

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Сунчица М. Бјелица

**Испитивање модулације сенесценције  
индуковане хидроксиуреом на модел  
систему хуманих мезенхималних  
стромалних ћелија**

докторска дисертација

Београд, 2022.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE

Sunčica M. Bjelica

**Hydroxyurea modifies mesenchymal stromal  
cells functionality by senescence induction**

doctoral dissertation

Belgrade, 2022.

**Ментор:**

Проф.др Милица Радојковић, ванредни професор Медицинског факултета,  
Универзитет у Београду

**Коментор:**

Др сци. Хуан Ф. Сантибањез, научни сарадник, Институт за медицинска истраживања,  
Институт од националног значаја, Универзитет у Београду

**Чланови комисије:**

Проф.др Марија Пљеша-Ерцеговац, редовни професор Медицинског факултета,  
Универзитет у Београду

Проф.др Милош Марковић, ванредни професор Медицинског факултета,  
Универзитет у Београду

Проф.др Владимир Јуришић, редовни професор Факултета медицинских наука,  
Универзитет у Крагујевцу

Датум одбране докторске дисертације:

---

## Испитивање модулације сенесценције индуковане хидроксиуреом на модел систему хуманих мезенхималних стромалних ћелија

### Сажетак

**Увод:** Мезенхималне стромалне ћелије (МСЋ) су популација матичних ћелија које се одликују имунорегулаторним карактеристикама и диференцијационим потенцијалом као остеобластима, хондроцитима и адипоцитима. МСЋ се могу изоловати из скоро свих адултних ткива а најчешће се добијају из костне сржи. Познато је да ови прогенитори који се налазе у циркулацији и костној сржи могу имати улогу како у стимулацији тако и у инхибицији пролиферације малигних ћелија и индукције профибротичног фенотипа. На карактеристике МСЋ могу утицати бројни фактори попут инфламаторних цитокина, реактивних кисеоничних врста (енг. *reactive oxygen species*, ROS), азот монооксида (енг. *nitric oxide*, NO) и индуктора стреса који се повезују и са настанком ћелијског старења, сенесценције. Хидроксиуреа (ХУ) је антинеопластични агенс који инхибира рибонуклеотид-редуктазу и користи се у терапији хематолошких малигнитета. Познато је да ХУ има цитостатски ефекат и проузрокује ДНК оштећење које може водити у превремену сенесценцију, али утицај ХУ на карактеристике МСЋ и интеракцију са ћелијама у околини посредством узгредног, *bystander* ефекта није до сада проучаван.

Циљ ове студије био је да се анализира ефекат ХУ на карактеристике МСЋ, као што су морфологија, имунофенотип, диференцијациони капацитет, испољеност сенесцентног фенотипа, имуномодулаторне, профибротичне способности ових ћелија као и њихову улогу у туморогенези.

**Метод:** МСЋ су успешно изоловане из периферне крви и костне сржи здравих донора а потом су окарактерисане према критеријумима Комитета за МСЋ Међународног друштва за ћелијску терапију. Генотоксични ефекат, индукција сенесцентних и профибротичних маркера под утицајем ХУ су анализирани имунохистохемијском и имунофлуоресцентном методом. Продукција унутарћелијског ROS (енг. *reactive oxygen species*) и NO (енг. *nitric oxide*) је анализирана употребом флуоресцентних реагенаса DCF и DAF. Анализа ћелијског циклуса и пролиферације, као и детекција површинских антигена је извршена методом проточне цитометрије. Утицај ХУ на активацију mTOR, MAPK, JAK/STAT и TGFβ/SMAD сигналних путева процењен је методом имуноблота.

**Резултати:** МСЋ су окарактерисане према способности адхерирања за пластику, експресији мезенхималних уз одсуство хематопоетских површинских антигена и

диференцијационом потенцијалу ка остеобластима и адипоцитима. Као последица ДНК оштећења које је доказано експресијом  $\gamma$ H2A.X и детекцијом микронуклеуса, ХУ је имала благ цитостатски ефекат на МСЋ и проузроковала је застој ћелијског циклуса у S фази. Анализом ћелијске морфологије, сенесцентне  $\beta$ -галактозидазе и експресије p16<sup>INK4a</sup> утврђено је да ХУ доводи до сенесценције МСЋ. Сенесценција МСЋ је посредована повећањем унутарћелијског ROS, што је доказано инхибицијом сенесцентног фенотипа након третмана са антиоксидансима N-ацетил цистеином и апоцинином. Такође, ХУ-индуковане сенесцентне МСЋ (ХУ-С-МСЋ) су демонстрирале смањен остеогени и адипогени диференцијациони потенцијал уз непромењену експресију мезенхималним површинских антигена. За анализу ХУ-С-МСЋ *bystander* ефекта коришћене су JAK2-V617F позитивне хумане еритролеукемијске ћелије 92.1.7 (HEL) и BCR/ABL позитивне K562 ћелије. ХУ-С-МСЋ су инхибирале пролиферацију *bystander* HEL ћелија у кокултури посредством повећане продукције ROS и трансформишући фактор раста  $\beta$ 1 (енг. *transforming growth factor beta 1*, TGF- $\beta$ 1). ХУ-С-МСЋ нису имале утицај на пролиферацију *bystander* K562 ћелија. Третман ХУ је утицао и на имунорегулаторне карактеристике МСЋ тако што су ХУ-С-МСЋ смањиле пролиферацију Т лимфоцита уз очуван капацитет индукције моноцитних мијелоидних супресорних ћелија (М-МСуЋ). Модулирана имunosупресивна улога МСЋ и смањење диференцијационог потенцијала ХУ-С-МСЋ могу се објаснити смањеном активацијом mTOR и p38 MAPK. ХУ третиране МСЋ су показале и смањену сензибилност на TGF $\beta$ 1 посредовану индукцију  $\alpha$ SMA позитивних миофибробласта, услед смањење експресије TGF $\beta$ 1 рецептора и редуковане активације SMAD3 у ХУ-С-МСЋ.

**Закључак:** Добијени подаци наглашавају значај ХУ у индукцији превремене сенесценције МСЋ. ХУ-С-МСЋ имају измењен диференцијациони потенцијал и имунорегулаторну функцију. Такође ове сенесцентне ћелије путем продукције ROS и TGF $\beta$ 1 инхибирају пролиферацију туморских ћелија, а испољавају и смањену осетљивост на профибротични ефекат TGF $\beta$ 1 и као такве представљају потенцијално средство за терапију хематолошких малигнитета.

**Кључне речи:** Мезенхималне стромалне ћелије периферне крви; мезенхималне стромалне ћелије костне сржи; хидроксиуреа; сенесценција; имунолошка супресија; *bystander* ефекат; реактивне кисеоничне врсте; TGF $\beta$ 1

**Научна област:** медицина

**Ужа научна област:** молекуларна медицина

UDK број \_\_\_\_\_

## **Hydroxyurea modifies mesenchymal stromal cells functionality by senescence induction**

### **Summary**

**Introduction:** Mesenchymal stromal cells (MSC) are the population of stem cells with immunoregulatory features and significant differentiation potential towards osteoblast, chondrocytes and adipocytes. MSC have been isolated from abundant adult tissues, most frequently from bone marrow. As a circulating and the bone marrow microenvironment progenitors, those cells have a dual role as a promoters or inhibitors of both, malignant cell proliferation and profibrotic phenotype induction. Variation of MSC characteristics are associated with numerous factors such as inflammatory cytokines, reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO) and stress inducers that could also induce senescence. Hydroxyurea (HU) is an antineoplastic agent that functions as the ribonucleotide reductase inhibitor and is mainly used in the treatment of hematological malignancies. As a DNA replication stress inducer HU may trigger a premature senescence-like cell phenotype, though its influence on MSC characteristics and repercussion on bystander cell proliferation has not elucidated yet.

The aim of this study was to estimate the effect of HU on MSC morphology, immunophenotype, multilineage differentiation, senescence phenotype, immunomodulatory and profibrotic activity as well as the roll of the HU treated MSC in tumorigenesis.

**Methods:** MSC were successfully isolated from bone marrow and peripheral blood healthy donors. They were characterised in the presence and absence of HU, by criteria from MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy. Genotoxic effect of HU, as well as the expression of senescence and profibrotic markers, were estimated by immunohistochemistry and immunofluorescence. Intracellular ROS and NO production was determined by fluorogenic molecules DCF and DAF. Cell cycle analysis, cell proliferation and surface markers detection was performed by flow cytometry. Influence of HU on activation of mTOR, MAPK, JAK/STAT and TGF $\beta$ /SMAD were determined by immunoblotting methods.

**Results:** MSC were characterised by their plastic surface adhesion, expression of mesenchymal cell surface markers, lack of the expression of hematopoietic markers and the capacity to differentiate towards osteoblast and adipocytes. Examining the HU effect on MSC, we found that HU has the mild cytostatic effect and provokes cell cycle arrest in the S phase as the consequence of the DNA damage response evidenced by expression of  $\gamma$ H2A.X and micronuclei. The analyses of cell morphology, senescence-associated  $\beta$ -galactosidase levels

and p16<sup>INK4a</sup> expression revealed that HU cause MSC senescence. Senescence of MSC is mediated by increased ROS levels, as demonstrated by the inhibition of senescence indicators in the presence of antioxidants N-acetylcysteine and apocynin. Moreover, HU-induced senescent MSC, displayed reduced osteogenic and adipogenic differentiation potential while they did not exhibit altered expression of mesenchymal markers. To estimate the HU-induced bystander effect, we used the JAK2-V617F positive human erythroleukemia 92.1.7 (HEL) cells and BCR/ABL positive K562 cells. HU-induced senescent MSC (HU-S-MSC) strongly inhibited bystander HEL cell proliferation in co-culture, and this effect was mediated by ROS and transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 production. On the other hand, HU-S-MSC did not influence bystander K562 proliferation. Immunoregulatory function of MSC is also modulated by HU treatment. Interestingly, HU increased MSC ability to suppress T-cell proliferation while did not alter the capacity of MSC to induce monocytic myeloid-derived suppressor cells (M-MDSC). Improved immunomodulation activities and reduced differentiation capacity of MSC under HU treatment could be explained by down-regulation of mTOR and p38 MAPK signalling. Finally, HU-S-MSC demonstrated reduced sensibility to TGF $\beta$ 1 dependent induction of  $\alpha$ SMA positive myofibroblast, due to HU-S-MSC reduced expression of TGF $\beta$ 1 receptors and down-regulation of SMAD3.

