hidroksilaze (Geng et al., 2011; Geng et al., 2013). Takođe je utvrđeno da 1 α ,25(OH) $_2$ D3 metabolit ima stimulatorni efekat na osteogenu diferencijaciju KS-MMĆ gajenih u 3D sferoidima, pri čemu su Lee i saradnici pokazali da čak i tretman sa niskim koncentracijama (0.1 nM) ovog metabolita značajno stimuliše aktivnost ALP enzima (Lee et al., 2021). Pored navedenih rezultata dobijenih primenom metabolita VD3, nekoliko studija u kojima su korišćeni različiti hibridni bionosači sa integrisanim VD3 pokazale su osteo-induktívne efekte natívne forme VD3 na MMĆ. Konkretno, otkriveno je da primena VD3 u kombinaciji sa nano-HAP u sklopu bionosača sačinjenih od polikaprolakton/želatina stimuliše osteogenezu MMĆ izolovanih iz masnog tkiva. Autori ove studije su do navedenog zaključka došli na osnovu detektovanog povećanja aktivnosti ALP enzima, nivoa mineralizacije, kao i stimulísane ekspresije gena za osteogene markere (*COLL I*, *ALP*, *RUNX2*, *BGLAP*) (Sattary et al., 2019). Slično navedenom, u slučaju kada je primenjen VD3 u sklopu celulozom obogaćenih HAP/silicijumskih bionosača, indukovaná je osteogeneza MG63 ćelijske linije nalik osteoblastima, dokumentovana pokazanom povećanom ekspresijom gena za *ALP*, *RUNX2* i *OCN* (Sumathra et al., 2018). Takođe je ustanovljeno da VD3/vitamin K2/Mg u sklopu bionosača sačinjenih od polimernih nanovlakana potpomaže osteogenu diferencijaciju KS-MMĆ, povećavajući ekspresiju RUNX2, BMP2 i osteopontina (Guler et al., 2021). Pored toga, kada su MMĆ koje su izolovane iz zubne pulpe ljudi, uzgajane na kitozanskim bionosačima konstruisanim tako da kontinuirano isporučuju VD3 tokom 3-5 dana, pokazano je da je ekspresija *ALP*, *RUNX2* i *OCN* bila povišena, čak i kada su ćelije kultivísane u standardnom medijumu (Gupta et al., 2021). Uporedivo sa rezultatima navedenih studija, naši rezultati su pokazali stimulatívne efekte kako tretmana, tako i pretretmana sa VD3 na diferencijaciju KS-MMĆ u pravcu osteogene loze. Povećán nivo osteogeneze dokazan je povećanom aktivnošću enzima ALP i većim stepenom mineralizacije, zajedno sa stimulísanom ekspresijom gena povezanih sa osteogenezom (*ALP*, *RUNX2* i *OCN*). Podaci koje smo dobili u našem istraživanju sugerišu da vitamin D3 u obliku holekalciferola može da pospeši osteogeni potencijal KS-MMĆ mladih davalaca slično kao njegovi metaboliti ispitívani u studijama drugih grupa. Naši rezultati su takođe pokazali da je inhibicija SIRT1 od strane EX-527 umanjila pozitíván efekat VD3 na osteogenu diferencijaciju, što sugeriše da VD3 ostvaruje uticaj na osteogenezu KS-MMĆ barem delimično putem SIRT1 signalizacije. Ovi podaci su u skladu sa dobro poznatom ulogom SIRT1 signalnog puta u regulaciji osteogene

diferencijacije (Chen et al., 2014; Y. Chen et al., 2021). Takođe se mogu dovesti u vezu i sa rezultatima da SIRT1 ima potencijal da poboljša pro-osteogeni efekat metabolita vitamina D3, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, putem deacetilacije VDR i epigenetske modulacije njegovih ciljnih gena (Baur, 2010).

Dobro je poznato da su osteogena i adipogena diferencijacija KS-MMĆ obično u ravnoteži, odnosno da stimulacija diferencijacije u pravcu osteogene ćelijske loze istovremeno inhibira diferencijaciju u adipogenom pravcu i obrnuto (C. Wang et al., 2016). Shodno tome, kako su dobijeni rezultati pokazali da VD3 promoviše osteogenu diferencijaciju KS-MMĆ, nije neočekivano da je istovremeno detekcijom lipidnih tela utvrđena smanjena adipogena diferencijacija ovih ćelija nakon tretmana sa VD3, iako značajan uticaj VD3 na ekspresiju gena za *Adiponektin* i *PPAR γ* nije primećen. U cilju preciznijeg definisanja uticaja VD3 na ekspresiju gena adipogene diferencijacije potrebno je sprovesti dodatna ispitivanja nakon različitih termina inkubacije sa VD3. Takođe, jedan od razloga za odsustvo efekta VD3 na ekspresiju ispitivanih gena u našim eksperimentalnim uslovima može biti i primena SM za kultivaciju ćelija. Naime, moguće je da je za ispoljavanje uticaja VD3 na gene uključene u proces adipogene diferencijacije neophodna inkubacija u adipogenom medijumu, što je takođe potrebno analizirati u budućim ispitivanjima. Zaista, poznato je da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibira adipogenezu mišjih preadipocita i KS-MMĆ (Kelly & Gimble, 1998; Kong & Li, 2006). Međutim, prema pojedinim autorima modulatorni efekat vitamina D3 na adipogenezu zavisi od primenjene doze. Prema Salehpour i saradnicima, tretman sa nižim koncentracijama $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,1 nM) imao je inhibitorni efekat na ekspresiju markera adipogeneze, dok su veće koncentracije (10 nM) stimulisale adipogenezu (Salehpour et al., 2021). Pokazano je i da SIRT1 inhibira razvoj adipocita iz preadipocita (Picard et al., 2004), kao i da inhibira ekspresiju PPAR- γ 2 u mezenhimskim C3H10T1/2 ćelijama i primarnim stromalnim ćelijama kosne srži pacova (Bäckesjö et al., 2009). Naši rezultati, s druge strane, pokazuju da SIRT1 nema značajnu ulogu u uticaju VD3 na adipogenezu, što sugeriše da i drugi mehanizmi mogu biti uključeni u regulaciju ovog procesa. Da bi se razjasnilo koji mehanizmi leže u osnovi VD3-posredovanih efekata na adipogenu diferencijaciju KS-MMĆ potrebno je sprovesti dodatna ispitivanja.

Sveobuhvatno, rezultati ove studije pružaju nove dokaze o sposobnosti vitamina D3 da u formi holekalciferola (VD3) poboljša regenerativni potencijal KS-MMĆ i ukazuju na moguće signalne mehanizme koji se nalaze u osnovi njegovog delovanja. Konkretno, naši rezultati pokazuju da tretman sa VD3 povećava vijabilnost/proliferaciju, ekspresiju markera pluripotentnosti (NANOG, SOX2 i OCT-4) i osteogenu diferencijaciju KS-MMĆ, istovremeno smanjujući njihovo starenje i potencijal za adipogenu diferencijaciju. Na molekularnom nivou, pokazano je da VD3 stimuliše ekspresiju SIRT1 u KS-MMĆ, dok je uloga SIRT1 signalizacije utvrđena u VD3-stimulisanoj osteogenezi i regulaciji ekspresije NANOG i SOX2 transkripcionih faktora. Nasuprot tome, može se zaključiti da se efekti VD3 na proliferaciju, ekspresiju OCT-4 transkripcionog faktora, ćelijsko starenje i adipogenu diferencijaciju KS-MMĆ odigravaju nezavisno od SIRT1 signalnog puta. Ovi podaci ukazuju da KS-MMĆ mladih davalaca reaguju na VD3 u formi holekalciferola, posredno potvrđujući da KS-MMĆ poseduju molekularne komponente za metabolisanje VD3. Rezultati ovih istraživanja otvaraju nove mogućnosti za potencijalnu upotrebu VD3 kao faktora prekondicioniranja/pretretmana KS-MMĆ u transplantacijskim protokolima, ističući koristan efekat njegove upotrebe kao suplementa u strategijama za regeneraciju kostiju. Međutim, kako bi se jasno definisali mehanizmi uključeni u metabolizam VD3 u KS-MMĆ neophodna je detaljna analiza ekspresije VDR, 25-hidroksilaze, 1α -hidroksilaze i 24-

hidroksilaze u ovim ćelijama. Navedena ispitivanja mogla bi doprineti razvoju klinički prihvatljivih protokola u potencijalnoj ćelijskoj terapiji i tkivnom inženjerstvu.

6. ZAKLJUČCI

Na osnovu prethodno postavljenih ciljeva i dobijenih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Mezenhimske matične ćelije (MMC) uspešno su izolovane iz kosne srži (KS) zdravih davalaca uzrasta 2-12 godina, pri čemu je uporednom analizom njihovih svojstava i funkcija ustanovljeno da:

- Izolovane KS-MMC svih davalaca imaju sposobnost adhezije za plastiku i morfologiju karakterističnu za MMC, nalik fibroblastima.
- Izolovane KS-MMC različitih davalaca imaju sličan imunofenotip koji odlikuje pozitivna ekspresija površinskih markera karakterističnih za mezenhimske matične ćelije uz odsustvo ekspresije markera hematopoetskih ćelija.
- Izolovane KS-MMC različitih davalaca imaju sličan potencijal multipotentne diferencijacije koji se ogleda u njihovoj sposobnosti osteogeneze, adipogeneze i hondrogenoze tokom kultivacije u odgovarajućim indukcionim medijumima.
- Izolovane KS-MMC različitih davalaca odlikuju se sličnim nivoom proteinske ekspresije i lokalizacije F-aktina.
- Izolovane KS-MMC različitih davalaca imaju sličan stepen vijabilnosti/metaboličke aktivnosti i ujednačen proliferativni kapacitet.
- Izolovane KS-MMC različitih davalaca konstitutivno eksprimiraju marker ćelijske proliferacije, protein Ki67, uz uočene razlike u intenzitetu i subćelijskoj lokalizaciji ovog proteina kod različitih davalaca.
- Izolovane KS-MMC različitih davalaca odlikuje sličan, nizak stepen ćelijskog starenja (senescencije) u kulturi tokom 5 pasaža.
- Izolovane KS-MMC različitih davalaca konstitutivno eksprimiraju sličan nivo ekspresije regulatora senescencije, p53 proteina, sa pokazanim razlikama u njegovoj subćelijskoj lokalizaciji kod različitih davalaca.
- Izolovane KS-MMC različitih davalaca imaju sličan klonogeni potencijal.
- Izolovane KS-MMC različitih davalaca konstitutivno eksprimiraju markere pluripotentnosti (NANOG, SOX2 i OCT-4) uz razlike u nivou ekspresije i lokalizaciji ovih faktora kod različitih davalaca.

2. Ispitivanjem uticaja vitamina D3 u formi holekalciferola (VD3) na svojstva i funkcije povezane sa regenerativnim kapacitetom KS-MMC zaključeno je da:

- Tretman sa VD3 stimuliše vijabilnost i proliferativni kapacitet, uključujući metaboličku aktivnost, ekspresiju markera proliferacije Ki67 i ćelijski ciklus KS-MMC.
- Tretman sa VD3 ne ispoljava efekat na klonogeni potencijal KS-MMC.
- Tretman sa VD3 stimuliše ekspresiju markera pluripotentnosti (NANOG, SOX2 i OCT-4) na proteinskom i genskom nivou u KS-MMC.
- Tretman sa VD3 redukuje proces ćelijskog starenja (senescencije) KS-MMC smanjujući procenat β -galaktozidaza pozitivnih ćelija.

- Tretman sa VD3 ne ispoljava efekat na ekspresiju p53 proteina u KS-MMĆ.
- Tretman sa VD3 tokom i pre indukcije diferencijacije stimuliše osteogenu diferencijaciju KS-MMĆ što je praćeno povećanjem ekspresije gena markera osteogene diferencijacije (*ALP, RUNX2, OCN*).
- Tretman sa VD3 tokom i pre indukcije diferencijacije inhibira adipogenu diferencijaciju KS-MMĆ pri čemu nisu uočene promene ekspresije gena markera adipogene diferencijacije (*Adiponektin* i *PPAR γ*) u ispitivanim uslovima.

3. Analizom signalnih puteva uključenih u modulaciju svojstva i funkcija KS-MMĆ pod uticajem VD3 zaključeno je sledeće:

- VD3 aktivira SIRT1-FoxO3 signalni put u KS-MMĆ.
- VD3 stimuliše vijabilnost/metaboličku aktivnost i proliferaciju KS-MMĆ nezavisno od SIRT1 signalizacije.
- Stimulatorni efekat VD3 na ekspresiju NANOG i SOX2 transkripcionih faktora na proteinskom i genskom nivou ostvaruje se preko aktivacije SIRT1 signalnog puta.
- Stimulatorni efekat VD3 na ekspresiju OCT-4 transkripcionog faktora na proteinskom i genskom nivou se ostvaruje nezavisno od SIRT1 signalizacije.
- VD3 redukuje proces ćelijskog starenja KS-MMĆ nezavisno od SIRT1 signalizacije.
- VD3 stimuliše osteogenu diferencijaciju i ekspresiju gena markera osteogene diferencijacije (*ALP, RUNX2, OCN*) u KS-MMĆ putem aktivacije SIRT1 signalnog puta.
- VD3 inhibira adipogenu diferencijaciju KS-MMĆ nezavisno od SIRT1 signalizacije.