**Conclusions:** The results obtained in this study suggest that HU by inducing premature senescence-like phenotype of MSC influence cellular differentiation and immunomodulatory functions. Moreover, senescence MSC displayed the ROS and TGF $\beta$ 1-dependent inhibition of bystander HEL cells proliferation and a lack of sensibility to TGF $\beta$ 1 profibrotic effect. Finally, our study emphasized the role of the HU-S-MSC senescence as a potential adjuvant in hematological malignancy therapies.

**Keywords:** Peripheral blood mesenchymal stem cells; bone marrow mesenchymal stem cells; hydroxyurea; senescence; immunosuppression; bystander effects; reactive oxygen species; TGF $\beta$ 1

**Research area:** medicine

**Special field:** molecular medicine

UDK number: \_\_\_\_\_



*Мојим родитељима и брату*

*Љиљи, Милету и Борису*

## ЗАХВАЛНИЦА

Велику захвалност дугујем мојој професорки др Милици Радојковић која ме је заинтересовала за клинички и научни рад у области хематологије, која је увек имала стрпљења да ме саслуша и несебично ми указивала на правилности и неправилности у мом истраживачком раду. Хвала на свим саветима и труду да овај рад угледа светлост дана.

Свом научном учитељу др Хуану Ф. Сантибањезу дугујем највећу захвалност за успешно изведене експерименте у оквиру ове дисертације. Хвала на посвећености, стрпљењу, идејама и сугестијама у свим фазама израде ове тезе. Др Хуан Ф. Сантибањез је фантастичан учитељ и човек, а такође је и високо признати научник ван наше земље, те је рад са њим била посебна привилегија.

Велику захвалност дугујем др Владану Чокићу на пруженој прилици да се придружим његовом тиму и на указаном поверењу и подреку да се бавим овом темом.

Хвала члановима комисије проф. др Марији Пљеша-Ерцеговац, проф. др Милошу Марковићу и проф. др Владимиру Јуришићу, на конкретним и корисним саветима који су ми помогли у изради коначне верзије ове дисертације.

Мом супругу, колеги и животном сапутнику др Слободану Капору дугујем огромну захвалност за помоћ у лабораторијском раду. Хвала на љубави, разумевању и подршци без које би израда овог рада била немогућа.

Хвала мојим пријатељицама, колегиницама и научним сапутницама др Милици Вукотић и др Сањи Момчиловић на помоћи, саветима, вишестепеним корекцијама и подршци при изради ове дисертације.

На помоћи у експерименталном раду и размени мишљења захваљујем и: др Маријани Ковачић, др Оливери Митровић-Ајтић, др Драгослави Ђикић, др Милошу Диклићу, др Тијани Суботички и др Славку Мојсиловићу као и свим осталим колегама са Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду. Хвала и свим колегама из КБЦ „Др Драгиша Мишовић-Дедиње“ на разумевању и саветима при изради ове дисертације.

Својим пријатељицама Мирјани, Марији, Милици, Ољи, члановима породице, бакама Ружи и Коси, Мики, Наши, Симкету, Јаци, Андреи, Нини, Вањи, Данету, Милојки, Милени, Горану и свим осталима хвала на љубави, разговорима и подршци ван лабораторије.

Највећу захвалност дугујем мојим родитељима, Милету и Љиљани и свом брату Борису, који су ме бодрили и пружали ми незамењиву подршку и којима посвећујем ову докторску дисертацију. Хвала на љубави, безграничном стрпљењу све ове године и доприносу мојој истрајности у научно-истраживачком раду.

## САДРЖАЈ

1. УВОД.....	1
1.1. ОПШТЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА.....	1
1.2. ТИПОВИ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА.....	2
1.2.1. Хематопотске матичне ћелије.....	4
1.2.2. Мезенхималне стромалне ћелије .....	5
1.2.2.1. Извори и изоловање мезенхималних стромалних ћелија .....	6
1.2.2.2. Карактеризација мезенхималних стромалних ћелија .....	8
1.2.2.3. Имуномодулаторна улога мезенхималних стромалних ћелија.....	9
1.2.2.4. Улога мезенхималних стромалних ћелија у туморогенези.....	12
1.2.2.5. Улога мезенхималних стромалних ћелија у фибрози.....	14
1.3. ХИДРОКСИУРЕА .....	18
1.3.1. Механизам деловања.....	18
1.3.2. Утицај хидроксиурее на ћелијски циклус.....	19
1.3.3. Примена и токсичност хидроксиурее.....	20
1.4. СЕНЕСЦЕНЦИЈА .....	22
1.4.1. Фактори који доводе до сенесценције.....	23
1.4.2. Биомаркери сенесцентних ћелија .....	25
1.4.2.1. Интраћелијски маркери сенесценције.....	25
1.4.2.2. Екстраћелијски маркери сенесценције .....	26
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА .....	29
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ .....	30
3.1. МАТЕРИЈАЛ .....	30
3.1.1. Биолошки материјал.....	30
3.1.1.1. Ћелијске линије .....	30
3.2. МЕТОДЕ.....	34
3.2.1. Изолација моноклеарних ћелија .....	34
3.2.2. Изолација мезенхималних стромалних ћелија периферне крви .....	34
3.2.3. Изолација мезенхималних стромалних ћелија костне сржи .....	35
3.2.4. Карактеризација мезенхималних стромалних ћелија .....	36
3.2.4.1. Имунофенотипизација мезенхималних стромалних ћелија.....	36

3.2.4.2.	Диференцијација мезенхималних стромалних ћелија .....	36
3.2.5.	Анализа вијабилности ћелија МТТ тестом .....	37
3.2.5.1.	Вијабилност HEL ћелија у кокултури са мезенхималним стромалним ћелијама ..	37
3.2.6.	Анализа хидроксиуреом индуковане сенесценције мезенхималних стромалних ћелија .....	38
3.2.6.1.	Промене у ћелијској морфологији након третмана хидроксиуреом .....	39
3.2.6.2.	Активност ензима $\beta$ -галактозидазе .....	39
3.2.6.3.	Анализа експресије инхибитора циклин зависних киназа (p16, p21) и маркера ДНК оштећења ( $\gamma$ H2A.X).....	40
3.2.7.	Анализа ћелијског циклуса и апоптозе .....	40
3.2.7.1.	Бромо-деоксиуридин бојење .....	41
3.2.8.	Анализа експресије протеина <i>Western blot</i> методом .....	42
3.2.8.1.	Изолација протеина .....	42
3.2.8.2.	Електрофореза и трансфер протеина на мембрану.....	42
3.2.8.3.	Детекција протеина помоћу специфичних антитела .....	43
3.2.9.	ELISA TGF- $\beta$ 1 .....	43
3.2.10.	Анализа генске експресије на нивоу информационе РНК.....	44
3.2.10.1.	Реверзна транскрипција и реакција ланчане полимеризације .....	44
3.2.10.2.	РНК изолација .....	44
3.2.10.3.	Реверзна транскрипција .....	45
3.2.10.4.	RT-PCR.....	45
3.2.10.5.	Раздвајање продуката електрофорезом.....	46
3.2.11.	Детекција интраћелијског ROS .....	46
3.2.12.	Детекција интраћелијског NO .....	46
3.2.13.	Анализа ћелијске адхезије .....	46
3.2.14.	Кокултура мезенхималних стромалних ћелија и HEL ћелија за анализу <i>bystander</i> ефекта .....	47
3.2.14.1.	Анализа пролиферације HEL ћелија у кокултури .....	48
3.2.14.2.	Анализа ћелијског циклуса HEL ћелија у кокултури.....	49
3.2.15.	Имуномодулаторни утицај хидроксиуреом индукованих сенесцентних мезенхималних стромалних ћелија .....	49
3.2.15.1.	Пролиферација Т лимфоцита у кокултури .....	49
3.2.15.2.	<i>In vitro</i> индукција мијелоидних супресорних ћелија .....	50
3.2.16.	Анализа фиброзе .....	50
3.2.17.	Статистичка анализа.....	50

4. РЕЗУЛТАТИ .....	52
4.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ МЕЗЕНХИМАЛНИХ СТРОМАЛНИХ ЋЕЛИЈА .....	52
4.1.1. Морфологија мезенхималних стромалних ћелија и способност адхерирања за пластику	52
4.1.2. Диференцијациони потенцијал мезенхималних стромалних ћелија .....	53
4.1.3. Имунофенотипизација .....	54
4.2. ЕФЕКТИ И МЕХАНИЗМИ ДЕЛОВАЊА ХИДРОКСИУРЕЕ НА МЕЗЕНХИМАЛНЕ СТРОМАЛНЕ ЋЕЛИЈЕ .....	55
4.2.1. Утицај хидроксиуреа на морфолошке карактеристике мезенхималних стромалних ћелија .....	55
4.2.2. Генотоксични ефекат хидроксиуреа на мезенхималне стромалне ћелије .....	55
4.2.3. Утицај хидроксиуреа на вијабилност мезенхималних стромалних ћелија .....	56
4.2.4. Утицај хидроксиуреа на ћелијски циклус и апоптозу мезенхималних стромалних ћелија .....	58
4.2.5. Анализа хидроксиуреом индуковане сенесценције мезенхималних стромалних ћелија .....	61
4.2.6. Молекуларни механизми укључени у хидроксиуреом индуковану сенесценцију мезенхималних стромалних ћелија .....	65
4.2.7. Улога ROS у хидроксиуреа индукованој сенесценцији мезенхималних стромалних ћелија .....	68
4.3. УТИЦАЈ ХИДРОКСИУРЕЕ НА ФУНКЦИОНАЛНА СВОЈСТВА МЕЗЕНХИМАЛНИХ СТРОМАЛНИХ ЋЕЛИЈА .....	72
4.3.1. Утицај хидроксиуреа на диференцијацију мезенхималних стромалних ћелија .....	73
4.3.2. Утицај хидроксиуреом индуковане сенесценције мезенхималних стромалних ћелија на пролиферацију туморских ћелија .....	74
4.3.2.1. Ефекат хидроксиуреом индуковане сенесценције мезенхималних стромалних ћелија на пролиферацију HEL ћелија .....	75
4.3.2.1.1. Улога ROS и TGF $\beta$ у инхибицији пролиферације HEL ћелија помоћу хидроксиуреом индукованих сенесцентних мезенхималних стромалних ћелија .....	77
4.3.2.1.2. Улога NO у инхибицији пролиферације HEL ћелија посредованој хидроксиуреом индукованим сенесцентним мезенхималним стромалним ћелијама .....	83
4.3.2.1.3. Повећана адхезија HEL ћелија на хидроксиуреа индуковане сенесцентне мезенхималне стромалне ћелије .....	84
4.3.2.2. Ефекат хидроксиуреом индукованих сенесцентних мезенхималних стромалних ћелија на пролиферацију K562 ћелија .....	85
4.3.3. Имуномодулаторни ефекат хидроксиуреом индукованих сенесцентних мезенхималних стромалних ћелија .....	87
4.3.3.1. Инхибиција пролиферације Т лимфоцита посредована хидроксиуреом индукованим сенесцентним мезенхималним стромалним ћелијама .....	87

4.3.3.2. Индукција МСуТ посредована хидроксиуреом индукованим сенесцентним мезенхималним стромалним ћелијама .....	88
4.3.4. Ефекат хидроксиуреом индукованих сенесцентних мезенхималних стромалних ћелија на испољавање профибротичног фенотипа .....	90
5. ДИСКУСИЈА.....	93
6. ЗАКЉУЧЦИ .....	111
7. ЛИТЕРАТУРА.....	113

# 1. УВОД

## 1.1. ОПШТЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА

Матичне ћелије се дефинишу као неспецијализоване ћелије са способношћу самообнављања, неограничених деоба и потенцијалом за диференцијацију у различите, специјализоване ћелије организма (Łos и сар., 2019). Развој човека почиње од једне примитивне, матичне ћелије која се назива зигот. Оплођена јајна ћелија, зигот, се карактерише тотипотенцијом (лат. *totipotencia*, свемогућност) која се дефинише као јединствена способност поделе и диференцијације ка свим специјализованим ћелијама одраслог организма (Condic и сар., 2014; Ratajczak и сар., 2019). Деобом зигота настају матичне ћелије које су плурипотентне односно, имају способност диференцирања у ћелије сва три клицина листа, ектодерма, ендодерма и мезодерма, али не могу дати ћелије екстраембрионалних ткива попут плаценте. Све остале матичне ћелије фетуса и адултног организма, способне за органогенезу и постнаталну обнову ткива, су мултипотентне. Мултипотентност настаје додатним ограничавањем судбине матичних ћелија, које су надаље способне за регенерацију само оних ткива чији су саставни део (Mitalipov S и сар., 2009). У организму човека постоје још и унипотентне ћелије, као што су епидермалне матичне ћелије, значајне у регенерацији и репарацији епидермиса, са могућношћу диференцијације у само један ћелијски тип (Ratajczak и сар., 2019). Мултипотентне и унипотентне ћелије се разликују од плурипотентних матичних ћелија по тиме што њихова репликаторна способност није бесконачна, него је лимитирана и оне су означене као прогениторне ћелије (Lawrence и сар., 2013).

Способност диференцијације, је значајна карактеристика матичних ћелија како током периода развића, тако и за обнављање и регенерацију одраслог организма. (Müller и сар., 2014). Студије на инсекту из породице *Drosophila* су показале да се обнова ткива одвија путем асиметричних деоба којима се ћелијски садржај распоређује неједнако у кћерке ћелије. Притом, настају једна недиферентована ћелија са вишком матичних фактора и друга ћелија у којој се покреће програм диферентовања ка одређеној ћелијској линији. На овај начин, обнавља се популација матичних ћелија уз одржавање ткивне

хомеостазе (Fuchsa и сар., 2013; Sada и сар., 2013). Динамика овог процеса је регулисана на генском нивоу. У сваком периоду развоја активан је одређени сет регулаторних гена, иако се од адултне матичне ћелије до функционалне ћелије укупна количина генетичког материјала не мења. Фенотип диферентованих ћелија је регулисан унутрашњим ћелијским факторима и факторима средине који утичу на регулацију генске експресије (Ralston и сар., 2008).

Још једна важна карактеристика матичних ћелија је способност самообнове. Иако се матичне ћелије делимично самообнављају и асиметричним деобама, симетричне деобе су кључне у околностима које захтевају повећање броја ћелија, као што су период развоја или повреда ткива. Симетричним деобама родитељска ћелија се дели на две идентичне кћерке ћелије у процесу који је строго контролисан у физиолошким условима (Fuchsa и сар., 2013; Sada и сар., 2013). Неколико сигналних путева, попут Notch, Wnt, Hedgehog и Polycomb, имају значајну улогу у пролиферацији и одржавању недиферентованог стања путем симетричних деоба (Molofsky и сар., 2004).

Равнотежа и фина регулација процеса деобе и диференцијације су кључни за правилно функционисање матичних ћелија. Студије на интестиналним епителним ћелијама сведоче о њиховој флексибилности и динамичној природи. Приликом оштећења ткива узрокованим хемијским агенсима или радијацијом, ове ћелије активирају различите регулаторне механизме који доводе до симетричне или асиметричне самообнове, дедиференцијације или диференцијације ка одређеној ћелијској линији (Sada и сар., 2013). Хомеостаза матичних ћелија зависи од њеног окружења, такозване нише, коју чине стромалне и епителоидне ћелије, као и фактори раста и цитокини продуковани од стране суседних ћелија (He и сар., 2014; Sada и сар., 2013).

## **1.2. ТИПОВИ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА**

Једна од класификација матичних ћелија заснива се на њиховом пореклу. Разликујемо ембрионалне матичне ћелије, које се могу изоловати у стадијуму бластоцисте и адултне матичне ћелије, које се могу наћи у скоро свим органима одраслог организма (Łos и сар., 2019). Још један тип су индуковане плурипотентне матичне ћелије, које настају репрограмирањем адултних ћелија, а имају карактеристике ембрионалних матичних ћелија (Gutierrez-Aranda и сар., 2010).



Ембрионалне матичне ћелије поседују бесконачан потенцијал самообнове који је омогућен јединственим механизмом регулације ћелијског циклуса и контролом експресије гена значајних за плурипотенцију. Ћелијски циклус се одликује кратком  $G_1$  фазом услед смањене активности Rb (енг. *retinoblastoma*) протеина (Burdon и сар., 2002) и конститутивном активацијом циклин А/циклин Е- зависних киназа које омогућавају брзу транзицију из  $G_1$  у  $S$  фазу (Savatier и сар., 1996). Транскрипциони фактори Oct4, Sox2 и Nanog имају пресудну улогу у инхибицији гена за диференцијацију док стимулишу експресију гена значајних за плурипотентност (Niwa и сар., 2000; Masui и сар., 2007). Због свог пролиферативног капацитета и способности диференцијације у било који тип ћелија, ембрионалне ћелије имају потенцијалну *in vitro* примену у испитивању цитотоксичности лекова, а такође могу се користити за развој модела генетичких поремећаја попут цистичне фиброзе. Ембрионалне матичне ћелије које се користе у истраживачке сврхе, добијају се од ембриона који су планирани за одбацивање, односно нису планирани за коришћење у лечењу стерилитета након *in vitro* фертилизације (Bremer и сар., 2004; Damdimoroulou и сар., 2016). Клиничке студије које оцењују примену ових ћелија у поремећајима попут Паркинсонове болести, повреде кичмене мождине, дијабетеса тип 1, тешке срчане инсуфиције имају обећавајуће резултате (Golchin и сар., 2020). У клиничкој примени ових ћелија, могућност настанка тумора мора бити сведена на минимум, те је неопходно да ове ћелије буду терминално диференциране а све евентуално преостале плурипотентне ћелије морају бити уклоњене (Damdimoroulou и сар., 2016).

Етичка оправданост примене ембрионалних матичних ћелија је предмет бројних контроверзи које би могле бити превазиђене применом индукованих плурипотентних матичних ћелија. Јапански научници Кјото Универзитета 2006. године су идентификовали услове у којима се специјализоване, диферентоване ћелије ткива, могу генетички репрограмирамирати до матичних ћелија. Ова дедифернцијација је омогућена увођењем неколико гена, носиоца есенцијалних карактеристика ембрионалних матичних ћелија, попут Oct3/4, Sox2 и с-Мус, у адултне диферентоване ћелије везивног ткива чиме су добијене индуковане плурипотентне матичне ћелије (Takahashi и сар., 2006). Поред значаја у фундаменталним истраживањима, ове ћелије имају потенцијалну примену у регенеративној медицини, а посебно је значајно да су ткива добијена на овај начин аутолога, тј. потичу од реципијента, што значајно смањује могућност имунског одговора на трансплантовано ткиво као и реакцију

трансплантираног ткива на домаћина (енг. *graft versus host disease, GVHD*). Међутим, као и у случају ембрионалних матичних ћелија и код клиничке примене индукованих плурипотентних ћелија постоји ризик од развитка канцера (Afify и сар., 2020).

Адултне матичне ћелије су мултипотентне, имају способност самообнове и представљају значајан ресурс за обнову ткива из ког потичу. Ове ћелије могу дати више различитих ћелија једног ткива и њихова улога је да чувају интегритет ткива међајући оштећене ћелије (Atala и сар., 2008; Caglayan и сар., 2019; Łos и сар., 2019). Адултне матичне ћелије се могу наћи у готово свим ткивима одраслог организма као што су костна срж, мозак, срце, јетра, гастроинтестинални тракт (Caglayan и сар., 2019). Многе од ових ћелија имају способност диференцијације у ћелије других ткива, а не само оних из којих потичу. Тако се на пример матичне ћелије костне сржи могу диференцирати у епителне ћелије јетре, плућа или коже при промени локације или услова гајења ових ћелија (Krause и сар 2001; Herzog и сар 2003). Ова карактеристика адултних матичних ћелија се назива пластичност и још увек нема довољно доказа да се ради о физиолошком феномену. Такође, њихов капацитет за диференцијацију и регенеративни потенцијал се смањује са старењем организма. Акумулација токсичних метаболита, реактивних врста кисеоника (енг. *reactive oxygen species, ROS*), ДНК оштећења као и митохондријална дисфункција су процеси који се повезују са старењем и доводе до поремећаја активности матичних ћелија и њихове нише (Ahmed и сар., 2017; Oh и сар., 2014).