7. LITERATURA

- Abdallah, B. M., Al-Shammary, A., Khattab, H. M., AlDahmash, A., & Kassem, M. (2016). Bone marrow stromal stem cells for bone repair: basic and translational aspects. In *Recent Advances in Stem Cells* (pp. 213-232). Springer.
- Abe, E., Miyaura, C., Sakagami, H., Takeda, M., Konno, K., Yamazaki, T., Yoshiki, S., & Suda, T. (1981). Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(8), 4990-4994. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.8.4990>
- Adorini, L., & Penna, G. (2008). Control of autoimmune diseases by the vitamin D endocrine system. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 4(8), 404-412. <https://doi.org/10.1038/ncprheum0855>
- Afify, S. M., & Seno, M. (2019). Conversion of Stem Cells to Cancer Stem Cells: Undercurrent of Cancer Initiation. *Cancers (Basel)*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/cancers11030345>
- Aguilar, S., Nye, E., Chan, J., Loebinger, M., Spencer-Dene, B., Fisk, N., Stamp, G., Bonnet, D., & Janes, S. M. (2007). Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung. *Stem Cells*, 25(6), 1586-1594. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0762>
- Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., Luz-Crawford, P., Aguila-Díaz, C., Fernandez, A., Figueroa, F. E., & Khoury, M. (2015). Characterization of menstrual stem cells: angiogenic effect, migration and hematopoietic stem cell support in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 6(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0013-5>
- Almalki, S. G., & Agrawal, D. K. (2016). Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*, 92(1-2), 41-51. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.02.005>
- Alves, H., Munoz-Najar, U., De Wit, J., Renard, A. J., Hoeijmakers, J. H., Sedivy, J. M., Blitterswijk, C. V., & De Boer, J. (2010). A link between the accumulation of DNA damage and loss of multi-potency of human mesenchymal stromal cells. *J Cell Mol Med*, 14(12), 2729-2738. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00931.x>
- Amable, P. R., Teixeira, M. V., Carias, R. B., Granjeiro, J. M., & Borojevic, R. (2014). Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly. *Stem Cell Res Ther*, 5(2), 53. <https://doi.org/10.1186/scrt442>
- Andrzejewska, A., Catar, R., Schoon, J., Qazi, T. H., Sass, F. A., Jacobi, D., Blankenstein, A., Reinke, S., Krüger, D., Streitz, M., Schlickeiser, S., Richter, S., Souidi, N., Beez, C., Kamhieh-Milz, J., Krüger, U., Zemojtel, T., Jürchott, K., Strunk, D., Reinke, P., & Geissler, S. (2019). Multi-Parameter Analysis of Biobanked Human Bone Marrow Stromal Cells Shows Little Influence for Donor Age and Mild Comorbidities on Phenotypic and Functional Properties. *Front Immunol*, 10, 2474. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02474>
- Andrzejewska, A., Lukomska, B., & Janowski, M. (2019). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells*, 37(7), 855-864. <https://doi.org/10.1002/stem.3016>
- Aoyama, T., Goto, K., Kakinoki, R., Ikeguchi, R., Ueda, M., Kasai, Y., Maekawa, T., Tada, H., Teramukai, S., Nakamura, T., & Toguchida, J. (2014). An exploratory clinical trial for idiopathic osteonecrosis of femoral head by cultured autologous multipotent

- mesenchymal stromal cells augmented with vascularized bone grafts. *Tissue Eng Part B Rev*, 20(4), 233-242. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2014.0090>
- Aqmasheh, S., Shamsasanjan, K., Akbarzadehlaleh, P., Pashoutan Sarvar, D., & Timari, H. (2017). Effects of Mesenchymal Stem Cell Derivatives on Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cells. *Adv Pharm Bull*, 7(2), 165-177. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.021>
- Araújo, A. B., Salton, G. D., Furlan, J. M., Schneider, N., Angeli, M. H., Laureano Á, M., Silla, L., Rassos, E. P., & Paz, A. H. (2017). Comparison of human mesenchymal stromal cells from four neonatal tissues: Amniotic membrane, chorionic membrane, placental decidua and umbilical cord. *Cytotherapy*, 19(5), 577-585. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.03.001>
- Artaza, J. N., Sirad, F., Ferrini, M. G., & Norris, K. C. (2010). 1,25(OH)₂vitamin D₃ inhibits cell proliferation by promoting cell cycle arrest without inducing apoptosis and modifies cell morphology of mesenchymal multipotent cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 119(1-2), 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.01.001>
- Askew, F., Bourdillon, R., Bruce, H. M., Jenkins, R., & Webster, T. A. (1930). The distillation of vitamin D. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 107(748), 76-90.
- Bäckesjö, C. M., Li, Y., Lindgren, U., & Haldosén, L. A. (2009). Activation of Sirt1 decreases adipocyte formation during osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs*, 189(1-4), 93-97. <https://doi.org/10.1159/000151744>
- Baghaei, K., Hashemi, S. M., Tokhanbigli, S., Asadi Rad, A., Assadzadeh-Aghdaei, H., Sharifian, A., & Zali, M. R. (2017). Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 10(3), 208-213.
- Baker, N., Boyette, L. B., & Tuan, R. S. (2015). Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone*, 70, 37-47.
- Banfi, A., Muraglia, A., Dozin, B., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., & Quarto, R. (2000). Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol*, 28(6), 707-715.
- Barnes, R. P., Fouquerel, E., & Opresko, P. L. (2019). The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mech Ageing Dev*, 177, 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.03.013>
- Barragan, M., Good, M., & Kolls, J. K. (2015). Regulation of Dendritic Cell Function by Vitamin D. *Nutrients*, 7(9), 8127-8151. <https://doi.org/10.3390/nu7095383>
- Baur, J. A. (2010). Biochemical effects of SIRT1 activators. *Biochim Biophys Acta*, 1804(8), 1626-1634. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.025>
- Baxter, M. A., Wynn, R. F., Jowitt, S. N., Wraith, J. E., Fairbairn, L. J., & Bellantuono, I. (2004). Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*, 22(5), 675-682. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-5-675>
- Becker, A. J., McCulloch, E. A., & Till, J. E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.
- Behnia, H., Khojasteh, A., Soleimani, M., Tehranchi, A., & Atashi, A. (2012). Repair of alveolar cleft defect with mesenchymal stem cells and platelet derived growth factors: a preliminary report. *J Craniomaxillofac Surg*, 40(1), 2-7. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2011.02.003>

- Benayahu, D., Shefer, G., & Shur, I. (2009). Insights into the transcriptional and chromatin regulation of mesenchymal stem cells in musculo-skeletal tissues. *Ann Anat*, 191(1), 2-12. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2008.07.008>
- Bernardo, M. E., Zaffaroni, N., Novara, F., Cometa, A. M., Avanzini, M. A., Moretta, A., Montagna, D., Maccario, R., Villa, R., Daidone, M. G., Zuffardi, O., & Locatelli, F. (2007). Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res*, 67(19), 9142-9149. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-4690>
- Berninger, M. T., Wexel, G., Rummeny, E. J., Imhoff, A. B., Anton, M., Henning, T. D., & Vogt, S. (2013). Treatment of osteochondral defects in the rabbit's knee joint by implantation of allogeneic mesenchymal stem cells in fibrin clots. *J Vis Exp*(75), e4423. <https://doi.org/10.3791/4423>
- Bernitz, J. M., Kim, H. S., MacArthur, B., Sieburg, H., & Moore, K. (2016). Hematopoietic Stem Cells Count and Remember Self-Renewal Divisions. *Cell*, 167(5), 1296-1309 e1210. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.022>
- Berridge, M. J. (2017). Vitamin D deficiency accelerates ageing and age-related diseases: a novel hypothesis. *J Physiol*, 595(22), 6825-6836. <https://doi.org/10.1113/jp274887>
- Bhat, S., Viswanathan, P., Chandanala, S., Prasanna, S. J., & Seetharam, R. N. (2021). Expansion and characterization of bone marrow derived human mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Sci Rep*, 11(1), 3403. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83088-1>
- Bikle, D. (2009). Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab*, 94(1), 26-34. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1454>
- Bima, A. I., Mahdi, A. S., Al Fayez, F. F., Khawaja, T. M., Abo El-Khair, S. M., & Elsamanoudy, A. Z. (2021). Cellular Senescence and Vitamin D Deficiency Play a Role in the Pathogenesis of Obesity-Associated Subclinical Atherosclerosis: Study of the Potential Protective Role of Vitamin D Supplementation. *Cells*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/cells10040920>
- Boiani, M., & Schöler, H. R. (2005). Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(11), 872-884. <https://doi.org/10.1038/nrm1744>
- Bonab, M. M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S. H., Ghavamzadeh, A., & Nikbin, B. (2006). Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol*, 7, 14. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-7-14>
- Booth, D. G., Takagi, M., Sanchez-Pulido, L., Petfalski, E., Vargiu, G., Samejima, K., Imamoto, N., Ponting, C. P., Tollervey, D., Earnshaw, W. C., & Vagnarelli, P. (2014). Ki-67 is a PP1-interacting protein that organises the mitotic chromosome periphery. *Elife*, 3, e01641.
- Boregowda, S. V., Krishnappa, V., Strivelli, J., Haga, C. L., Booker, C. N., & Phinney, D. G. (2018). Basal p53 expression is indispensable for mesenchymal stem cell integrity. *Cell Death Differ*, 25(4), 679-692. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0004-4>
- Borodkina, A., Shatrova, A., Abushik, P., Nikolsky, N., & Burova, E. (2014). Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging (Albany NY)*, 6(6), 481-495. <https://doi.org/10.18632/aging.100673>
- Boulais, P. E., & Frenette, P. S. (2015). Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*, 125(17), 2621-2629. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-570192>
- Boveri, T. (1892). *Befruchtung*. JF Bergmann.

- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. I., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6), 947-956. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>
- Boyette, L., & Tuan, R. (2014). Adult stem cells and diseases of aging. *Journal of clinical medicine*, 3(1), 88-134.
- Brown, K., Xie, S., Qiu, X., Mohrin, M., Shin, J., Liu, Y., Zhang, D., Scadden, D. T., & Chen, D. (2013). SIRT3 reverses aging-associated degeneration. *Cell Rep*, 3(2), 319-327. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.01.005>
- Bryder, D., Rossi, D. J., & Weissman, I. L. (2006). Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol*, 169(2), 338-346. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060312>
- Burova, E., Borodkina, A., Shatrova, A., & Nikolsky, N. (2013). Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 474931. <https://doi.org/10.1155/2013/474931>
- Caballero-Velázquez, T., Montero, I., Sánchez-Guijo, F., Parody, R., Saldaña, R., Valcarcel, D., López-Godino, O., Coll, C. F., Cuesta, M., Carrillo-Vico, A., Sánchez-Abarca, L. I., López-Corral, L., Márquez-Malaver, F. J., & Pérez-Simón, J. A. (2016). Immunomodulatory Effect of Vitamin D after Allogeneic Stem Cell Transplantation: Results of a Prospective Multicenter Clinical Trial. *Clin Cancer Res*, 22(23), 5673-5681. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-16-0238>
- Calloni, R., Cordero, E. A., Henriques, J. A., & Bonatto, D. (2013). Reviewing and updating the major molecular markers for stem cells. *Stem Cells Dev*, 22(9), 1455-1476. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0637>
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, 9(5), 641-650.
- Caplan, A. I. (2017). Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med*, 6(6), 1445-1451. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
- Castro-Malaspina, H., Gay, R. E., Resnick, G., Kapoor, N., Meyers, P., Chiarieri, D., McKenzie, S., Broxmeyer, H. E., & Moore, M. A. (1980). Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*, 56(2), 289-301.
- Chen, H., Hu, X., Yang, R., Wu, G., Tan, Q., Goltzman, D., & Miao, D. (2020). SIRT1/FOXO3a axis plays an important role in the prevention of mandibular bone loss induced by 1,25(OH)(2)D deficiency. *Int J Biol Sci*, 16(14), 2712-2726. <https://doi.org/10.7150/ijbs.48169>
- Chen, H., Ji, M., Ding, Z., & Yan, Y. (2020). Vitamin D3-loaded calcium citrate/calcium sulfate composite cement with enhanced physicochemical properties, drug release, and cytocompatibility. *J Biomater Appl*, 34(10), 1343-1354. <https://doi.org/10.1177/0885328220904498>
- Chen, H., Liu, X., Chen, H., Cao, J., Zhang, L., Hu, X., & Wang, J. (2014). Role of SIRT1 and AMPK in mesenchymal stem cells differentiation. *Ageing Res Rev*, 13, 55-64. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2013.12.002>
- Chen, H., Liu, X., Zhu, W., Chen, H., Hu, X., Jiang, Z., Xu, Y., Wang, L., Zhou, Y., Chen, P., Zhang, N., Hu, D., Zhang, L., Wang, Y., Xu, Q., Wu, R., Yu, H., & Wang, J. (2014). SIRT1 ameliorates age-related senescence of mesenchymal stem cells via modulating telomere shelterin. *Front Aging Neurosci*, 6, 103. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00103>