### **1.2.1. Хематопотске матичне ћелије**

Адултне матичне ћелије које су најчешће примењиване, а уједно и најбоље истражене су хематопотске матичне ћелије (ХМЋ) (Caglayan и сар., 2019). Главни извори ових ћелија су фетална ткива, пупчана врпца, костна срж а у малом броју оне се налазе и у крвотоку (Haspel и сар., 2008). Зреле, диферентоване ћелије крви (еритроцити, тромбоцити и леукоцити) имају кратак животни век и неопходна је њихова стална обнова ради нормалног функционисања организма. Процес у којем од ХМЋ преко низа прогениторних ћелија настају зреле ћелије крви се назива хематопоеза (Ivanova и сар., 2002; Novershtern и сар., 2011). ХМЋ су плурипотентне ћелије које помоћу асиметричних деоба одржавају равнотежу између диференцијације и самообнове. Њихови потомци, мијелоидни и лимфоидни прогенитори се диференцирају ка зрелим крвним ћелијама али не поседују способност самообнове (Morrison и сар., 2006; Kearney

и сар., 1994). Проллиферативни статус и диференцијација ХМЋ зависе од микросредине костне сржи коју чине остеобласти, остеокласти, ендотелне, и мезенхималне ћелије, као и од продукције хематопоеетских фактора раста (Moore и сар., 2014). У костној сржи популација ХМЋ је јако мала, па њихова правилна идентификација и изолација може бити изазов. У ту сврху се могу користити есеји којима се *in vitro* потвђује њихов пролиферативни потенцијал као што је *colony-forming assay* или се идентификују њихови површински маркери. Најзначајнији површински маркери ХМЋ, који се користе за њихову изолацију су CD34, CD90, CD45, c-Kit и CD49f, иако њихова експресија може да варира у зависности од развојног стадијума (Caglayan и сар., 2019; Jagannathan-Bogdan и сар., 2013). Због својих карактеристика, ове ћелије се већ три деценије користе у терапији малигних и аутоимунских болести. У ту сврху, ћелије се могу прикупљати из периферне крви након мобилизације помоћу цитокина као што је фактор стимулације гранулоцитних колонија (енг. *granulocyte colony-stimulating factor*, G-CSF), или се могу добијати директно из костне сржи (Korbling и сар., 1986; Kobbe и сар., 2002). Аутолога трансплантација ХМЋ омогућава обнову хематопоезе након цитотоксичних третмана у лечењу мултиплог мијелома, нон-Хочкин и Хочкин лимфома, карцинома плућа или дојке. С друге стране, алогена трансплантација представља потенцијални куративни третман у терапији акутних и хроничних мијелоидних леукемија, мијелодиспластичних синдрома и апластичних анемија, а истражује се и њихова терапијска примена у лечењу нехематолошких обољења, попут инфаркта миокарда (Steidel и сар., 2003; Orlic и сар., 2001).

### **1.2.2. Мезенхималне стромалне ћелије**

Још један значајан тип адултних матичних ћелија су мезенхималне стромалне ћелије (МСЋ), мултипотентне ћелије, које су због своје доступности, способност диференцијације и имуномодулаторних карактеристика предмет бројних истраживања. МСЋ су мултипотентне ћелије мезодермалног порекла које имају способност диференцијације у адипоците, хондроците и остеоците (Wang и сар., 2014). Ове ћелије су први пут изоловане из аспирата костне сржи миша, а на основу своје карактеристике да адхерирају за пластику, идентификоване су као ћелије морфолошки сличне фибробластима - CFU-F (енг. *Colony forming unit fibroblast*). Њихова способност

диференцијације први пут је описана 1992.године (Haynesworth и сар., 1992) док су три године касније ове ћелије први пут убризгане болесницима са хематолошким малигнитетима у сврху лечења (Lazarus и сар., 1995). У бројним каснијим истраживањима ове ћелије се називају мезенхималне матичне ћелије услед великог диференцијационог потенцијала ка мијелобластима, остеобластима, адипоцитима, глатким мишићним ћелијама и хондроцитима (Bianco и сар., 2001; Jaiswal и сар., 2000). Комитет за мезенхималне матичне ћелије Међународног друштва за ћелијску терапију (Dominici и сар., 2006) је предложио критеријуме за идентификацију ових ћелија а то су адхерентност за пластику, експресија антигена карактеристичних за стромалне ћелије и способност мултипотентне диференцијације. Препорука Комитета је и да се овако изоловане ћелије називају мезенхималне стромалне ћелије а да се из њиховог наслова искључи термин „матичне“ јер нема довољно доказа да хетерогена популација ћелија, изолована на овај начин, задржава све карактеристике матичних ћелија.

#### **1.2.2.1. Извори и изоловање мезенхималних стромалних ћелија**

Иако МСЋ могу бити изоловане из скоро сваког хуманог ткива (Слика 1.), постоје практична ограничења њихове употребе која се односе на инвазивност процедуре добијања ткива за изолацију. Такође, МСЋ изоловане из различитих ткива показују другачији диференцијациони потенцијал, а разликују се и по профилу експримираних гена (Wagner и сар., 2005). МСЋ костне сржи (КС МСЋ), први пут описане од стране *Friedenstein*-а и сар., сматрају се најистраженијим типом МСЋ и као такве представљају златни стандард за МСЋ (Friedenstein и сар., 1976).

КС-МСЋ се изолују из аспирата костне сржи. Костна срж је средина богата различитим ћелијским типовима од којих су свега 0,01-0,001% МСЋ а принос ћелија и капацитет за диференцијацију се смањују са старењем (Berebichez-Fridman и сар., 2017; Cheng и сар., 2014). КС МСЋ се изолују из аспирата костне сржи на основу своје карактеристике да адхерирају за пластику. Такође, ове ћелије се могу изоловати и након центрифугирања на основу градијента густине али се сматра да се на овај начин ћелијска популација МСЋ не прочишћава у потпуности од хематопоетских ћелија (Pittenger и сар., 1999). Најпрецизнији метод добијања чисте популације КС-МСЋ је изолација помоћу специфичних површинских ћелијских маркера применом моноклонских антитела и ћелијског сортирања (Gronthos и сар., 2007).

Инвазивност процедуре аспирације костне сржи довела је до трагања за алтернативним изворима МСЋ. МСЋ периферне крви (ПК МСЋ) се изолују из популације моноклеарних ћелија (МНЋ), на основу градијента густине а након центрифугирања са одговарајућим медијумом. Иако се ове ћелије изолују из периферне крви, сматра се да је њихов принос низак, а да се повећава након повреде ткива када се МСЋ мобилишу из костне сржи да би помогле у репарацији ткива (Roufosse и сар., 2004). Имитирајући овај принцип, истраживачи су успели да повећају популацију ПК МСЋ хиперстимулацијом костне сржи помоћу G-CSF. На овај начин се не повећава мобилност искључиво МСЋ, него и ХМЋ и других прогенитора (Berebichez-Fridman и сар., 2017; Yang и сар., 1998).

Главна предност коришћења адипозног ткива као извора МСЋ је доступност ткива. Овај биолошки материјал се најчешће добија липосукцијом, липопластиком или липектомијом, процедурама у којима је масно ткиво нежељени продукт. МСЋ масног ткива се добијају ензимском дигестијом ткива помоћу ензима колагеназа, а потом центрифугирањем и испирањем (Kuhbier и сар., 2010).

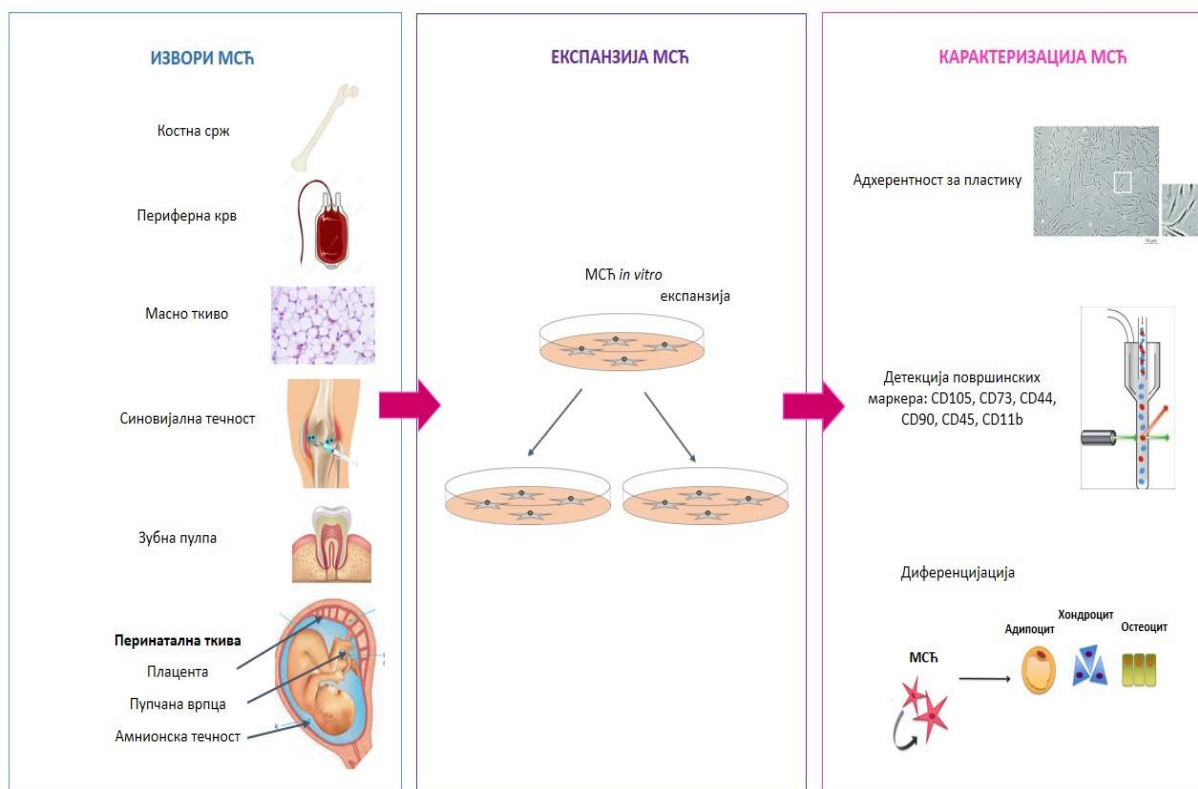
Поред адултних ткива, МСЋ могу бити изоловане и из перинаталних ткива попут плаценте, амнионске течности, пупчане врпце, Вартонове слузи и крви пупчаника. Предност добијања МСЋ на овај начин је велики принос ћелија, а с обзиром да се перинатална ткива након порођаја најчешће одбацују, метод се може сматрати неинвазивним (Hass и сар., 2011). Друга ткива из којих МСЋ могу бити изоловане су дентална ткива, кожа, мишићи, ендометријум, синовија, синовијална течност и зглобна хрскавица (Berebichez-Fridman и сар., 2017).

У костној сржи, као и у другим ткивима МСЋ постоје у малом броју (Carlan и сар., 2009), па је за клиничку примену, као и за примену у фундаменталном истраживању, неопходна *in vitro* експанзија ових ћелија. Пролиферација у *ex vivo* условима мења фенотипске карактеристике, па је у експериментима важно користити МСЋ током што ранијих пасажа. Овај проблем може бити превазиђен коришћењем ћелијских линија. У истраживању Богдановића и сар., су коришћене незреле мијелоидне ћелије са карактеристикама матичних ћелија изоловане из костне сржи пацијента са мијелодисплазним синдромом. Ове ћелије су означене као PC-MDS и показују позитивну експресију маркера CD13, CD15, CD30, CD33 и CD45 (Bogdanović, Jurišić и сар., 2007; Bogdanović, Јакимов и сар., 2007).

### 1.2.2.2. Карактеризација мезенхималних стромалних ћелија

С обзиром на то да не постоји специфичан антиген за идентификацију МСЋ, неколико површинских антигена се користи за разликовање ових од осталих ћелија. Ова популација ћелија је позитивна на стромалне антигене: CD73 (екто-5'-нуклеотидаза), CD90 (гликофосфатидилинозитол), CD105 (ендоглин), CD44 (рецептор хијалуронске киселине) и CD166 (леукоцитни адхезивни молекул), а негативна на CD45 (заједнички леукоцитни антиген), CD11b (интегрин), HLA-DR, CD34 (маркер хематопоеетских ћелија), CD19 и CD79 $\alpha$  (маркери Б лимфоцита) (Friedenstein и сар., 1976; Pittenger и сар., 1999; Dominici и сар., 2006). Према критеријумима Комитета (Dominici и сар., 2006) МСЋ је популација са >95% ћелија позитивних на: CD73, CD90 и CD105 и више од >95% негативних на: CD45, CD11b, HLA-DR, CD34, CD19 и CD79 $\alpha$ . Овај панел маркера није специфичан за МСЋ, може бити транзиторно експримиран и на другим популацијама и на њега утичу *in vitro* услови гајења, па се мултипотентност ових ћелија мора доказати и тестовима који потврђују њихов капацитет диференцијације (Whitney и сар., 2009) (Слика 1.).

Многе истраживачке групе су доказале диференцијацију МСЋ ка остеогеној, хондрогеној и адипогеној линији (Bianco и сар., 2001). У посебним условима гајења, ове ћелије се могу диференцирати и у хепатоците (Bandi и сар., 2019), панкреатоците (Manarh и сар., 2019), кардиомиоците (Golpanian и сар., 2016), ендотелне и епителне ћелије (Berebichez-Fridman и сар., 2017). Такође, постоје докази да се ове ћелије могу диференцирати и у неуроне, а неуроногенеза је индукована променом у генској експресији (Hernández и сар., 2020). Диференцијација ових ћелија ка немезодермалној линији је још увек контроверзна и потребна су даља истраживања да би се утврдило да ли МСЋ задржавају ово својство *in vivo* (Pittenger и сар., 2019).



**Слика 1. Изоловање МСЋ и критеријуми за њихову диференцијацију.** Приказана су адултна и перинатална ткива из којих се могу изоловати МСЋ. Након експанзије врши се њихова карактеризација према критеријумима Комитета за мезенхималне матичне ћелије Међународног друштва за ћелијску терапију (Dominici и сар., 2006).

### 1.2.2.3. Имуномодулаторна улога мезенхималних стромалних ћелија

Један од првих доказа имуномодулаторних карактеристика МСЋ дали су *Di Nicola* и сарадници, који су показали да МСЋ инхибирају пролиферацију Т лимфоцита у реакцији помешаних лимфоцита (енг. *mixed lymphocyte reaction*, MLR) (*Di Nicola* и сар., 2002). Од тада је њихова имуносупресивна улога интензивно проучавана, тако да је данас познато да МСЋ у зависности од микросредине могу да инхибирају или чак стимулишу пролиферацију лимфоцита (*Vladimirovna* и сар., 2016). Занимљиво је и да су ове ћелије заштићене од имунолошких механизма сопственог организма и сматрају се имунски привилегованима. Главни разлог њихове хипоимуногености лежи у чињеници да оне слабо експримирају костимулаторе Т лимфоцита и МНС молекуле II класе (*van Meegen* и сар., 2019). Ове карактеристике чине алогене МСЋ веома атрактивним за терапијску примену.

Имуномодулаторна активност МСЋ, као и њихове друге улоге, раст и диференцијација, директно зависе од њихове микросредине. Промене у спољашњој средини се рефлектују на микросредину која изменом у свом саставу директно утиче на активност МСЋ (Fuchs и сар., 2004). У случају повреде коју прати инфламаторна реакција, МСЋ које се затекну у непосредној близини, почињу своју миграцију ка месту повређивања. Сензибилизација МСЋ настаје након продукције хемокина и цитокина у такозваној цитокинској олуји међу којима најзначајнију улогу имају IFN- $\gamma$  (енг. *interferon gamma*), TNF- $\alpha$  (енг. *tumor necrosis factor-alpha*) и IL-1. Упараво ови проинфламаторни цитокини, имају главну улогу у стимулацији имуносупресивне улоге МСЋ и омогућавају процес репарације ткива (Segers и сар., 2006; Rawat и сар., 2019). Ефекат инфламације на имуномодулаторну функцију МСЋ је јако значајан у разматрању терапијске примене МСЋ.

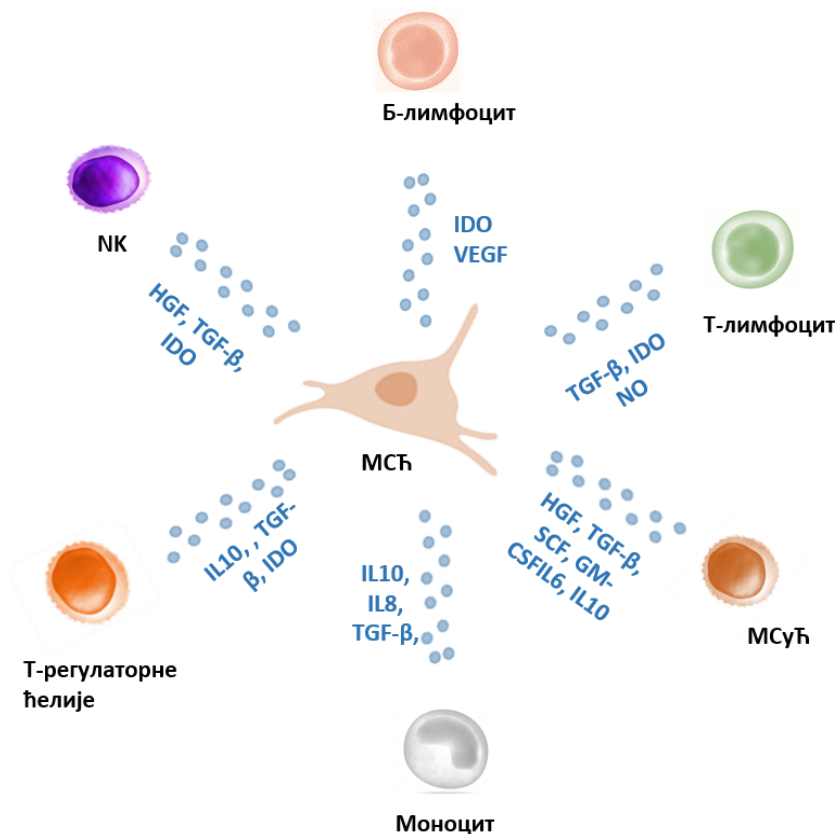
Главни механизми којима МСЋ утичу на имунске ћелије укључују ћелијски контакт и продукцију солубилних фактора (Слика 2.). Да је за снажну супресију Т лимфоцита потребан директан контакт са МСЋ демонстрирали су *Di Nicola* и сарадници (Di Nicola и сар., 2002). Они су показали да је супресија пролиферације Т лимфоцита била јача у условима култивације који дозвољавају директан контакт МСЋ и Т лимфоцита у поређењу са условима без директног ћелијског контакта. Везивање лимфоцита и МСЋ високим афинитетом је омогућено услед експресије интегрина, интрацелуларних адхезивних молекула (ICAM-1, ICAM-2), васкуларних адхезивних молекула (VCAM-1), CD72, CD58, CD274 и галектина-1 (Gao и сар., 2016; Мајумдар и сар., 2003). Познато је неколико десетина фактора који посредују у МСЋ посредованом ефекту на имунске ћелије међу којима су најзначајнији индоламин 2 3-диоксигеназа (енг. *indoleamine 2 3-dioxygenase*, IDO) (Takikawa и сар., 1988), IL-10 (Matsuda и сар., 1994), трансформишући фактор раста  $\beta 1$  (енг. *transforming growth factor beta 1*, TGF- $\beta 1$ ) (Moore и сар., 2000), фактор раста хепатоцита (енг. *hepatocyte growth factor*, HGF), васкуларни ендотелни фактор раста (енг. *vascular endothelial growth factor*, VEGF), инсулину сличан фактор раста 1 (енг. *insulin-like growth factor 1*, IGF-1), металопротеиназе, простагландин Е2 (Hata и сар., 2004; Rawat и сар., 2019), азот моноксид (енг. *nitric oxide*, NO) (Bogdan и сар., 2004), хем оксигеназа 1 (енг. *heme oxygenase 1*, HO-1 ) (Maines и сар., 1988), инхибиторни фактор леукемије 1 (енг. *leukemia inhibitory factor 1*, LIF-1), галектини (Rawat и сар., 2019) и други.



Бројна истраживања су показала да МС $\text{Т}$  утичу и на Т и Б ћелијски одговор. МС $\text{Т}$  инхибирају пролиферацију како помоћничких ( $\text{CD4}^+$ ) тако и цитотоксичних ( $\text{CD8}^+$ ) Т лимфоцита (Duffy и сар., 2011). Такође, МС $\text{Т}$  мењају равнотежу између Th1 и Th2 субпопулације помоћничких Т лимфоцита у корист антиинфламаторне Th2 субпопулације (Ваi и сар., 2009). Инхибиција Т лимфоцита од стране МС $\text{Т}$  настаје као последица директног ћелијског контакта који води Т лимфоците у функционалну инактивацију и застој у  $\text{G}_0$  фази ћелијског циклуса (Glennie и сар., 2005). Такође, МС $\text{Т}$  продукују бројне солубилне факторе попут  $\text{TGF-}\beta 1$  којима инхибирају Т лимфоците. Поред директног супримирања Т ћелијског одговора, МС $\text{Т}$  имају улогу и у индиректној имunosупресији преко стимулације регулаторних Т ћелија. Најбоље проучене регулаторне Т ћелије су  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$  и значајне су за имунску хомеостазу и превенцију аутоимунских поремећаја (Aggarwal и сар., 2005; Marson и сар., 2007). МС $\text{Т}$  повећавају популацију регулаторних Т ћелија тако што стимулишу настанак *de novo* имunosупресивних ћелија од постојећих Т лимфоцита (Engela и сар., 2013). Поред утицаја на Т лимфоците, МС $\text{Т}$  имају утицај и на Б ћелијски одговор. Оне инхибирају пролиферацију и диференцијацију Б лимфоцита, а значајно је и да смањују њихову ефекторску функцију тако што редукују количину продукованих антитела од стране Б лимфоцита (Corcione и сар., 2006). Такође, ове ћелије стимулишу продукцију регулаторних Б ћелија (Franquesa и сар., 2015). Имуномодулаторна улога МС $\text{Т}$  се огледа и у инхибицији активације, матурације и презентације антигена од стране дендритских ћелија, као и у инхибицији активације урођеноубилачких (енг. *natural killer*, NK) ћелија (Yen и сар., 2009). Доказано је и да МС $\text{Т}$  стимулишу поларизацију моноцита ка M2, антиинфламаторном фенотипу (Jiang и сар., 2005).