- Chen, K. Y., Dong, G. C., Hsu, C. Y., Chen, Y. S., & Yao, C. H. (2013). Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous gelatin scaffolds containing *Drynaria fortunei* extract for bone repair. *J Biomed Mater Res A*, *101*(4), 954-962. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34397>
- Chen, L., Holder, R., Porter, C., & Shah, Z. (2021). Vitamin D3 attenuates doxorubicin-induced senescence of human aortic endothelial cells by upregulation of IL-10 via the pAMPK α /Sirt1/Foxo3a signaling pathway. *PLoS One*, *16*(6), e0252816. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252816>
- Chen, L., Samanta, A., Zhao, L., Dudley, N. R., Buehler, T., Vincent, R. J., Hauptman, J., Girgis, M., & Dawn, B. (2021). Vitamin D3 induces mesenchymal-to-endothelial transition and promotes a proangiogenic niche through IGF-1 signaling. *iScience*, *24*(4), 102272. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102272>
- Chen, L., Yang, R., Qiao, W., Zhang, W., Chen, J., Mao, L., Goltzman, D., & Miao, D. (2019). 1,25-Dihydroxyvitamin D exerts an antiaging role by activation of Nrf2-antioxidant signaling and inactivation of p16/p53-senescence signaling. *Aging Cell*, *18*(3), e12951. <https://doi.org/10.1111/accel.12951>
- Chen, S. L., Fang, W. W., Ye, F., Liu, Y. H., Qian, J., Shan, S. J., Zhang, J. J., Chunhua, R. Z., Liao, L. M., Lin, S., & Sun, J. P. (2004). Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, *94*(1), 92-95. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2004.03.034>
- Chen, X., Wang, L., Hou, J., Li, J., Chen, L., Xia, J., Wang, Z., Xiao, M., & Wang, Y. (2019). Study on the Dynamic Biological Characteristics of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Senescence. *Stem Cells Int*, *2019*, 9271595. <https://doi.org/10.1155/2019/9271595>
- Chen, Y., Zhou, F., Liu, H., Li, J., Che, H., Shen, J., & Luo, E. (2021). SIRT1, a promising regulator of bone homeostasis. *Life Sci*, *269*, 119041. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119041>
- Chierico, L., Rizzello, L., Guan, L., Joseph, A. S., Lewis, A., & Battaglia, G. (2017). The role of the two splice variants and extranuclear pathway on Ki-67 regulation in non-cancer and cancer cells. *PLoS One*, *12*(2), e0171815. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171815>
- Choi, Y. S., Park, Y. B., Ha, C. W., Kim, J. A., Heo, J. C., Han, W. J., Oh, S. Y., & Choi, S. J. (2017). Different characteristics of mesenchymal stem cells isolated from different layers of full term placenta. *PLoS One*, *12*(2), e0172642. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172642>
- Choumerianou, D. M., Martimianaki, G., Stiakaki, E., Kalmanti, L., Kalmanti, M., & Dimitriou, H. (2010). Comparative study of stemness characteristics of mesenchymal cells from bone marrow of children and adults. *Cytotherapy*, *12*(7), 881-887. <https://doi.org/10.3109/14653249.2010.501790>
- Christakos, S., Dhawan, P., Liu, Y., Peng, X., & Porta, A. (2003). New insights into the mechanisms of vitamin D action. *J Cell Biochem*, *88*(4), 695-705. <https://doi.org/10.1002/jcb.10423>
- Christakos, S., Dhawan, P., Verstuyf, A., Verlinden, L., & Carmeliet, G. (2016). Vitamin D: Metabolism, Molecular Mechanism of Action, and Pleiotropic Effects. *Physiol Rev*, *96*(1), 365-408. <https://doi.org/10.1152/physrev.00014.2015>
- Chu, D. T., Phuong, T. N. T., Tien, N. L. B., Tran, D. K., Thanh, V. V., Quang, T. L., Truong, D. T., Pham, V. H., Ngoc, V. T. N., Chu-Dinh, T., & Kushekhar, K. (2020). An Update

- on the Progress of Isolation, Culture, Storage, and Clinical Application of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Int J Mol Sci*, 21(3). <https://doi.org/10.3390/ijms21030708>
- Cohen-Kfir, E., Artsi, H., Levin, A., Abramowitz, E., Bajayo, A., Gurt, I., Zhong, L., D'Urso, A., Toiber, D., Mostoslavsky, R., & Dresner-Pollak, R. (2011). Sirt1 is a regulator of bone mass and a repressor of Sost encoding for sclerostin, a bone formation inhibitor. *Endocrinology*, 152(12), 4514-4524. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1128>
- Colter, D. C., Class, R., DiGirolamo, C. M., & Prockop, D. J. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7), 3213-3218. <https://doi.org/10.1073/pnas.070034097>
- Correia-Melo, C., Jurk, D., & Passos, J. F. (2013). Robust multiparametric assessment of cellular senescence. *Methods Mol Biol*, 965, 409-419. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_27
- Costa, L. A., Eiro, N., Fraile, M., Gonzalez, L. O., Saá, J., Garcia-Portabella, P., Vega, B., Schneider, J., & Vizoso, F. J. (2021). Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. *Cell Mol Life Sci*, 78(2), 447-467. <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03600-0>
- Crippa, S., & Bernardo, M. E. (2018). Mesenchymal Stromal Cells: Role in the BM Niche and in the Support of Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Hemasphere*, 2(6), e151. <https://doi.org/10.1097/hs9.0000000000000151>
- Cristofalo, V. J., Allen, R. G., Pignolo, R. J., Martin, B. G., & Beck, J. C. (1998). Relationship between donor age and the replicative lifespan of human cells in culture: a reevaluation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(18), 10614-10619.
- Cuylen, S., Blaukopf, C., Politi, A. Z., Müller-Reichert, T., Neumann, B., Poser, I., Ellenberg, J., Hyman, A. A., & Gerlich, D. W. (2016). Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature*, 535(7611), 308-312. <https://doi.org/10.1038/nature18610>
- D'Ippolito, G., Schiller, P. C., Ricordi, C., Roos, B. A., & Howard, G. A. (1999). Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res*, 14(7), 1115-1122. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.7.1115>
- Dantschakoff, W. (1908). *Anat. Hefte*, 37, 472-589.
- De Miguel, M. P., Arnalich Montiel, F., Lopez Iglesias, P., Blazquez Martinez, A., & Nistal, M. (2009). Epiblast-derived stem cells in embryonic and adult tissues. *Int J Dev Biol*, 53(8-10), 1529-1540. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072413md>
- Deeb, K. K., Trump, D. L., & Johnson, C. S. (2007). Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer*, 7(9), 684-700. <https://doi.org/10.1038/nrc2196>
- Dexheimer, V., Mueller, S., Braatz, F., & Richter, W. (2011). Reduced reactivation from dormancy but maintained lineage choice of human mesenchymal stem cells with donor age. *PLoS One*, 6(8), e22980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022980>
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Eubelj, I., Pereira-Smith, O., et al. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(20), 9363-9367.
- Dmitrieva, R. I., Minullina, I. R., Bilibina, A. A., Tarasova, O. V., Anisimov, S. V., & Zaritskey, A. Y. (2012). Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived

- mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell Cycle*, 11(2), 377-383. <https://doi.org/10.4161/cc.11.2.18858>
- Doering, L., Khatri, R., Petry, S. F., Sauer, H., Howaldt, H. P., & Linn, T. (2019). Regulation of somatostatin expression by vitamin D3 and valproic acid in human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 10(1), 240. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1330-x>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Du, W.-J., Reppel, L., Leger, L., Schenowitz, C., Huselstein, C., Bensoussan, D., Carosella, E. D., Han, Z. C., & Rouas-Freiss, N. (2016). Mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and adipose tissue maintain their immunosuppressive properties after chondrogenic differentiation: role of HLA-G. *Stem Cells and Development*, 25(19), 1454-1469.
- Duijvestein, M., Vos, A. C., Roelofs, H., Wildenberg, M. E., Wendrich, B. B., Verspaget, H. W., Kooy-Winkelaar, E. M. C., Koning, F., Zwaginga, J. J., Fidder, H. H., Verhaar, A. P., Fibbe, W. E., van den Brink, G. R., & Hommes, D. W. (2010). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut*, 59(12), 1662-1669. <https://doi.org/10.1136/gut.2010.215152>
- Eaves, C. J. (2015). Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood*, 125(17), 2605-2613. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-12-570200>
- El-Khoury, J. M., Reineks, E. Z., & Wang, S. (2011). Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in measurement of vitamin D metabolites and analogues. *Clin Biochem*, 44(1), 66-76. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.05.007>
- Eridani, S. (2014). Types of human stem cells and their therapeutic applications. *Stem Cell Discovery*, 2014.
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154-156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Fajardo-Orduña, G. R., Mayani, H., & Montesinos, J. J. (2015). Hematopoietic Support Capacity of Mesenchymal Stem Cells: Biology and Clinical Potential. *Arch Med Res*, 46(8), 589-596. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2015.10.001>
- Fehrer, C., Brunauer, R., Laschober, G., Unterluggauer, H., Reitinger, S., Kloss, F., Gully, C., Gassner, R., & Lepperdinger, G. (2007). Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell*, 6(6), 745-757. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00336.x>
- Ferretti, C., Lucarini, G., Andreoni, C., Salvolini, E., Bianchi, N., Vozzi, G., Gigante, A., & Mattioli-Belmonte, M. (2015). Human Periosteal Derived Stem Cell Potential: The Impact of age. *Stem Cell Rev Rep*, 11(3), 487-500. <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9559-3>
- Ford, C., Hamerton, J., Barnes, D., & Loutit, J. (1956). Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*, 177(4506), 452-454.
- Foudah, D., Redaelli, S., Donzelli, E., Bentivegna, A., Miloso, M., Dalpra, L., & Tredici, G. (2009). Monitoring the genomic stability of in vitro cultured rat bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chromosome Res*, 17(8), 1025-1039. <https://doi.org/10.1007/s10577-009-9090-6>

- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3(4), 393-403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., & Gerasimov, U. V. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*, 20(3), 263-272. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1987.tb01309.x>
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2), 230-247.
- García-Gómez, I., Elvira, G., Zapata, A. G., Lamana, M. L., Ramírez, M., Castro, J. G., Arranz, M. G., Vicente, A., Bueren, J., & García-Olmo, D. (2010). Mesenchymal stem cells: biological properties and clinical applications. *Expert Opin Biol Ther*, 10(10), 1453-1468. <https://doi.org/10.1517/14712598.2010.519333>
- Gartner, S., & Kaplan, H. S. (1980). Long-term culture of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(8), 4756-4759. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.8.4756>
- Geißler, S., Textor, M., Kühnisch, J., Könnig, D., Klein, O., Ode, A., Pfitzner, T., Adjaye, J., Kasper, G., & Duda, G. N. (2012). Functional comparison of chronological and in vitro aging: differential role of the cytoskeleton and mitochondria in mesenchymal stromal cells. *PloS one*, 7(12), e52700.
- Geng, S., Zhou, S., Bi, Z., & Glowacki, J. (2013). Vitamin D metabolism in human bone marrow stromal (mesenchymal stem) cells. *Metabolism*, 62(6), 768-777. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.01.003>
- Geng, S., Zhou, S., & Glowacki, J. (2011). Effects of 25-hydroxyvitamin D(3) on proliferation and osteoblast differentiation of human marrow stromal cells require CYP27B1/1 α -hydroxylase. *J Bone Miner Res*, 26(5), 1145-1153. <https://doi.org/10.1002/jbmr.298>
- Ghaneialvar, H., Soltani, L., Rahmani, H. R., Lotfi, A. S., & Soleimani, M. (2018). Characterization and Classification of Mesenchymal Stem Cells in Several Species Using Surface Markers for Cell Therapy Purposes. *Indian J Clin Biochem*, 33(1), 46-52. <https://doi.org/10.1007/s12291-017-0641-x>
- Gil, Á., Plaza-Diaz, J., & Mesa, M. D. (2018). Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Ann Nutr Metab*, 72(2), 87-95. <https://doi.org/10.1159/000486536>
- Go, M. J., Takenaka, C., & Ohgushi, H. (2008). Forced expression of Sox2 or Nanog in human bone marrow derived mesenchymal stem cells maintains their expansion and differentiation capabilities. *Exp Cell Res*, 314(5), 1147-1154. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.11.021>
- Gojo, S., & Kyo, S. (2002). [Regenerative potential of mesodermal stem cells for the heart]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*, 103(9), 616-622.
- Goodarzi, P., Aghayan, H. R., Larijani, B., Soleimani, M., Dehpour, A. R., Sahebjam, M., Ghaderi, F., & Arjmand, B. (2015). Stem cell-based approach for the treatment of Parkinson's disease. *Med J Islam Repub Iran*, 29, 168.
- Goumans, M. J., & Mummery, C. (2000). Functional analysis of the TGFbeta receptor/Smad pathway through gene ablation in mice. *Int J Dev Biol*, 44(3), 253-265.
- Gu, Z., Jiang, J., Tan, W., Xia, Y., Cao, H., Meng, Y., Da, Z., Liu, H., & Cheng, C. (2013). p53/p21 Pathway involved in mediating cellular senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus patients. *Clin Dev Immunol*, 2013, 134243. <https://doi.org/10.1155/2013/134243>