О ефекту МС $\text{Т}$  на популацију мијелоидних супресорних ћелија (МСу $\text{Т}$ ) се не зна довољно. МСу $\text{Т}$  су хетерогена популација незрелих ћелија које воде порекло од заједничког мијелоидног прогенитора, а састоје се од прекурсора гранулоцита, макрофага и дендритских ћелија. Њихова хетерогеност је последица деловања инфламаторних фактора, као што су гранулоцитно макрофагни фактор стимулације колонија (енг. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF), фактор матичних ћелија (енг. *stem cell factor*, SCF),  $\text{TGF-}\beta 1$  и интерлеукини IL-1 $\beta$ , IL-6 и IL-10 (Parker KH и сар., 2015). У хуманој популацији фенотипизацијом су издвојене две субпопулације МСу $\text{Т}$  на основу експресије површинских маркера и то: полиморфонуклеарна, ПМН-МСу $\text{Т}$  ( $\text{Lin}^- \text{HLA-DR}^-/\text{CD33}^+$  или  $\text{Lin}^- \text{HLA-}$

DR<sup>-</sup>/CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>CD15<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>) и моноцитна, М-МСуЋ (CD14<sup>+</sup>HLA-DR<sup>-</sup> или Lin<sup>-</sup>HLA-DR<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>CD15<sup>-</sup>). Једна од најзначајнијих особина мијелоидних супресорних ћелија је способност инхибиције Т ћелијског одговора. Механизми којима је посредована инхибиција обухватају: експресију индуцибилне синтетазе азот монооксида, експресију аргиназе 1 која разграђује Л-аргинин и продукција ROS. Поред тога, МСуЋ продукују TGF-β1 који стимулише настанак регулаторних Т ћелија и супримира NK ћелије (Parker и сар., 2015; Santibanez и сар., 2017).



**Слика 2. Имуномодулаторна улога МСЋ.** МСЋ продукују солубилне факторе којима утичу на цео спектар имунолошких ћелија укључујући Т и Б лимфоците, регулаторне Т ћелије, моноците, NK ћелије

#### 1.2.2.4. Улога мезенхималних стромалних ћелија у туморогенези

Туморски раст и прогресија је процес који је вођен генетским алтерацијама али на овај процес велики утицај имају и не-туморске ћелије које су део микросредине тумора. Туморску микро средину, поред малигних ћелија чине и многи други ћелијски елементи попут ендотелних и имуних ћелија, фибробласта и МСЋ (Ye и сар., 2014). Туморски раст покреће хроничну инфламацију па се тумор, у имунолошком смислу,

може посматрати као рана која не зараста (Dvorak и сар., 1986; Galland и сар., 2020). Истраживања на животињама у којима је експериментално развијен тумор, су открила да убризгане МСЋ имају тенденцију накупљања у туморском ткиву (Studený и сар., 2004). Процес миграције МСЋ до места туморског раста посредован је инфламаторним цитокинима и предмет је бројних истраживања. МСЋ се регрутују из костне сржи у одговору на хемокине и факторе, попут фибробластног фактора раста (енг. *fibroblast growth factor*, FGF), VEGF и IL-6, продукованих од стране туморских ћелија (Ritter и сар., 2008; Rattigan и сар., 2010). Миграција (*homing*) у туморско ткиво врши се преко ендотелних васкуларних ћелија а посредована је адхезивним молекулима и површинским рецепторима, попут ендотелног П селектина који ступа у интеракцију са CD44 молекулом на површини МСЋ (Rüster и сар., 2006). У одговору на стресогене факторе појачава се и експресија рецептора за цитокине попут CXCL5 а појачано се продукују и компоненте комплемента (C3а и C5а), што надаље омогућава екстравазацију МСЋ (Schraufstatter и сар., 2009). По пристизању до места туморског раста, у зависности од туморског микроокружења, МСЋ могу наставити да постоје као МСЋ или се могу диференцирати ка тумор-асоцираним фибробластима (ТАФ). Комуникација МСЋ са туморским ћелијама одвија се помоћу ћелијских веза (као што је пропусна веза, енг. *gap junctions*), али и путем продукције солубилних фактора, цитокина, фактора раста, метаболита и протеолитичких ензима.

Досадашња искуства сугеришу да МСЋ, у зависности од порекла и карактеристика, могу имати улогу и у стимулацији и инхибицији раста тумора. IL-6 и IL-8, продуковани од стране МСЋ, стимулишу туморогенезу у многим солидним туморима попут колоректалних тумора и тумора дојке (Tsaí и сар., 2011; Liu и сар., 2011). Такође, МСЋ стимулишу и неоангиогенезу тако што продукују ангиопоетин, EGF (енг. *endothelial growth factor*), галектин-1, IGF-1 (енг. *insulin like growth factor-1*) и VEGF, а нове студије сугеришу и способност диференцијације МСЋ у ендотелне ћелије, што све заједно утиче на појачану васкуларизацију тумора (Chen и сар., 2008; Oswald и сар., 2004). Имуносупресивна активност МСЋ фаворизује туморску прогресију и директно је пропорционална степену инфламације. Инфламаторни цитокини попут IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  активирају МСЋ, док их хемокини привлаче до места туморског раста (Jia и сар., 2016). Активиране МСЋ секретују антиинфламаторни IL-10 који индукује експресију PD-1 на регулаторним Т CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> лимфоцитима што доводи до повећања њиховог имуносупресивног капацитета (Yan и сар., 2014). Након диференцирања МСЋ у ТАФ,

стимулација туморског раста се одвија помоћу бројних механизма укључујући инхибицију апоптозе туморских ћелија, стимулације пролиферације туморских ћелија или секрецијом фактора ангиогенезе. ТАФ секретују велики број цитокина, од којих неки, попут TGF- $\beta$ 1 инхибирају инфламаторни одговор посредован НК ћелијама и Т лимфоцитима (Östman и сар., 2009; Ogino и сар., 2005).

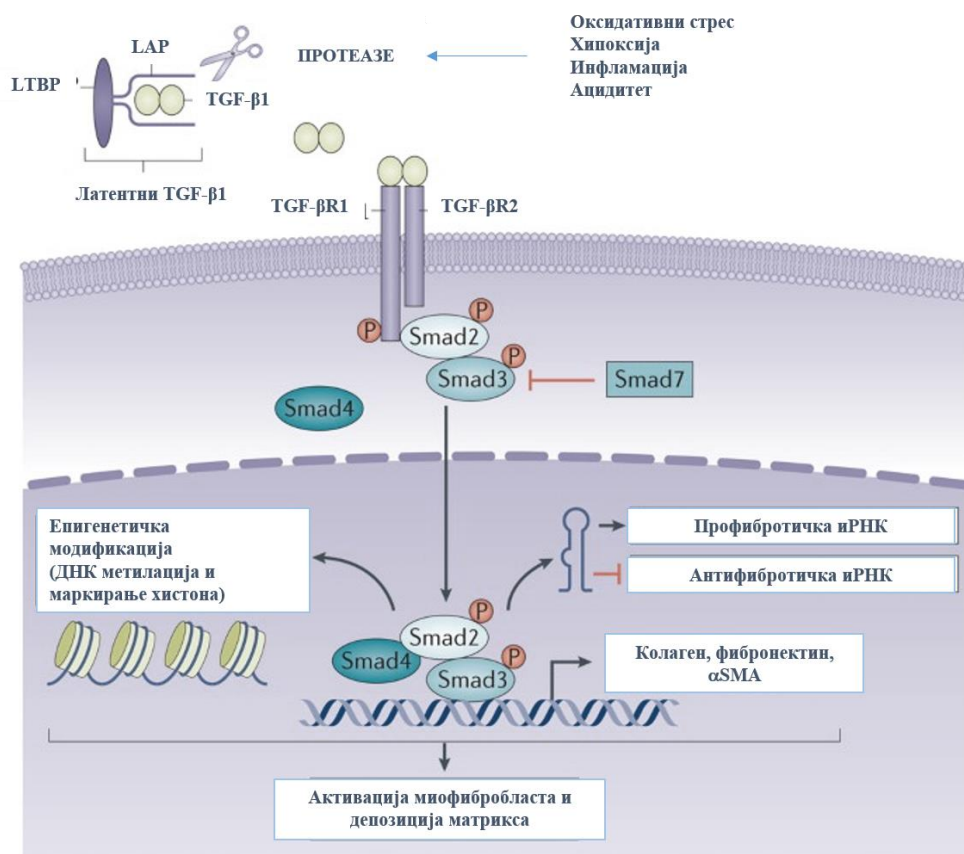
Са друге стране, бројне студије показују да МСЋ могу инхибирати туморски раст различитим механизмима. Истраживања *in vitro*, фокусирана на туморе панкреаса су показала да МСЋ супримирају раст тумора тако што застављају деобу малигних ћелија у  $G_1$  фази ћелијског циклуса. Убризане МСЋ порекла адипозног ткива у ксенографт модел карцинома панкреаса инхибирале су туморски раст *in vivo* (Cousin и сар., 2009). Такође, МСЋ инхибирају пролиферацију леукемијских ћелија тако што секретују DKK-1, протеин са тумор супресорном активношћу, чија је експресија регулисана транскрипционим фактором матичних ћелија NANOG (Zhu и сар., 2009). Студије су показале и да МСЋ порекла пупчане врпце инхибирају прогресију карцинома дојке тако што доводе до смрти туморских ћелија апоптозом и супримирају туморску ангиогенезу (Leng и сар., 2014). У туморима са израженом инфламацијом и ангиогенезом, попут Капоши саркома, МСЋ су показале изражену антитуморску активност (Khakoo и сар., 2006).