- Guiotto, M., Raffoul, W., Hart, A. M., Riehle, M. O., & di Summa, P. G. (2020). Human platelet lysate to substitute fetal bovine serum in hMSC expansion for translational applications: a systematic review. *J Transl Med*, 18(1), 351. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02489-4>
- Guler, E., Baripoglu, Y. E., Alenezi, H., Arikan, A., Babazade, R., Unal, S., Duruksu G., Alfares, F. S., Yazir, Y., Oktar, F. N., Gunduz, O., Edirsinghe, M., & Cam, M. E. (2021). Vitamin D(3)/vitamin K(2)/magnesium-loaded polylactic acid/tricalcium phosphate/polycaprolactone composite nanofibers demonstrated osteoinductive effect by increasing Runx2 via Wnt/ β -catenin pathway. *Int J Biol Macromol*, 190, 244-258. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.196>
- Gupta, A. A., Kheur, S., Badhe, R. V., Raj, A. T., Bhonde, R., Jaisinghani, A., Vyas, N., Patil, V. R., Alhazmi, Y. A., Parveen, S., Baeshen, H. A., & Patil, S. (2021). Assessing the potential use of chitosan scaffolds for the sustained localized delivery of vitamin D. *Saudi J Biol Sci*, 28(4), 2210-2215. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.01.008>
- Haeckel, E. (1868). *Natürliche Schöpfungsgeschichte: gemeinverständliche wissenschaftliche Vorträge über die Entwicklungslehre im allgemeinen und diejenigen von Darwin, Goethe und Lamarck im besonderen, über die Anwendung derselben auf den Ursprung des Menschen und andere damit zusammenhängende Grundfragen der Naturwissenschaft; mit Tafeln, Holzschnitten, systematischen und genealogischen Tabellen*. Reimer.
- Haeckel, E. (1877). *Anthropogenie*. W. Engelmann.
- Haecker, V. (1892). Die Kerntheilungsvorgänge bei der Mesoderm und Entodermbildung von Cyclops. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, 39(1), 556-581.
- Hafner, A., Bulyk, M. L., Jambhekar, A., & Lahav, G. (2019). The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(4), 199-210. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0110-x>
- Han, Y., Li, X., Zhang, Y., Han, Y., Chang, F., & Ding, J. (2019). Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/cells8080886>
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*, 9, 12. <https://doi.org/10.1186/1478-811x-9-12>
- Hawley, R. G., Ramezani, A., & Hawley, T. S. (2006). Hematopoietic stem cells. *Methods in enzymology*, 419, 149-179.
- Heo, J. S., Choi, Y., Kim, H. S., & Kim, H. O. (2016). Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med*, 37(1), 115-125. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2413>
- Holick, M. F. (2007). Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*, 357(3), 266-281. <https://doi.org/10.1056/NEJMr070553>
- Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Deans, R. J., Krause, D. S., & Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), 393-395. <https://doi.org/10.1080/14653240500319234>
- Izadpanah, R., Kaushal, D., Kriedt, C., Tsien, F., Patel, B., Dufour, J., & Bunnell, B. A. (2008). Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer Res*, 68(11), 4229-4238.
- Jacobson, L., Simmons, E., Marks, E., & Eldredge, J. (1951). Recovery from radiation injury. *Science*, 113(2940), 510-511.

- Jauković, A., Kukolj, T., Trivanović, D., Okić-Đorđević, I., Obradović, H., Miletić, M., Petrović, V., Mojsilović, S., & Bugarski, D. (2021). Modulating stemness of mesenchymal stem cells from exfoliated deciduous and permanent teeth by IL-17 and bFGF. *J Cell Physiol*, 236(11), 7322-7341. <https://doi.org/10.1002/jcp.30399>
- Jiang, X., Huang, B., Yang, H., Li, G., Zhang, C., Yang, G., Lin, F., & Lin, G. (2017). TGF- β 1 is Involved in Vitamin D-Induced Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells by Regulating the ERK/JNK Pathway. *Cell Physiol Biochem*, 42(6), 2230-2241. <https://doi.org/10.1159/000479997>
- Jin, H. J., Bae, Y. K., Kim, M., Kwon, S. J., Jeon, H. B., Choi, S. J., Kim, S. W., Yang, Y. S., Oh, W., & Chang, J. W. (2013). Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci*, 14(9), 17986-18001. <https://doi.org/10.3390/ijms140917986>
- Jones, E., & Schäfer, R. (2015). Where is the common ground between bone marrow mesenchymal stem/stromal cells from different donors and species? *Stem Cell Res Ther*, 6(1), 143. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0144-8>
- Josse, C., Schoemans, R., Niessen, N. A., Delgaudine, M., Hellin, A. C., Herens, C., Delvenne, P., & Bours, V. (2010). Systematic chromosomal aberrations found in murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 19(8), 1167-1173. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0264>
- Kaigler, D., Avila-Ortiz, G., Travan, S., Taut, A. D., Padial-Molina, M., Rudek, I., Wang, F., Lanis, A., & Giannobile, W. V. (2015). Bone Engineering of Maxillary Sinus Bone Deficiencies Using Enriched CD90+ Stem Cell Therapy: A Randomized Clinical Trial. *J Bone Miner Res*, 30(7), 1206-1216. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2464>
- Kaigler, D., Pagni, G., Park, C. H., Braun, T. M., Holman, L. A., Yi, E., Tarle, S. A., Bartel, R. I., & Giannobile, W. V. (2013). Stem cell therapy for craniofacial bone regeneration: a randomized, controlled feasibility trial. *Cell Transplant*, 22(5), 767-777. <https://doi.org/10.3727/096368912x652968>
- Kanehira, M., Kikuchi, T., Ohkouchi, S., Shibahara, T., Tode, N., Santoso, A., Daito, H., Ohta, H., Tamada, T., & Nukiwa, T. (2012). Targeting lysophosphatidic acid signaling retards culture-associated senescence of human marrow stromal cells. *PLoS one*, 7(2), e32185.
- Kelly, K. A., & Gimble, J. M. (1998). 1,25-Dihydroxy vitamin D3 inhibits adipocyte differentiation and gene expression in murine bone marrow stromal cell clones and primary cultures. *Endocrinology*, 139(5), 2622-2628. <https://doi.org/10.1210/endo.139.5.5970>
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24(5), 1294-1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>
- Kfoury, Y., & Scadden, D. T. (2015). Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell Stem Cell*, 16(3), 239-253. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.019>
- Khan, A. U., Qu, R., Fan, T., Ouyang, J., & Dai, J. (2020). A glance on the role of actin in osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 11(1), 283. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01789-2>
- Khundmiri, S. J., Murray, R. D., & Lederer, E. (2016). PTH and Vitamin D. *Compr Physiol*, 6(2), 561-601. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140071>
- Kim, B. S., Lee, C. H., Chang, G. E., Cheong, E., & Shin, I. (2016). A potent and selective small molecule inhibitor of sirtuin 1 promotes differentiation of pluripotent P19 cells into functional neurons. *Sci Rep*, 6, 34324. <https://doi.org/10.1038/srep34324>

- Kim, M., Rhee, J. K., Choi, H., Kwon, A., Kim, J., Lee, G. D., Kim, Y., & Kim, T. M. (2017). Passage-dependent accumulation of somatic mutations in mesenchymal stromal cells during in vitro culture revealed by whole genome sequencing. *Sci Rep*, 7(1), 14508. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15155-5>
- Kitada, M., & Dezawa, M. (2012). Parkinson's disease and mesenchymal stem cells: potential for cell-based therapy. *Parkinsons Dis*, 2012, 873706. <https://doi.org/10.1155/2012/873706>
- Klotz, B., Mentrup, B., Regensburger, M., Zeck, S., Schneidereit, J., Schupp, N., Linden, C., Merz, C., Ebert, R., & Jakob, F. (2012). 1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment delays cellular aging in human mesenchymal stem cells while maintaining their multipotent capacity. *PLoS One*, 7(1), e29959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029959>
- Kolf, C. M., Cho, E., & Tuan, R. S. (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*, 9(1), 204. <https://doi.org/10.1186/ar2116>
- Kong, J., & Li, Y. C. (2006). Molecular mechanism of 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 290(5), E916-924. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00410.2005>
- Kukolj, T., Trivanović, D., Mojsilović, S., Okić Djordjević, I., Obradović, H., Krstić, J., Jauković, A., & Bugarski, D. (2019). IL-33 guides osteogenesis and increases proliferation and pluripotency marker expression in dental stem cells. *Cell Prolif*, 52(1), e12533. <https://doi.org/10.1111/cpr.12533>
- Kundrotas, G., Gasperskaja, E., Slapsyte, G., Gudleviciene, Z., Krasko, J., Stumbryte, A., & Liudkeviciene, R. (2016). Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow. *Oncotarget*, 7(10), 10788-10802. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7456>
- Kusena, J. W. T., Shariatzadeh, M., Thomas, R. J., & Wilson, S. L. (2021). Understanding cell culture dynamics: a tool for defining protocol parameters for improved processes and efficient manufacturing using human embryonic stem cells. *Bioengineered*, 12(1), 979-996. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1902696>
- Lähnemann, D., Köster, J., Szczurek, E., McCarthy, D. J., Hicks, S. C., Robinson, M. D., Vallejos, C. A., Campbell, K. R., Beerenwinkel, N., Mahfouz, A., Pinello, L., Skums, P., Stamatakis, A., Attolini, C. S., Aparicio, S., Baaijens, J., Balvert, M., de Barbanson, B., Cappuccio, A., Corleone, G., Dutilh, B. E., Florescu, M., Guryev, V., Holmer, R., Jahn, K., Lobo, T. J., Keizer, E. M., Khatri, I., Kielbasa, S. M., Korbel, J. O., Kozlov, A. M., Kuo, T. H., Lelieveldt, B. P. F., Mandoiu, I. I., Marioni, J. C., Marschall, T., Mölder, Niknejad, A., Raczkowski, L., Reinders, M., de Ridder, J., Saliba, A. E., Somarakis, A., Stegle, O., Theis, F. J., Yang, H., Zelikovsky, A., McHardy, A. C., Raphael, B. J., Shah, S. P., & Schönhuth, A. (2020). Eleven grand challenges in single-cell data science. *Genome Biol*, 21(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-1926-6>
- Lazarus, H. M., Haynesworth, S. E., Gerson, S. L., Rosenthal, N. S., & Caplan, A. I. (1995). Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant*, 16(4), 557-564.
- Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Remberger, M. E. B. M. R., Dini, G., Egeler, R. M., Bacigalupo, A., Fibbe, W., & Ringdén, O. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe,

- acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, 371(9624), 1579-1586. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(08\)60690-x](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(08)60690-x)
- Lee, H. J., Song, Y. M., Baek, S., Park, Y. H., & Park, J. B. (2021). Vitamin D Enhanced the Osteogenic Differentiation of Cell Spheroids Composed of Bone Marrow Stem Cells. *Medicina (Kaunas)*, 57(11). <https://doi.org/10.3390/medicina57111271>
- Li, C. Y., Wu, X. Y., Tong, J. B., Yang, X. X., Zhao, J. L., Zheng, Q. F., Zhao, G. B., & Ma, Z. J. (2015). Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther*, 6(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0066-5>
- Li, X.-Y., Ding, J., Zheng, Z.-H., Li, X.-Y., Wu, Z.-B., & Zhu, P. (2012). Long-term culture in vitro impairs the immunosuppressive activity of mesenchymal stem cells on T cells. *Molecular medicine reports*, 6(5), 1183-1189.
- Li, X., Bai, J., Ji, X., Li, R., Xuan, Y., & Wang, Y. (2014). Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *Int J Mol Med*, 34(3), 695-704. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1821>
- Li, Y., He, J., He, X., Li, Y., & Lindgren, U. (2013). Nampt expression increases during osteogenic differentiation of multi- and omnipotent progenitors. *Biochem Biophys Res Commun*, 434(1), 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.02.132>
- Li, Y., He, X., Li, Y., He, J., Anderstam, B., Andersson, G., & Lindgren, U. (2011). Nicotinamide phosphoribosyltransferase (Nampt) affects the lineage fate determination of mesenchymal stem cells: a possible cause for reduced osteogenesis and increased adipogenesis in older individuals. *J Bone Miner Res*, 26(11), 2656-2664. <https://doi.org/10.1002/jbmr.480>
- Li, Y., Wu, Q., Wang, Y., Li, L., Bu, H., & Bao, J. (2017). Senescence of mesenchymal stem cells (Review). *Int J Mol Med*, 39(4), 775-782. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.2912>
- Li, Z., Guo, J., Chang, Q., & Zhang, A. (2009). Paracrine role for mesenchymal stem cells in acute myocardial infarction. *Biol Pharm Bull*, 32(8), 1343-1346. <https://doi.org/10.1248/bpb.32.1343>
- Li, Z., Liu, C., Xie, Z., Song, P., Zhao, R. C., Guo, L., Liu, Z., & Wu, Y. (2011). Epigenetic dysregulation in mesenchymal stem cell aging and spontaneous differentiation. *PloS one*, 6(6), e20526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020526>
- Lin, H., Shen, H., & Tuan, R. S. (2018). Aging of Human Mesenchymal Stem Cells. In *Conn's Handbook of Models for Human Aging (Second Edition)* (pp. 975-994). Elsevier.
- Lin, H., Sohn, J., Shen, H., Langhans, M. T., & Tuan, R. S. (2019). Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. *Biomaterials*, 203, 96-110. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.026>
- Liu, J., Ding, Y., Liu, Z., & Liang, X. (2020). Senescence in Mesenchymal Stem Cells: Functional Alterations, Molecular Mechanisms, and Rejuvenation Strategies. *Front Cell Dev Biol*, 8, 258. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00258>
- Liu, N., Lu, M., Tian, X., & Han, Z. (2007). Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Cell Physiol*, 211(2), 279-286. <https://doi.org/10.1002/jcp.20978>
- Liu, T. M., Wu, Y. N., Guo, X. M., Hui, J. H., Lee, E. H., & Lim, B. (2009). Effects of ectopic Nanog and Oct4 overexpression on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 18(7), 1013-1022. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0335>
- Liu, X., Hu, D., Zeng, Z., Zhu, W., Zhang, N., Yu, H., Chen, H., Wang, K., Wang, Y., Wang, L., Zhao, L., Wu, R., Hu, X., & Wang, J. (2017). SRT1720 promotes survival of aged

- human mesenchymal stem cells via FAIM: a pharmacological strategy to improve stem cell-based therapy for rat myocardial infarction. *Cell Death Dis*, 8(4), e2731. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.107>
- Lorenz, E., Uphoff, D., Reid, T. R., & Shelton, E. (1951). Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst*, 12(1), 197-201.
- Lu, L. L., Liu, Y. J., Yang, S. G., Zhao, Q. J., Wang, X., Gong, W., Han, Z. B., Xu, Z. S., Lu, Y. X., Liu, D., Chen, Z. Z., & Han, Z. C. (2006). Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*, 91(8), 1017-1026.
- Lukomska, B., Stanaszek, L., Zuba-Surma, E., Legosz, P., Sarzynska, S., & Drela, K. (2019). Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy. *Stem Cells Int*, 2019, 9628536. <https://doi.org/10.1155/2019/9628536>
- Lund, T. C., Kobs, A., Blazar, B. R., & Tolar, J. (2010). Mesenchymal stromal cells from donors varying widely in age are of equal cellular fitness after in vitro expansion under hypoxic conditions. *Cytotherapy*, 12(8), 971-981. <https://doi.org/10.3109/14653249.2010.509394>
- Ma, C., Pi, C., Yang, Y., Lin, L., Shi, Y., Li, Y., Li, Y., & He, X. (2017). Nampt Expression Decreases Age-Related Senescence in Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells by Targeting Sirt1. *PLoS One*, 12(1), e0170930. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170930>
- Mahdavi, R., Belgheisi, G., Haghbin-Nazarpak, M., Omid, M., Khojasteh, A., & Solati-Hashjin, M. (2020). Bone tissue engineering gelatin-hydroxyapatite/graphene oxide scaffolds with the ability to release vitamin D: fabrication, characterization, and in vitro study. *J Mater Sci Mater Med*, 31(11), 97. <https://doi.org/10.1007/s10856-020-06430-5>
- Majors, A. K., Boehm, C. A., Nitto, H., Midura, R. J., & Muschler, G. F. (1997). Characterization of human bone marrow stromal cells with respect to osteoblastic differentiation. *J Orthop Res*, 15(4), 546-557. <https://doi.org/10.1002/jor.1100150410>
- Malvicini, R., Santa-Cruz, D., Pacienza, N., & Yannarelli, G. (2019). OCT4 Silencing Triggers Its Epigenetic Repression and Impairs the Osteogenic and Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells. *Int J Mol Sci*, 20(13). <https://doi.org/10.3390/ijms20133268>
- Mareschi, K., Ferrero, I., Rustichelli, D., Aschero, S., Gammaitoni, L., Aglietta, M., Madon, E., & Fagioli, F. (2006). Expansion of mesenchymal stem cells isolated from pediatric and adult donor bone marrow. *J Cell Biochem*, 97(4), 744-754. <https://doi.org/10.1002/jcb.20681>
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12), 7634-7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>
- Mathe, G., Schwarzenberg, L., De Vries, M., Amiel, J., Cattani, A., Schneider, M., Binet, J. L., Tubiana, M., Lalanne, C., Schwarzmann, V. & Nordmann, R. (1965). Les divers aspects du syndrome secondaire compliquant les transfusions allogéniques de moelle osseuse ou de leucocytes chez des sujets atteints d'hémopathies malignes. *European Journal of Cancer* (1965), 1(2), 75-113.
- Matsuyama, M., Søråas, A., Yu, S., Kim, K., Stavrou, E. X., Caimi, P. F., Wald, D., deLima, M., Dahl, J. A., Horvath, S., & Matsuyama, S. (2020). Analysis of epigenetic aging in vivo and in vitro: Factors controlling the speed and direction. *Exp Biol Med (Maywood)*, 245(17), 1543-1551. <https://doi.org/10.1177/1535370220947015>

- Maximow, A. (1908). Über Amitose in den embryonalen Geweben bei Säugetieren. *Anat. Anz.*, 33, 89-98.
- Maximow, A. (1909). The lymphocyte as a stem cell, common to different blood elements in embryonic development and during the post-fetal life of mammals. *Folia Haematologica*, 8(3), 125-134.
- Mayani, H. (2016). The regulation of hematopoietic stem cell populations. *F1000Res*, 5. <https://doi.org/10.12688/f1000research.8532.1>
- McCollum, E. V., Simmonds, N., Becker, J. E., & Shipley, P. d. (1922). Studies on experimental rickets: XXI. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *Journal of Biological Chemistry*, 53(2), 293-312.
- McLeod, C. M., & Mauck, R. L. (2017). On the origin and impact of mesenchymal stem cell heterogeneity: new insights and emerging tools for single cell analysis. *Eur Cell Mater*, 34, 217-231. <https://doi.org/10.22203/eCM.v034a14>
- Mellanby, E. (1919). An experimental investigation of rickets. *Lancet*, 1, 407-412.
- Mennan, C., Garcia, J., Roberts, S., Hulme, C., & Wright, K. (2019). A comprehensive characterisation of large-scale expanded human bone marrow and umbilical cord mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 10(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1202-4>
- Meppelink, A. M., Wang, X.H., Bradica, G., Barron, K., Hiltz, K., Liu, X. H., Goldman, S. M., Vacanti, J. P., Keating, A., & Hoganson, D. M. (2016). Rapid isolation of bone marrow mesenchymal stromal cells using integrated centrifuge-based technology. *Cytotherapy*, 18(6), 729-739.
- Merino-González, C., Zuñiga, F. A., Escudero, C., Ormazabal, V., Reyes, C., Nova-Lamperti, E., Salomón, C., & Aguayo, C. (2016). Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Angiogenesis: Potencial Clinical Application. *Front Physiol*, 7, 24. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00024>
- Meuleman, N., Tondreau, T., Delforge, A., Dejeneffe, M., Massy, M., Libertalis, M., Bron, D., & Lagneaux, L. (2006). Human marrow mesenchymal stem cell culture: serum-free medium allows better expansion than classical alpha-MEM medium. *Eur J Haematol*, 76(4), 309-316. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2005.00611.x>
- Miller, I., Min, M., Yang, C., Tian, C., Gookin, S., Carter, D., & Spencer, S. L. (2018). Ki67 is a Graded Rather than a Binary Marker of Proliferation versus Quiescence. *Cell Rep*, 24(5), 1105-1112 e1105. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.110>
- Mishra, P., Martin, D. C., Androulakis, I. P., & Moghe, P. V. (2019). Fluorescence Imaging of Actin Turnover Parses Early Stem Cell Lineage Divergence and Senescence. *Sci Rep*, 9(1), 10377. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46682-y>
- Miura, Y., Gao, Z., Miura, M., Seo, B. M., Sonoyama, W., Chen, W., Gronthos, S., Zhang, L., & Shi, S. (2006). Mesenchymal stem cell-organized bone marrow elements: an alternative hematopoietic progenitor resource. *Stem Cells*, 24(11), 2428-2436. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0089>
- Mochizuki, T., Muneta, T., Sakaguchi, Y., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H., & Sekiya, I. (2006). Higher chondrogenic potential of fibrous synovium- and adipose synovium-derived cells compared with subcutaneous fat-derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis Rheum*, 54(3), 843-853. <https://doi.org/10.1002/art.21651>
- Moerman, E. J., Teng, K., Lipschitz, D. A., & Lecka-Czernik, B. (2004). Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow

- stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. *Aging Cell*, 3(6), 379-389. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00127.x>
- Mohd Ali, N., Boo, L., Yeap, S. K., Ky, H., Satharasinghe, D. A., Liew, W. C., Ong, H. K., Cheong, S. K., & Kamarul, T. (2016). Probable impact of age and hypoxia on proliferation and microRNA expression profile of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *PeerJ*, 4, e1536. <https://doi.org/10.7717/peerj.1536>
- Moseley, T. A., Zhu, M., & Hedrick, M. H. (2006). Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. *Plast Reconstr Surg*, 118(3 Suppl), 121S-128S. <https://doi.org/10.1097/01.prs.0000234609.74811.2e>
- Murphy, M. B., Moncivais, K., & Caplan, A. I. (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*, 45(11), e54. <https://doi.org/10.1038/emm.2013.94>
- Nawrocka, D., Kornicka, K., Szydlarska, J., & Marycz, K. (2017). Corrigendum to "Basic Fibroblast Growth Factor Inhibits Apoptosis and Promotes Proliferation of Adipose-Derived Mesenchymal Stromal Cells Isolated from Patients with Type 2 Diabetes by Reducing Cellular Oxidative Stress". *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 1083618. <https://doi.org/10.1155/2017/1083618>
- Neri, S. (2019). Genetic Stability of Mesenchymal Stromal Cells for Regenerative Medicine Applications: A Fundamental Biosafety Aspect. *Int J Mol Sci*, 20(10). <https://doi.org/10.3390/ijms20102406>
- Nishida, S., Endo, N., Yamagiwa, H., Tanizawa, T., & Takahashi, H. E. (1999). Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab*, 17(3), 171-177. <https://doi.org/10.1007/s007740050081>
- Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development*, 134(4), 635-646. <https://doi.org/10.1242/dev.02787>
- Nuttall, M. E., & Gimble, J. M. (2004). Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol*, 4(3), 290-294. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2004.03.002>
- O'Brate, A., & Giannakakou, P. (2003). The importance of p53 location: nuclear or cytoplasmic zip code? *Drug Resist Updat*, 6(6), 313-322. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2003.10.004>
- Oh, K. W., Moon, C., Kim, H. Y., Oh, S. I., Park, J., Lee, J. H., Chang, I. Y., Kim, K. S., & Kim, S. H. (2015). Phase I trial of repeated intrathecal autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in amyotrophic lateral sclerosis. *Stem Cells Transl Med*, 4(6), 590-597. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0212>
- Oreffo, R. O., Bennett, A., Carr, A. J., & Triffitt, J. T. (1998). Patients with primary osteoarthritis show no change with ageing in the number of osteogenic precursors. *Scand J Rheumatol*, 27(6), 415-424. <https://doi.org/10.1080/030097498442235>
- Oreffo, R. O., Bord, S., & Triffitt, J. T. (1998). Skeletal progenitor cells and ageing human populations. *Clin Sci (Lond)*, 94(5), 549-555. <https://doi.org/10.1042/cs0940549>
- Orford, K. W., & Scadden, D. T. (2008). Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet*, 9(2), 115-128. <https://doi.org/10.1038/nrg2269>
- Ota, K., Dambaeva, S., Kim, M. W., Han, A. R., Fukui, A., Gilman-Sachs, A., Beaman, K., & Kwak-Kim, J. (2015). 1,25-Dihydroxy-vitamin D3 regulates NK-cell cytotoxicity,