Ова истраживања потврђују врло значајну улогу МСЋ у туморском расту, прогресији, ангиогенези и имунском одговору на тумор. Ефекат МСЋ на туморске ћелије зависи од њиховог окружења, врсте тумора као и извора МСЋ које се користе у истраживању и још увек је недовољно разјашњен.

#### **1.2.2.5. Улога мезенхималних стромалних ћелија у фибрози**

Фиброза се јавља као крајњи стадијум многих болести. Током процеса репарације оштећеног ткива, колагена влакна иницијално пружају потпору али уколико се колаген екстензивно и пролонгирано синтетише, овај процес постаје иреверзибилан и угрожава регенерацију ендогених ћелија ткива (Proctor и сар., 2016). Многи органи, попут срца, плућа, јетре, коже и костне сржи, су подложни фибрози након дуготрајног дејства стресора (Nishikimi и сар 1992; Cochrane и сар. 2005; Fleck и сар 2006). Фиброза често води у инсуфицијенцију захваћеног органа и значајно доприноси морталитету. Фибропролиферативне болести могу бити идиопатске или могу имати познату

етиологију која се тиче животног стила, генетске предиспозиције, инфекција, зрачења или могу бити еволутивни наставак системских болести (Friedman и сар 2013). Досадашња истраживања су истакла значај инфламације, хипоксије и оксидативног стреса које консекутивно воде ка активацији TGF- $\beta$ 1 сигналног пута у патогенези ових болести (Слика 3.) (Barcellos-Hoff и сар., 1996; Ehrhart и сар., 1997). TGF- $\beta$ 1 у највећој мери синтетишу активирани Т лимфоцити и моноцити и то у инактивној форми, у комплексу са протеинима LAP (енг. *latency associated peptide*) и LTBP (енг. *latent TGF-beta binding protein*). TGF- $\beta$ 1 се ослобађа из комплекса са LAP и LTBP под дејством протеаза након чега се активира и везује за рецепторе TGF- $\beta$ R1 и TGF- $\beta$ R2. Након везивања TGF- $\beta$ 1 за рецепторе долази до активације сигналног пута SMAD (енг. *small mothers against decapentaplegic homolog*) који активира транскрипцију различитих гена, укључујући и гене који кодирају протеине екстрацелуларног матрикса, попут колагена (Wynn и сар., 2007; Khalil и сар., 1999). У процесу фиброзе значајна је и акумулација миофибробласта, ћелија које продукују екстрацелуларни матрикс (Hinz и сар, 2012).



**Слика 3. Улога TGF $\beta$ /SMAD сигналног пута у настанку фиброзе.** Модификовано по Meng XM и сар., 2016. Активација TGF- $\beta$ 1 који делује на своје рецепторе и води у фосфорилацију и активацију SMAD сигналних путева, доводећи до фиброзе.

Лечење фибропролиферативних болести је често неуспешно а најчешће се ослања на примену антиинфламаторних агенаса. Међутим, обећавајућу улогу у третману ових болести могле би имати МСТћ. У току су бројна преклиничка и клиничка истраживања која се ослањају на МСТћ у ћелијској терапији стања попут фиброзе настале као последица зрачне терапије, аутоимуних болести, дегенеративних обољења и др (Chapel и сар., 2013; Schwarz и сар., 2010). Антифибротични утицај МСТћ се одвија кроз различите механизме: имунолошку супресију, инхибицију TGF- $\beta$ 1 сигналног пута, редукцију оксидативног стреса и хипоксије. Сматра се да МСТћ смањују секрецију и концентрацију TGF- $\beta$ 1 (Usunier и сар., 2014). *In vitro* ко-култура МСТћ и НК2 ћелија које су претретиране са TGF- $\beta$ 1, редукују експресију миофибробластног маркера  $\alpha$ -SMA (енг.  *$\alpha$ -smooth muscle actin*) у овим ћелијама (Alfarano и сар., 2012). Познато је и да МСТћ индукују експресију ензима значајних за заробљавање слободних радикала попут NQO1 (енг. *NADPH quinone oxidoreductase 1*), глутатион-редуктазе и HO-1 (Francois и сар., 2013). Преклиничка испитивања утицаја МСТћ на мултиорганску фиброзу мишијег модела системске склерозе су показала да је антифибротична улога МСТћ посредована њиховим антиинфламаторним и антиоксидантним својствима (Maria и сар., 2015). Такође, МСТћ имају потенцијал да редукују фиброзу плућа након експозиције јонизујућем зрачењу спречавајући епително-мезенхималну транзицију (Dong и сар., 2015). У току је 59 клиничких студија које користе МСТћ у третману цирозе и фиброзе јетре (Сао и сар., 2020). Иако њихова примена у лечењу фибропролиферативних обољења изгледа обећавајуће, треба имати у виду да су поједине студије показале и профибротичну улогу МСТћ, било путем паракрине стимулације инфламације или директно путем њихове трансформације у миофибробласте (Maskinnon и сар., 2013).

#### **1.2.2.6. Терапијска улога мезенхималних стромалних ћелија**

У току су многа истраживања са фокусом на испитивању безбедности и ефикасности примене МСТћ у ћелијској терапији различитих болести. Актуелна преклиничка и клиничка испитивања се заснивају на коришћењу неких од најпроминентнијих карактеристика МСТћ, попут миграције у оштећена ткива, имуномодулације, продукције цитокина, диференцијације ка више ћелијских линија, у третману стања попут неуролошких, срчаних поремећаја, дијабетеса, болести јетре, бубрега, костију и хрскавице (Si и сар., 2012; Song и сар., 2004).

МСЋ се успешно примењују у регенерацији кости од 1951 године. Неки од поремећаја у којима се у терапији користе МСЋ су *osteogenesis imperfecta*, остонекроза главе фемура индукована стероидима, репарација фрактура, хипофосфатазија и други (Griffin и сар., 2011). Интеграција МСЋ у мождано ткиво и у ткиво кичмене мождине је карактеристика која се може искористити у третману неуродегенеративних болести. У току су клиничка истраживања у којима се користе убризгане аутологе МСЋ у третману амиотрофичне латералне склерозе са циљем успоравања прогресије болести (Volkman и сар., 2017). МСЋ се могу диференцирати и у кардиомиоците, те се могу користити у репарацији срчаног ткива након инфаркта миокарда. Овај процес може бити олакшан употребом нано-биоматеријала који пружају потпору, омогућавају бољу интеграцију у ткиво и поспешују диференцијацију МСЋ (White и сар., 2016; Chen и сар., 2004). Способност диференцијације у различите ћелијске типове као и имуномодулаторна улога МСЋ, су својства ових ћелија која могу бити искоришћена у терапији шећерне болести. Наиме, диференцијација МСЋ у ћелије које продукују инсулин је добро проучена *in vitro*. Антидијабетички ефекат ових ћелија се заснива и на њиховој карактеристици да мењају имуни одговор као и панкреасну микросредину, највећим делом променом цитокинског профила од проинфламаторног ка антиинфламаторном (Yu и сар., 2007; Ho и сар., 2012). Такође МСЋ су способне да се диференцирају ка ћелијама сличним хепатоцитима што се може искористити у третману алкохолних и неалкохолних оштећења јетре. У експериментима који користе мишије моделе хепатичног оштећења, оба типа ћелија, МСЋ и хепатоцити које воде порекло од МСЋ, су се након интравенске примене усађивала у јетру и спречавала фиброзу и инсуфицијенцију јетре (Stock и сар., 2010; Hwang и сар., 2012). У клиничким студијама хроничне бубрежне инсуфицијенције, убризгане МСЋ су водиле ка снижење нивоа серумског креатинина и повећање клиренса креатинина у периоду од 1, 3 и 6 месеци након убризгавања (Wise и сар., 2012; Humphreys и сар., 2008). Посебно је занимљива и контроверзна улога МСЋ у терапији тумора. Способност миграције МСЋ у туморско микроокружење може бити искоришћена за транспорт цитокина, хемиотерапеутика, гена који кодирају ензиме значајне за активацију лекова или онколитичких вируса специфично до места тумора (Klopp и сар., 2011; Studeny и сар., 2002; Studeny и сар., 2004; Uchibori и сар 2009).

Све ове карактеристике, уз одсуство озбиљних нежељених ефеката који прате њихову досадашњу примену, чине МСЋ врло атрактивним за употребу у ћелијској

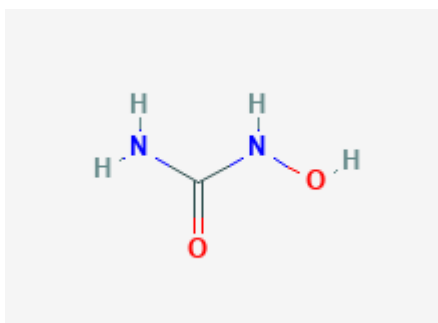
терапији. Проблеми у терапијској примени су прецизно дефинисање критеријума за карактеризацију и изолацију МСЋ, неопходност *in vitro* умножавање ћелија које претходи примени и хетерогеност овако добијене популације, извори МСЋ, дилеме у одређивању адекватне количине МСЋ, као и питања самог начина примене, који може бити једнократни или вишекратни, локални или системски. За даље напредовање од примене у базичним истраживањима ка масовнијој клиничкој употреби потребна су детаљна истраживања њихових карактеристика, контрола и стандардизација поступка изолације, култивисања и експанзије са циљем доследности и репродуцибилности целокупног процеса.

### 1.3. ХИДРОКСИУРЕА

#### 1.3.1. Механизам деловања

Хидроксиуреа (ХУ) или хидроксикарбамид представља хидроксиловани дериват урее синтетисан 1869. године (**Слика 4.**) (Dresler и сар., 1869). Цитостатско деловање ХУ утврђено је тек један век касније, тако да данас овај агенс убрајамо у групу антинеопластичних лекова (Young и сар., 1967). У *in vivo* условима ХУ се конвертује у НО који дифундује у ћелије и инактивира ензим рибонуклеозид-дифосфат редуктазу. Рибонуклеозид-дифосфат редуктаза је ензим који учествује у процесу синтезе дезоксирибонуклеотида тако што конвертује рибонуклеозид-дифосфат у дезоксирибонуклеозид-монофосфат. Инактивација овог ензима условљена је деструкцијом тирозил радикала, есенцијалних за ензимску активност (Young и сар., 1967; Varagić и сар., 2009; PubChem, 2021). Ензимска инактивација зауставља синтезу ДНК и води ка застоју ћелијског циклуса у *G1/S* фази. Такође, инхибиција овог ензима онемогућава процес поправке ДНК (Varagić и сар., 2009). Управо овај механизам који доводи до инхибиције ДНК поправке и застоја у ћелијској деоби, је одговоран за још један ефекат ХУ, а то је радиосензитизација ћелија. Многе *in vitro* и *in vivo* студије су демонстрирале синергистичко деловање ХУ и јонизујућег зрачења у третману карцинома грлића материце, мокраћне бешике и др. (Куо и сар., 199; Куо и сар., 1995; Charman и сар, 2012).