- cytokine secretion, and degranulation in women with recurrent pregnancy losses. *Eur J Immunol*, 45(11), 3188-3199. <https://doi.org/10.1002/eji.201545541>
- Owen, M., & Friedenstein, A. J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*, 136, 42-60. <https://doi.org/10.1002/9780470513637.ch4>
- Pagani, F. D., DerSimonian, H., Zawadzka, A., Wetzel, K., Edge, A. S., Jacoby, D. B., Dinsmore, J. H., Wright, S., Aretz, T. H., Eisen, H. J., & Aaronson, K. D. (2003). Autologous skeletal myoblasts transplanted to ischemia-damaged myocardium in humans. Histological analysis of cell survival and differentiation. *J Am Coll Cardiol*, 41(5), 879-888. [https://doi.org/10.1016/s0735-1097\(03\)00081-0](https://doi.org/10.1016/s0735-1097(03)00081-0)
- Pan, Q., Fouraschen, S. M., de Ruyter, P. E., Dinjens, W. N., Kwekkeboom, J., Tilanus, H. W., & van der Laan, L. J. (2014). Detection of spontaneous tumorigenic transformation during culture expansion of human mesenchymal stromal cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 239(1), 105-115. <https://doi.org/10.1177/1535370213506802>
- Pappenheim, A. (1896). Ueber entwicklung und ausbildung der erythroblasten. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 145(3), 587-643.
- Pappenheim, A. (1907). Zwei Fälle akuter grosslymphozytärer Leukämie. *Fol. Haematol*, 4, 301-308.
- Passos, J. F., Nelson, G., Wang, C., Richter, T., Simillion, C., Proctor, C. J., Miwa, S., Olijslagers, S., Hallinan, J., Wipat, A., Saretzki, G., Rudolph, K. L., Kirkwood, T. B. L., & von Zglinicki, T. (2010). Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. *Mol Syst Biol*, 6, 347. <https://doi.org/10.1038/msb.2010.5>
- Patt, H. M., & Maloney, M. A. (1972). Bone formation and resorption as a requirement for marrow development. *Proc Soc Exp Biol Med*, 140(1), 205-207. <https://doi.org/10.3181/00379727-140-36426>
- Perry, A., & Linch, D. (1996). The history of bone-marrow transplantation. *Blood reviews*, 10(4), 215-219.
- Pesarini, J. R., Oliveira, E. J. T., Pessatto, L. R., Rabacow, A. P. M., Camassola, M., Dos Santos, B. P., de Barros, M. E., Cantero, W., Antonioli-Silva, A. C. M. B., & Oliveira, R. J. (2018). Calcitriol combined with calcium chloride causes apoptosis in undifferentiated adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells, but this effect decreases during adipogenic differentiation. *Biomed Pharmacother*, 108, 914-924. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.083>
- Petrenko, Y., Vackova, I., Kekulova, K., Chudickova, M., Koci, Z., Turnovcova, K., Skalnikova, H. K., Vodicka, P & Kubinova, S. (2020). A Comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells derived from Different Sources, with a Focus on Neuroregenerative Potential. *Sci Rep*, 10(1), 4290. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61167-z>
- Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., Machado De Oliveira, R., Leid, M., McBurney, M. W. & Guarente, L. (2004). Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR-gamma. *Nature*, 429(6993), 771-776. <https://doi.org/10.1038/nature02583>
- Piccinato, C. A., Sertie, A. L., Torres, N., Ferretti, M., & Antonioli, E. (2015). High OCT4 and Low p16(INK4A) Expressions Determine In Vitro Lifespan of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*, 2015, 369828. <https://doi.org/10.1155/2015/369828>
- Pierantozzi, E., Gava, B., Manini, I., Roviello, F., Marotta, G., Chiavarelli, M., & Sorrentino, V. (2011). Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of

- NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. *Stem Cells Dev*, 20(5), 915-923. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0353>
- Pilz, S., Zittermann, A., Trummer, C., Theiler-Schwetz, V., Lerchbaum, E., Keppel, M. H., Grübler, M. R., März, W., & Pandis, M. (2019). Vitamin D testing and treatment: a narrative review of current evidence. *Endocr Connect*, 8(2), R27-R43. <https://doi.org/10.1530/ec-18-0432>
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Potdar, P. D., & Jethmalani, Y. D. (2015). Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World J Stem Cells*, 7(5), 839-851. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i5.839>
- Provvedini, D. M., Tsoukas, C. D., Deftos, L. J., & Manolagas, S. C. (1983). 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in human leukocytes. *Science*, 221(4616), 1181-1183. <https://doi.org/10.1126/science.6310748>
- Raj, V., Natarajan, S., C. M., Chatterjee, S., Ramasamy, M., Ramanujam, G. M., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Choi, K. C., Arocklaraj, J., & Karuppiah, K. (2021). Cholecalciferol and metformin protect against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction and senescence by modulating sirtuin-1 and protein arginine methyltransferase-1. *Eur J Pharmacol*, 912, 174531. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174531>
- Rajan, A., Eubanks, E., Edwards, S., Aronovich, S., Travan, S., Rudek, I., Wang, F., Lanis, A., & Kaigler, D. (2014). Optimized cell survival and seeding efficiency for craniofacial tissue engineering using clinical stem cell therapy. *Stem Cells Transl Med*, 3(12), 1495-1503. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0039>
- Ramdas, N. M., & Shivashankar, G. V. (2015). Cytoskeletal control of nuclear morphology and chromatin organization. *J Mol Biol*, 427(3), 695-706. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.09.008>
- Ramireddy, A., Brodt, C. R., Mendizabal, A. M., DiFede, D. L., Healy, C., Goyal, V., Alansari, Y., Coffey, J. O., Viles-Gonzalez, J. F., Heldman, A. W., Goldberger, J. J., Myerburg, R., Hare, J. M., & Mitrani, R. D. (2017). Effects of Transendocardial Stem Cell Injection on Ventricular Proarrhythmia in Patients with Ischemic Cardiomyopathy: Results from the POSEIDON and TAC-HFT Trials. *Stem Cells Transl Med*, 6(5), 1366-1372. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0328>
- Raynaud, C. M., Ahmad, F. S., Allouba, M., Abou-Saleh, H., Lui, K. O., & Yacoub, M. (2014). Reprogramming for cardiac regeneration. *Global Cardiology Science and Practice*, 2014(3), 44.
- Reagan, M. R., & Rosen, C. J. (2016). Navigating the bone marrow niche: translational insights and cancer-driven dysfunction. *Nat Rev Rheumatol*, 12(3), 154-168. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.160>
- Remnant, L., Kochanova, N. Y., Reid, C., Cisneros-Soberanis, F., & Earnshaw, W. C. (2021). The intrinsically disorderly story of Ki-67. *Open Biol*, 11(8), 210120. <https://doi.org/10.1098/rsob.210120>
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105-111. <https://doi.org/10.1038/35102167>
- Richardson, J. D., Bertaso, A. G., Psaltis, P. J., Frost, L., Carbone, A., Paton, S., Nelson, A. J., Wong, D. T. I., Worthley, M. I., Gronthos, S., Zannettino, A. C. W., & Worthley, S. G. (2013). Impact of timing and dose of mesenchymal stromal cell therapy in a

- preclinical model of acute myocardial infarction. *J Card Fail*, 19(5), 342-353. <https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2013.03.011>
- Riekstina, U., Cakstina, I., Parfejevs, V., Hoogduijn, M., Jankovskis, G., Muiznieks, I., Muceniece, R., & Ancans, J. (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev Rep*, 5(4), 378-386. <https://doi.org/10.1007/s12015-009-9094-9>
- Rosenblatt, J., Bissonnette, A., Ahmad, R., Wu, Z., Vasir, B., Stevenson, K., Zarwan, C., Keefe, W., Glotzbecker, B., Mills, H., Joyce, R., Levine, J. D., Tzachanis, D., Boussiotis, V., Kufe, D., & Avigan, D. (2010). Immunomodulatory effects of vitamin D: implications for GVHD. *Bone Marrow Transplant*, 45(9), 1463-1468. <https://doi.org/10.1038/bmt.2009.366>
- Rosland, G. V., Svendsen, A., Torsvik, A., Sobala, E., McCormack, E., Immervoll, H., Mysliwietz, J., Tonn, J. C., Goldbrunner, R., Lenning, P. E., Bjerkvig, R., & Schichor, C. (2009). Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res*, 69(13), 5331-5339. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-4630>
- Ruggiero, B., Padwa, B. L., Christoph, K. M., Zhou, S., & Glowacki, J. (2016). Vitamin D metabolism and regulation in pediatric MSCs. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 164, 287-291. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.09.025>
- Salehpour, A., Hedayati, M., Shidfar, F., Neshatbini Tehrani, A., Farshad, A. A., & Mohammadi, S. (2021). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates adipogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells dose-dependently. *Nutr Metab (Lond)*, 18(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12986-021-00561-4>
- Sales Gil, R., & Vagnarelli, P. (2018). Ki-67: More Hidden behind a 'Classic Proliferation Marker'. *Trends Biochem Sci*, 43(10), 747-748. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.08.004>
- Salminen, A., Kaarniranta, K., & Kauppinen, A. (2013). Crosstalk between Oxidative Stress and SIRT1: Impact on the Aging Process. *Int J Mol Sci*, 14(2), 3834-3859. <https://doi.org/10.3390/ijms14023834>
- Sattary, M., Rafienia, M., Kazemi, M., Salehi, H., & Mahmoudzadeh, M. (2019). Promoting effect of nano hydroxyapatite and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in polycaprolactone/gelatin scaffold for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 97, 141-155. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.030>
- Saxer, F. (1896). Über die Entstehung weißer und roter Blutkörperchen. *Anat. Anz*, 11, 355-358.
- Schallmoser, K., Bartmann, C., Rohde, E., Bork, S., Guelly, C., Obenauf, A. C., Reinsch, A., Horn, P., Ho, A. D., Strunk, D., & Wagner, W. (2010). Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica*, 95(6), 867-874. <https://doi.org/10.3324/haematol.2009.011692>
- Schallmoser, K., Rohde, E., Reinisch, A., Bartmann, C., Thaler, D., Drexler, C., Obenauf, A. C., Lanzer, G., Linkesch, W., & Strunk, D. (2008). Rapid large-scale expansion of functional mesenchymal stem cells from unmanipulated bone marrow without animal serum. *Tissue Eng Part C Methods*, 14(3), 185-196. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0060>

- Schmeer, C., Kretz, A., Wengerodt, D., Stojiljkovic, M., & Witte, O. W. (2019). Dissecting Aging and Senescence-Current Concepts and Open Lessons. *Cells*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/cells8111446>
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4(1-2), 7-25.
- Seita, J., & Weissman, I. L. (2010). Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2(6), 640-653. <https://doi.org/10.1002/wsbm.86>
- Selle, M., Koch, J. D., Ongsiek, A., Ulbrich, L., Ye, W., Jiang, Z., Krettek, C., Neunaber, C., & Noack, S. (2022). Influence of age on stem cells depends on the sex of the bone marrow donor. *J Cell Mol Med*, 26(5), 1594-1605. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17201>
- Sen, B., Uzer, G., Samsonraj, R. M., Xie, Z., McGrath, C., Styner, M., Dudakovic, A., van Wijnen, A. J., Rubin, J. (2017). Intranuclear Actin Structure Modulates Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Stem Cells*, 35(6), 1624-1635. <https://doi.org/10.1002/stem.2617>
- Seo, E., Basu-Roy, U., Gunaratne, P. H., Coarfa, C., Lim, D. S., Basilico, C., & Mansukhani, A. (2013). SOX2 regulates YAP1 to maintain stemness and determine cell fate in the osteo-adipo lineage. *Cell Rep*, 3(6), 2075-2087. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.05.029>
- Shadmanfar, S., Labibzadeh, N., Emadedin, M., Jaroughi, N., Azimian, V., Mardpour, S., Kakroodi, F. A., Bolurieh, T., Hosseini, S. E., Chehrazi, M., Niknejadi, M., Baharvand, H., Gharibdoost, F., & Aghdami, N. (2018). Intra-articular knee implantation of autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in rheumatoid arthritis patients with knee involvement: Results of a randomized, triple-blind, placebo-controlled phase 1/2 clinical trial. *Cytotherapy*, 20(4), 499-506. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.12.009>
- Sharili, A. S., Kenny, F. N., Vartiainen, M. K., & Connelly, J. T. (2016). Nuclear actin modulates cell motility via transcriptional regulation of adhesive and cytoskeletal genes. *Sci Rep*, 6, 33893. <https://doi.org/10.1038/srep33893>
- Sheykhhasan, M. (2017). The perspective on bone marrow-derived mesenchymal stem cells application in regenerative medicine. *American Journal of Translational Medicine ISSN*, 2474, 7378.
- Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S., & Hopkinson, A. (2014). Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*, 32(6), 1380-1389. <https://doi.org/10.1002/stem.1661>
- Siegel, G., Kluba, T., Hermanutz-Klein, U., Bieback, K., Northoff, H., & Schäfer, R. (2013). Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med*, 11, 146. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-146>
- Simic, P., Zainabadi, K., Bell, E., Sykes, D. B., Saez, B., Lotinun, S., Baron, R., Scadden, D., Schipani, E., & Guarente, L. (2013). SIRT1 regulates differentiation of mesenchymal stem cells by deacetylating β -catenin. *EMBO Mol Med*, 5(3), 430-440. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201606>
- Siminovitch, L., McCulloch, E. A., & Till, J. E. (1963). The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol*, 62, 327-336. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030620313>

- Simonson, O. E., Domogatskaya, A., Volchkov, P., & Rodin, S. (2015). The safety of human pluripotent stem cells in clinical treatment. *Ann Med*, 47(5), 370-380. <https://doi.org/10.3109/07853890.2015.1051579>
- Sobecki, M., Mrouj, K., Camasses, A., Parisis, N., Nicolas, E., Llères, D., Gerbe, F., Prieto, S., Krasinska, L., David, A., Eguren, M., Birling, M. C., Urbach, S., Hem, S., Déjardin, J., Malumbres, M., Jay, P., Dulic, V., Lafontaine, D. L., Feil, R., & Fisher, D. (2016). The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *Elife*, 5, e13722. <https://doi.org/10.7554/eLife.13722>
- Soliman, H., Theret, M., Scott, W., Hill, L., Underhill, T. M., Hinz, B., & Rossi, F. M. V. (2021). Multipotent stromal cells: One name, multiple identities. *Cell Stem Cell*, 28(10), 1690-1707. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.09.001>
- Solozobova, V., & Blattner, C. (2011). p53 in stem cells. *World journal of biological chemistry*, 2(9), 202.
- Solozobova, V., Rolletschek, A., & Blattner, C. (2009). Nuclear accumulation and activation of p53 in embryonic stem cells after DNA damage. *BMC Cell Biol*, 10, 46. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-10-46>
- Song, L., Webb, N. E., Song, Y., & Tuan, R. S. (2006). Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. *Stem Cells*, 24(7), 1707-1718. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0604>
- Song, Y., Zhao, H. Y., Lyu, Z. S., Cao, X. N., Shi, M. M., Wen, Q., Lang, F. F., Wang, Y., Xu, L. P., Zhang, X. J. & Kong, Y. (2018). Dysfunctional Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Patients with Poor Graft Function after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 24(10), 1981-1989. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.06.021>
- Soto-Gamez, A., Quax, W. J., & Demaria, M. (2019). Regulation of Survival Networks in Senescent Cells: From Mechanisms to Interventions. *J Mol Biol*, 431(15), 2629-2643. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.05.036>
- Soto, J. R., Anthias, C., Madrigal, A., & Snowden, J. A. (2020). Insights Into the Role of Vitamin D as a Biomarker in Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*, 11, 966. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00966>
- Spencer, V. A., Costes, S., Inman, J. L., Xu, R., Chen, J., Hendzel, M. J., & Bissell, M. J. (2011). Depletion of nuclear actin is a key mediator of quiescence in epithelial cells. *J Cell Sci*, 124(Pt 1), 123-132. <https://doi.org/10.1242/jcs.073197>
- Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., & Kassem, M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 33(6), 919-926. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.07.005>
- Stenderup, K., Justesen, J., Eriksen, E. F., Rattan, S. I., & Kassem, M. (2001). Number and proliferative capacity of osteogenic stem cells are maintained during aging and in patients with osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 16(6), 1120-1129. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.6.1120>
- Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D., & Scutt, A. (2008). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev*, 129(3), 163-173. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.12.002>
- Sullivan, K. D., Galbraith, M. D., Andrysiak, Z., & Espinosa, J. M. (2018). Mechanisms of transcriptional regulation by p53. *Cell Death Differ*, 25(1), 133-143. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.174>

- Sumathra, M., Munusamy, M. A., Alarfaj, A. A., & Rajan, M. (2018). Osteoblast response to Vitamin D3 loaded cellulose enriched hydroxyapatite Mesoporous silica nanoparticles composite. *Biomed Pharmacother*, 103, 858-868. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.078>
- Sun, H., Qiao, W., Cui, M., Yang, C., Wang, R., Goltzman, D., Jin, J., & Miao, D. (2020). The Polycomb Protein Bmi1 Plays a Crucial Role in the Prevention of 1,25(OH)(2) D Deficiency-Induced Bone Loss. *J Bone Miner Res*, 35(3), 583-595. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3921>
- Sun, J., Wei, Z. Z., Gu, X., Zhang, J. Y., Zhang, Y., Li, J., & Wei, L. (2015). Intranasal delivery of hypoxia-preconditioned bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhanced regenerative effects after intracerebral hemorrhagic stroke in mice. *Exp Neurol*, 272, 78-87. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.03.011>
- Sun, W., Qiao, W., Zhou, B., Hu, Z., Yan, Q., Wu, J., Wang, R., Zhang, Q., & Miao, D. (2018). Overexpression of Sirt1 in mesenchymal stem cells protects against bone loss in mice by FOXO3a deacetylation and oxidative stress inhibition. *Metabolism*, 88, 61-71. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.06.006>
- Sun, X., & Kaufman, P. D. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*, 127(2), 175-186. <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8>
- Syková, E., Rychmach, P., Drahorádová, I., Konrádová, Š., Růžičková, K., Voříšek, I., Forostyak, S., Homola, A., & Bojar, M. (2017). Transplantation of Mesenchymal Stromal Cells in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase I/IIa Clinical Trial. *Cell Transplant*, 26(4), 647-658. <https://doi.org/10.3727/096368916x693716>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Tang, X., & Meng, H. (2009). Osteogenic induction and 1,25-dihydroxyvitamin D3 oppositely regulate the proliferation and expression of RANKL and the vitamin D receptor of human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol*, 54(7), 625-633. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2009.04.009>
- Tanno, M., Sakamoto, J., Miura, T., Shimamoto, K., & Horio, Y. (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD⁺-dependent histone deacetylase SIRT1. *J Biol Chem*, 282(9), 6823-6832. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609554200>
- Taran, R., Mamidi, M. K., Singh, G., Dutta, S., Parhar, I. S., John, J. P., Bhonde, R., Pal, R., & Das, A. K. (2014). In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources. *J Biosci*, 39(1), 157-169. <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9409-5>
- Tavassoli, M., & Crosby, W. H. (1968). Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science*, 161(3836), 54-56. <https://doi.org/10.1126/science.161.3836.54>
- Tecilazich, F., Formenti, A. M., & Giustina, A. (2021). Role of vitamin D in diabetic retinopathy: Pathophysiological and clinical aspects. *Rev Endocr Metab Disord*, 22(4), 715-727. <https://doi.org/10.1007/s11154-020-09575-4>
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145-1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Tieu, A., Lalu, M. M., Slobodian, M., Gnyra, C., Fergusson, D. A., Montroy, J., Burger, D., Stewart, D. J., & Allan, D. S. (2020). An Analysis of Mesenchymal Stem Cell-Derived

- Extracellular Vesicles for Preclinical Use. *ACS Nano*, 14(8), 9728-9743. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c01363>
- Till, J. E., & McCulloch, E. A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research*, 14(2), 213-222.
- Till, J. E., McCulloch, E. A., & Siminovitch, L. (1964). A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 51(1), 29.
- Tsai, C. C., Su, P. F., Huang, Y. F., Yew, T. L., & Hung, S. C. (2012). Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. *Mol Cell*, 47(2), 169-182. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.020>
- Tseng, P. C., Hou, S. M., Chen, R. J., Peng, H. W., Hsieh, C. F., Kuo, M. L., & Yen, M. L. (2011). Resveratrol promotes osteogenesis of human mesenchymal stem cells by upregulating RUNX2 gene expression via the SIRT1/FOXO3A axis. *J Bone Miner Res*, 26(10), 2552-2563. <https://doi.org/10.1002/jbmr.460>
- Turinetto, V., Vitale, E., & Giachino, C. (2016). Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int J Mol Sci*, 17(7). <https://doi.org/10.3390/ijms17071164>
- Uccelli, A., Laroni, A., Brundin, L., Clanet, M., Fernandez, O., Nabavi, S. M., Muraro, P. A., Oliveri, R. S., Radue, E. W., Sellner, J., Sorensen, P. S., Sormani, M. P., Wuerful, J. T., Battaglia, M. A., & Freedman, M. S. (2019). MEsenchymal StEm cells for Multiple Sclerosis (MESEMS): a randomized, double blind, cross-over phase I/II clinical trial with autologous mesenchymal stem cells for the therapy of multiple sclerosis. *Trials*, 20(1), 263. <https://doi.org/10.1186/s13063-019-3346-z>
- Ullah, I., Subbarao, R. B., & Rho, G. J. (2015). Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep*, 35(2). <https://doi.org/10.1042/bsr20150025>
- Umar, M., Sastry, K. S., & Chouchane, A. I. (2018). Role of Vitamin D Beyond the Skeletal Function: A Review of the Molecular and Clinical Studies. *Int J Mol Sci*, 19(6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061618>
- van Driel, M., & van Leeuwen, J. (2017). Vitamin D endocrinology of bone mineralization. *Mol Cell Endocrinol*, 453, 46-51. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.06.008>
- Velletri, T., Xie, N., Wang, Y., Huang, Y., Yang, Q., Chen, X., Chen, Q., Shou, P., Gan, Y., Gan, Y., Cao, G., Melino, G., & Shi, Y. (2016). P53 functional abnormality in mesenchymal stem cells promotes osteosarcoma development. *Cell Death Dis*, 7(1), e2015. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.367>
- Venkataramana, N. K., Kumar, S. K., Balaraju, S., Radhakrishnan, R. C., Bansal, A., Dixit, A., Rao, D. K., Das, M., Jan, M., Gupta, P. K., & Totey, S. M. (2010). Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl Res*, 155(2), 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2009.07.006>
- Viereck, V., Siggelkow, H., Tauber, S., Raddatz, D., Schutze, N., & Hüfner, M. (2002). Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. *J Cell Biochem*, 86(2), 348-356. <https://doi.org/10.1002/jcb.10220>
- Vishnubalaji, R., Al-Nbaheen, M., Kadalmani, B., Aldahmash, A., & Ramesh, T. (2012). Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. *Cell Tissue Res*, 347(2), 419-427. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1306-3>

- Vu, A. A., & Bose, S. (2020). Vitamin D(3) Release from Traditionally and Additively Manufactured Tricalcium Phosphate Bone Tissue Engineering Scaffolds. *Ann Biomed Eng*, 48(3), 1025-1033. <https://doi.org/10.1007/s10439-019-02292-3>
- Vujić, D. (2012). Transplantacija matičnih ćelija hematopoeze. In M. D. (Ed.), *Klinička hematologija* (pp. 630-704). Zavod za udžbenike i nastavna sredstva.
- Wagner, W., Bork, S., Horn, P., Kronic, D., Walenda, T., Diehlmann, A., Benes, V., Blake, J., Huber, F. X., Eckstein, V., Boukamp, P., & Ho, A. D. (2009). Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS One*, 4(6), e5846. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005846>
- Wagner, W., & Ho, A. D. (2007). Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev*, 3(4), 239-248. <https://doi.org/10.1007/s12015-007-9001-1>
- Wagner, W., Ho, A. D., & Zenke, M. (2010). Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 16(4), 445-453.
- Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Bernes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V., & Ho, A. D. (2008). Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PloS one*, 3(5), e2213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002213>
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., & Ho, A. D. (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*, 33(11), 1402-1416. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.07.003>
- Walenda, T., Bork, S., Horn, P., Wein, F., Saffrich, R., Diehlmann, A., Eckstein, V., Ho, A. D., & Wagner, W. (2010). Co-culture with mesenchymal stromal cells increases proliferation and maintenance of haematopoietic progenitor cells. *J Cell Mol Med*, 14(1-2), 337-350. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00776.x>
- Wang, C., Meng, H., Wang, X., Zhao, C., Peng, J., & Wang, Y. (2016). Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Osteoblasts and Adipocytes and its Role in Treatment of Osteoporosis. *Med Sci Monit*, 22, 226-233. <https://doi.org/10.12659/msm.897044>
- Wang, D., Song, J., & Ma, H. (2018). An in vitro Experimental Insight into the Osteoblast Responses to Vitamin D3 and Its Metabolites. *Pharmacology*, 101(5-6), 225-235. <https://doi.org/10.1159/000486446>
- Wang, D., Zhang, H., Liang, J., Wang, H., Hua, B., Feng, X., Gilkeson, G. S., Farge, D., Shi, S., & Sun, L. (2018). A Long-Term Follow-Up Study of Allogeneic Mesenchymal Stem/Stromal Cell Transplantation in Patients with Drug-Resistant Systemic Lupus Erythematosus. *Stem Cell Reports*, 10(3), 933-941. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.01.029>
- Wang, H., Hu, Z., Wu, J., Mei, Y., Zhang, Q., Zhang, H., Miao, D. & Sun, W. (2019). Sirt1 Promotes Osteogenic Differentiation and Increases Alveolar Bone Mass via Bmi1 Activation in Mice. *J Bone Miner Res*, 34(6), 1169-1181. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3677>
- Wang, M., Yuan, Q., & Xie, L. (2018). Mesenchymal Stem Cell-Based Immunomodulation: Properties and Clinical Application. *Stem Cells Int*, 2018, 3057624. <https://doi.org/10.1155/2018/3057624>
- Wang, S., Wang, Z., Su, H., Chen, F., Ma, M., Yu, W., Ye, G., Cen, S., Wu, X., Demg, W., Feng, P., Zeng, C., Shen, H., & Wu, Y. (2021). Effects of long-term culture on the

- biological characteristics and RNA profiles of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Mol Ther Nucleic Acids*, 26, 557-574. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.08.013>
- Wang, T., Sun, S., Wan, Z., Weil, M. H., & Tang, W. (2012). Effects of bone marrow mesenchymal stem cells in a rat model of myocardial infarction. *Resuscitation*, 83(11), 1391-1396. <https://doi.org/10.1016/j.resuscitation.2012.02.033>
- Wang, X., Zhang, F. X., Wang, Z. M., Wang, Q., Wang, H. F., Ren, Y., Tai, D. P., Liang, H., & Liu, D. J. (2016). Histone H3K9 acetylation influences growth characteristics of goat adipose-derived stem cells in vitro. *Genet Mol Res*, 15(4). <https://doi.org/10.4238/gmr15048954>
- Wang, X. Y., Lan, Y., He, W. Y., Zhang, L., Yao, H. Y., Hou, C. M., Tong, Y., Liu, Y. L., Yagn, G., Liu, X. D., Liu, B., & Mao, N. (2008). Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. *Blood*, 111(4), 2436-2443. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-099333>
- Weismann, A. (1885). *Die Continuität des Keimplasma's als grundlage einer Theorie der Vererbung*. Verlag von Gustav Fischer.
- Wen, L., Labopin, M., Badoglio, M., Wang, D., Sun, L., & Farge-Bancel, D. (2019). Prognostic Factors for Clinical Response in Systemic Lupus Erythematosus Patients Treated by Allogeneic Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*, 2019, 7061408. <https://doi.org/10.1155/2019/7061408>
- Widowati, W., Rihibiha, D. D., Khiong, K., Widodo, M. A., Sumitro, S. B., & Bachtiar, I. (2017). Hypoxia in Mesenchymal Stem Cell. *Hypoxia Hum. Dis*, 1, 91-115.
- Windans, A., & Bock, F. (1936). Über das Provitamin aus dem Sterin der Schweineschwarte.
- Windaus, A., Lettre, H., & Schenck, F. (1935). 7-Dehydrocholesterol. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 520, 98-106.
- Wu, K. H., Wu, H. P., Chan, C. K., Hwang, S. M., Peng, C. T., & Chao, Y. H. (2013). The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: from bench to bedsides. *Cell Transplant*, 22(4), 723-729. <https://doi.org/10.3727/096368912x655217>
- Xia, C., Jiang, T., Wang, Y., Chen, X., Hu, Y., & Gao, Y. (2020). The p53/miR-145a Axis Promotes Cellular Senescence and Inhibits Osteogenic Differentiation by Targeting Cbfb in Mesenchymal Stem Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 609186. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.609186>
- Yamamoto, H., Schoonjans, K., & Auwerx, J. (2007). Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol*, 21(8), 1745-1755. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0079>
- Yamout, B., Hourani, R., Salti, H., Barada, W., El-Hajj, T., Al-Kutoubi, A., Herlopian, A., Raz, E. R., Mahfouz, R., Khalil-Harndan, R., Kreidieh, N. M. A., El-Sabban, M., & Bazarbachi, A. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: a pilot study. *J Neuroimmunol*, 227(1-2), 185-189. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2010.07.013>
- Yang, R., Chen, J., Zhang, J., Qin, R., Wang, R., Qiu, Y., Mao, Z., Goltzman, D., & Miao, D. (2020). 1,25-Dihydroxyvitamin D protects against age-related osteoporosis by a novel VDR-Ezh2-p16 signal axis. *Aging Cell*, 19(2), e13095. <https://doi.org/10.1111/accel.13095>
- Yang, S. R., Park, J. R., & Kang, K. S. (2015). Reactive Oxygen Species in Mesenchymal Stem Cell Aging: Implication to Lung Diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 486263. <https://doi.org/10.1155/2015/486263>

- Yang, Y. K., Ogando, C. R., Wang See, C., Chang, T. Y., & Barabino, G. A. (2018). Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Res Ther*, 9(1), 131. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0876-3>
- Ye, B., Weng, Y., Lin, S., Lin, J., Huang, Z., Huang, W., & Cai, X. (2020). 1,25(OH)(2)D(3) Strengthens the Vasculogenesis of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells from Rat Bone Marrow by Regulating the PI3K/AKT Pathway. *Drug Des Devel Ther*, 14, 1157-1167. <https://doi.org/10.2147/dddt.s222244>
- Yim, R. (2005). Administrative and research policies required to bring cellular therapies from the research laboratory to the patient's bedside. *Transfusion*, 45(4 Suppl), 144S-158S. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2005.00616.x>
- Yoon, D. S., Choi, Y., Jang, Y., Lee, M., Choi, W. J., Kim, S. H., & Lee, J. W. (2014). SIRT1 directly regulates SOX2 to maintain self-renewal and multipotency in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 32(12), 3219-3231. <https://doi.org/10.1002/stem.1811>
- Yoon, D. S., Choi, Y., & Lee, J. W. (2016). Cellular localization of NRF2 determines the self-renewal and osteogenic differentiation potential of human MSCs via the P53-SIRT1 axis. *Cell Death Dis*, 7(2), e2093. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.3>
- Yoon, J. K., Kang, M. L., Park, J. H., Lee, K. M., Shin, Y. M., Lee, J. W., Shin, Y. M., Lee, J. W., Kim, H. O., & Sung, H. J. (2018). Direct Control of Stem Cell Behavior Using Biomaterials and Genetic Factors. *Stem Cells Int*, 2018, 8642989. <https://doi.org/10.1155/2018/8642989>
- Yoshihara, M., Hayashizaki, Y., & Murakawa, Y. (2017). Genomic Instability of iPSCs: Challenges Towards Their Clinical Applications. *Stem Cell Rev Rep*, 13(1), 7-16. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9680-6>
- Yuan, H. F., Zhai, C., Yan, X. L., Zhao, D. D., Wang, J. X., Zeng, Q., Chen, L., Nan, X., He, L. J., Li, S. T., Yue, W., & Pei, X. T. (2012). SIRT1 is required for long-term growth of human mesenchymal stem cells. *J Mol Med (Berl)*, 90(4), 389-400. <https://doi.org/10.1007/s00109-011-0825-4>
- Zaim, M., Karaman, S., Cetin, G., & Isik, S. (2012). Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Ann Hematol*, 91(8), 1175-1186. <https://doi.org/10.1007/s00277-012-1438-x>
- Zainabadi, K. (2018). The variable role of SIRT1 in the maintenance and differentiation of mesenchymal stem cells. *Regen Med*, 13(3), 343-356. <https://doi.org/10.2217/rme-2017-0128>
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res Ther*, 10(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
- Zhang, F., Cui, J., Liu, X., Lv, B., Liu, X., Xie, Z., & Yu, B. (2015). Roles of microRNA-34a targeting SIRT1 in mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 6, 195. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0187-x>
- Zhang, Q., Li, Q., Zhu, J., Guo, H., Zhai, Q., Li, B., Jin, B., He, X., & Jin, F. (2019).. *PeerJ*, 7, e7023. <https://doi.org/10.7717/peerj.7023> Comparison of therapeutic effects of different mesenchymal stem cells on rheumatoid arthritis in mice
- Zhang, Y., Liu, S., Guo, W., Wang, M., Hao, C., Gao, S., Zhang, X., Li, X., Chen, M., Jing, X., Wang, Z., Peng, J., Lu, S., & Guo, Q. (2018). Human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells combined with an acellular cartilage extracellular matrix scaffold improve cartilage repair compared with microfracture in a caprine model. *Osteoarthritis Cartilage*, 26(7), 954-965. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2018.01.019>

- Zhang, Y., Ravikumar, M., Ling, L., Nurcombe, V., & Cool, S. M. (2021). Age-Related Changes in the Inflammatory Status of Human Mesenchymal Stem Cells: Implications for Cell Therapy. *Stem Cell Reports*, 16(4), 694-707. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.01.021>
- Zhang, Z. X., Guan, L. X., Zhang, K., Wang, S., Cao, P. C., Wang, Y. H., Wang, Z., & Dai, L. J. (2007). Cytogenetic analysis of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells passaged in vitro. *Cell Biol Int*, 31(6), 645-648. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2006.11.025>
- Zhao, J. J., Liu, X. C., Kong, F., Qi, T. G., Cheng, G. H., Wang, J., Sun, C., & Luan, Y. (2014). Bone marrow mesenchymal stem cells improve myocardial function in a swine model of acute myocardial infarction. *Mol Med Rep*, 10(3), 1448-1454. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2378>
- Zhao, L., Chen, S., Yang, P., Cao, H., & Li, L. (2019). The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: prevention and treatment of graft-versus-host disease. *Stem Cell Res Ther*, 10(1), 182. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1287-9>
- Zheng, G., Xie, Z. Y., Wang, P., Wu, Y. F., & Shen, H. Y. (2020). Recent advances of single-cell RNA sequencing technology in mesenchymal stem cell research. *World J Stem Cells*, 12(6), 438-447. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i6.438>
- Zhou, J., Wang, F., Ma, Y., & Wei, F. (2018). Vitamin D3 contributes to enhanced osteogenic differentiation of MSCs under oxidative stress condition via activating the endogenous antioxidant system. *Osteoporos Int*, 29(8), 1917-1926. <https://doi.org/10.1007/s00198-018-4547-0>
- Zhou, L., Chen, X., Liu, T., Gong, Y., Chen, S., Pan, G., Cui, W., Luo, Z. P., Pei, M., Yang, H., & He, F. (2015). Melatonin reverses H₂O₂-induced premature senescence in mesenchymal stem cells via the SIRT1-dependent pathway. *J Pineal Res*, 59(2), 190-205. <https://doi.org/10.1111/jpi.12250>
- Zhou, S., Glowacki, J., Kim, S. W., Hahne, J., Geng, S., Mueller, S. M., Shen, L., Bleiberg, I., & LeBoff, M. S. (2012). Clinical characteristics influence in vitro action of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) in human marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*, 27(9), 1992-2000. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1655>
- Zhou, S., Greenberger, J. S., Epperly, M. W., Goff, J. P., Adler, C., Leboff, M. S., & Glowacki, J. (2008). Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*, 7(3), 335-343. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00377.x>
- Zhou, S., LeBoff, M. S., & Glowacki, J. (2010). Vitamin D metabolism and action in human bone marrow stromal cells. *Endocrinology*, 151(1), 14-22. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0969>
- Zhou, T., Yuan, Z., Weng, J., Pei, D., Du, X., He, C., & Lai, P. (2021). Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *J Hematol Oncol*, 14(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13045-021-01037-x>
- Zhu, H., Guo, D., Li, K., Pedersen-White, J., Stallmann-Jorgensen, I. S., Huang, Y., Liu, P. K., & Dong, Y. (2012). Increased telomerase activity and vitamin D supplementation in overweight African Americans. *Int J Obes (Lond)*, 36(6), 805-809. <https://doi.org/10.1038/ijo.2011.197>
- Zupan, J., Strazar, K., Kocijan, R., Nau, T., Grillari, J., & Marolt Presen, D. (2021). Age-related alterations and senescence of mesenchymal stromal cells: Implications for

regenerative treatments of bones and joints. *Mech Ageing Dev*, 198, 111539.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2021.111539>

Internet stralice:

<https://www.clinicaltrials.gov>

<https://www.clinicaltrialsregister.eu/>

<https://health-products.canada.ca/dpd-bdpp/info.do?lang=en&code=87195>

<https://medsafe.govt.nz/regulatory/ProductDetail.asp?ID=15063>

https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m_30/view.do?seq=70956

https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m_30/view.do?seq=70957

<https://medsafe.govt.nz/regulatory/ProductDetail.asp?ID=15063>

<https://www.natureasia.com/en/nindia/article/10.1038/nindia.2016.61>

<https://www.pmda.go.jp/files/000231946.pdf>

<https://www.stemcell.com/how-to-count-cells-with-a-hemocytometer.html>

BIOGRAFIJA AUTORA

Ana M. Borojević (rođeno Stojanović) rođena je 05. januara 1989. godine u Šapcu. Nakon završene Gimnazije u Šapcu školske 2008/2009. godine upisala je studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija. Osnovne akademske studije završila je 2012. godine sa prosečnom ocenom 9,02. Iste godine upisala je master studije na Biološkom fakultetu, studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija, smer Biologija ćelija i tkiva. Master studije završila je 2013. godine odbranivši master rad pod nazovom „Strukturno remodeliranje subkutanog i visceralnih depoa belog masnog tkiva pacova u uslovima hiperinsulinemije“ sa ocenom 10, dok je prosečna ocena položenih ispita na master studijama iznosila 10,00. Eksperimentalni deo master rada realizovan je na Katedri za biologiju ćelija i tkiva Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Doktorske studije Ana (rođ. Stojanović) Borojević upisala je školske 2013/2014. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na modulu Biologija ćelija i tkiva, pri čemu je položila sve ispite predviđene programom sa prosečnom ocenom 9,91.

Od jula 2013. godine Ana M. (rođ. Stojanović) Borojević zaposlena je na Odeljenju za transplantaciju kostne srži sa laboratorijom za kriobiologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“.

Ana M. (rođ. Stojanović) Borojević je do sada imala dve usmene prezentacije na naučnim skupovima sa ciljem prezentacije iskustava i dotadašnjeg rada Laboratorije za kriobiologiju Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“. Jedno od usmenih predavanja pod naslovom „Istine i zablude o terapijskoj primeni krvi pupčanika“ održala je 2017. godine u sklopu Februarskog tečaja koji se svake godine održava na Institutu za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“. Prezentaciju pod nazivom „Collection, Processing and Preservation of Cord Blood - Single Center Experience“ održala je u sklopu Međunarodnog transfuziološkog kongresa 2018. godine.

Do sada je Ana M. (rođ. Stojanović) Borojević u saradnji sa drugim autorima objavila ukupno 6 bibliografskih jedinica. Od toga su 3 publikacije objavljene u celini: 2 rada u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21) i jedan radu u tematskom zborniku nacionalnog značaja (M45), dok su 3 saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u izvodu (od toga 2 u M34 i 1 u M64).

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Ана Боројевић _____

број индекса _____ Б3044/2013 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Карактеризација хуманих мезенхимских матичних ћелија пореклом из косне сржи и утицај витамина D3 на њихова функцијска својства“.

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

Потпис докторанда

У Београду, 05.05.2022.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Ана Боројевић

Број индекса Б3044/2013

Студијски програм Биологија

Наслов рада „Карактеризација хуманих мезенхимских матичних ћелија пореклом из косне сржи и утицај витамина D3 на њихова функцијска својства“.

Ментор: др Александра Јауковић

Потписани/а: Ана Боројевић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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
докторанда**

У Београду, 05.05.2022.

Изјава о коришћењу

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

„Карактеризација хуманих мезенхимских матичних ћелија пореклом из косне сржи и утицај витамина D3 на њихова функцијска својства“, која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- 3. Ауторство – некомерцијално – без прераде**
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 05.05.2022.

1. Ауторство - Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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 прераде. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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 прераде. Дозвољаваате 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. Дозвољаваате 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.