**Слика 4. Структура хидроксиуреа.** Хидроксиуреа (хемијска формула  $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$ ) (PubChem, 2021).

ХУ индукује продукцију феталног хемоглобина, који представља тип хемоглобина са већим афинитетом према кисеонику. Сматра се да је повећање феталног хемоглобина посредовано NO и нитровазодилаторима (Сокис и сар., 2003). Показано је да се повећана синтеза феталног хемоглобина одвија путем редукције аденозина, највероватније преко повећања активности аденозин деаминазе (Silva-Pinto и сар., 2014). Доказано је и да ХУ смањује ниво деокси-хемоглобина у српастој анемији тако што транспортује NO из ННОН групе хидроксиуреа и формира нитрозиловани хемоглобин. Повољан ефекат ХУ на смањење учесталости вазо-оклузивних криза у српастој анемији се постиже и смањењем експресије фосфатидил-серина, адхезивног молекула на површини еритроцита, који омогућава адхезију циркулишућих еритроцита на површину ендотелних ћелија (Сокис и сар., 2003; Silva-Pinto и сар., 2014).

### 1.3.2. Утицај хидроксиуреа на ћелијски циклус

Познато да ХУ има негативан утицај на преживљавање плурипотентних матичних ћелија (Petrova и сар., 2016). На дејство хидроксиуреа, најосетљивије су ћелије које се налазе у касној  $G_1$  и раној  $S$  фази ћелијског циклуса док њихова осетљивост опада како ћелије напредују даље кроз  $S$  фазу. Ћелије које не умиру апоптозом остају заустављене у  $G_1/S$  фази (Nečas и сар., 1982). Ови ефекти су посредовани ХУ индукованим репликационим стресом и инхибицијом синтезе деоксирибонуклеотида због прекида двоструког ДНК хеликса у близини репликационе виљушке (Petrova и сар., 2016). Ипак, тачан механизам којим се ћелија опредељује за апоптозу или застој у ћелијском циклусу под утицајем ХУ није у потпуности разјашњен. Испитивања на ембрионалним мишијим матичним ћелијама су показала да ове ћелије одговарају

апоптозом на третман ХУ услед повећане унутарћелијске производње NO која активира p53 и p38 сигналне путеве који уводе ћелију у каспазама посредовану апоптозу (Нео и сар., 2014). Друга студија спроведена на ћелијској линији МсА-RH7777 је показала да је третман ових ћелија ХУ довео до застоја у G<sub>1</sub> фази којем је претходила смањена фосфорилација MAPK (енг. *mitogen-activated protein kinases*), попут ERK (енг. *extracellular-signal-regulated kinase*), JNK (енг. *Jun N-terminus kinase*) и p38 (Hong и сар., 2004). Ови ефекти су најчешће дозно зависни. *In vitro* судија на хематопоеетским матичним ћелијама је показала да ХУ доводи до застоја ових ћелија у G<sub>1</sub> фази и да на тај начин утиче на њихову пролиферацију и диференцијациони капацитет (Muñiz-Rivera-Cambas и сар., 2018).

### 1.3.3. Примена и токсичност хидроксиурее

Због својства да индукује синтезу феталног хемоглобина, последњих 25 година ХУ представља терапију избора за српасту анемију. Српаста анемија спада у групу хемоглобинопатија која се одликује српастим обликом еритроцита који су подложни хемолизи, васкуларним оклузијама и хроничним оштећењем органа које се јавља као последица хипоксије и васкулопатија. ХУ је једини агенс који је одобрен за терапију српасте анемије од стране US FDA (енг. *US Food and Drug Administration*) (Ware и сар., 2009). Сматра се посебно ефикасном у спречавању вазо-оклузивних криза које доводе до бола у грудном кошу и абдомену. У току је клиничка студија о ефикасности ХУ у лечењу компликација српасте анемије попут бубрежне инсуфицијенције, као и о безбедности примене ХУ у терапији српасте анемије у педијатријској популацији (DrugBank, 2021). Поред тога, клиничке студије истражују утицај комбиноване терапије ХУ и Л-карнитина у лечењу бета талесемије, болести која се карактерише смањењем или потпуним одсуством синтезе бета ланаца хемоглобина (PubChem, 2021).

У комбинацији са радиотерапијом, ХУ представља терапијску опцију за узнапредовали меланом и сквамозелуларни карцином главе и врата. Метастатски, иноперабилни карцином оваријума, карцином грлића материце, глиоми као и иноперабилни карцином једњака се могу третирати ХУ (Madaan и сар., 2012). Такође, у току су клиничке студије које испитују антитуморски ефекат ХУ у терапији рекурентног менингеома (PubChem, 2021).

XU је, до откића инхибитора JAK2, била једина терапијска опција у третману JAK2 позитивних мијелопролиферативних неоплазми (МПН), који подразумевају есенцијалну тромбоцитемију, полицитемију веру и примарну мијелофиброзу. Овај агенс је и даље најчешће прописивана терапија за хиперпролиферативне манифестације мијелопролиферативних обољења попут спленомегалије, болова у костима, пруритуса, оклузије крвних судова (Choi и сар., 2015). И други хематолошки малигнитети, попут хроничне мијелоидне леукемије резистентне на стандардне терапијске модалитете, могу бити третирани XU (Madaan и сар., 2012). У најзначајније хематолошке ефекте убрајају се: утицај на морфологију и деформабилност еритроцита, смањење броја леукоцита, неутрофила, тромбоцита, ретикулоцита, нивоа лактат дехидрогеназе и повећање концентрације хемоглобина по еритроциту као и MCV (енг. *mean corpuscular volume*) (Ware и сар., 2009).

Антипролиферативни ефекат XU је искоришћен у терапији псоријазе, а занимљиво је да се овај агенс налази и у терапијским протоколима за спиналну мишићну атрофију јер се сматра да повећава експресију SMN2 гена. Такође, у току су и многе клиничке студије, од којих су неке у четвртој фази испитивања, која се базирају на антивирусном ефекту лека у третману инфекције ХИВ вирусом (вирусом хумане имунодефицијенције), због доказане XU посредоване инхибиције репликације ХИВ вируса *in vitro* (Ware и сар., 2009; PubChem, 2021).

Стандардна терапијска примена XU није без нежељених ефеката. Најчешћи и предвидљив нежељени ефекат је мијелотоксичност која се презентује као леукопенија, неутропенија, ређе анемија и тромбоцитопенија, затим гастроинтестинални симптоми, хепатотоксичност, мукозитиси, кожне промене укључујући улцерације екстремитета и слично. Већина ових ефеката је дозно зависна и по завршетку терапије се потпуно повлачи (Varagić и сар., 2009; Ware и сар., 2009; PubChem, 2021). Највећу забринутост изазива потенцијална канцерогеност агенса. Код дугорочне примене овог хемотерапеутика у лечењу мијелопролиферативних обољења забележени су случајеви секундарних леукемија (Randi и сар., 2005). Још један разлог за дугорочну контролу пацијената на дугогодишњој терапији је појава карцинома коже (Liozon и сар., 2007). XU се сматра ембрио и фетотоксичним агенсом. Репродуктивне студије на мишевима су показале тератогени ефекат и негативни утицај на сперматогенезу (Shelby, 2005). Такође, испитивање дугорочних ефеката терапије XU код болесника са српастом

анемијом, открило је да је примена овог хемотерапеутика доводи до настанка микронуклеуса у еритробластима, те се агенс може сматрати генотоксичним (Flanagan и сар., 2010). Даља истраживања су потребна да би се побољшала ефикасност а смањила токсичност ХУ.

Ова истраживања доводе до закључка да је хидроксиуреа снажан инхибитор ћелијског циклуса али остаје непознаница да ли су ове промене реверзибилне или ирреверзибилне. До сада није испитиван ефекат хидроксиуреа на МСЋ, њихов диференцијациони потенцијал, имуномодулаторну улогу, улогу у туморогенези и фибрози. Имајући у виду доступност и значај МСЋ, њихов растући терапијски потенцијал остаје да се види у којој мери се њихова својства мењају под утицајем хемиотерапије ХУ.

#### **1.4. СЕНЕСЦЕНЦИЈА**

Старење је неминован процес карактеристичан за сва жива бића, условљен спољашњим и унутрашњим факторима који воде ка постепеном смањењу функционалности, а јавља се као одговор на неизбежно протицање времена (Strehler, 2000; Stephens, 2005). Организам у целости, ткива и органи, би претрпели тешка оштећења у кратком временском периоду, да у нашу корист не раде бројни репарациони механизми. Ипак, ови механизми нису идеални и током живота долази до акумулације штетних продуката који настају као последица њиховог затајења (Strehler, 2000; da Silva и сар., 2019). Теорија расположиве коме објашњава да у току животног века организам има ограничене ресурсе за раст, репродукцију и ДНК поправку. Током живота, организам бира да метаболичке ресурсе улаже у раст и репродукцију, ризикујући накупљање оштећења, која нас неповратно воде у старење (Kirkwood и сар., 1977; da Silva и сар., 2019).

Старење се одвија на нивоу целог организма, органском али и ћелијском нивоу. Као одговор на стрес, а у зависности од интензитета стреса као и типа ћелије на коју стресор делује, ћелија може умрети апоптозом, може кренути у процес аутофагије или може ограничити своје деловање путем сенесценције. Ћелијско старење, односно сенесценција (лат. *senescere*, старење) је ирреверзибилни застој у ћелијском циклусу, које се јавља као последица акумулације оштећења која не доводе до ћелијске смрти (**Слика**

5.) (Kirkwood и сар., 1991; Hooten и сар., 2017). Сви типови ћелија, укључујући и малигно трансформисане ћелије подлежу сенесценцији а од недавно је познато да су и „бесмртне“ матичне ћелије склоне акумулацији оштећења и ћелијском старењу (Schultz и сар., 2016). На овај начин старе и једноћелијски микроорганизми, што је показала студија на бактерији *Escherichia coli* (Fredriksson и сар., 2006). Сматра се да је овај механизам протективан јер онемогућава малигну трансформацију ћелије кроз ограничење њене деобе (Vicencio и сар., 2014). Ипак, сенесцентне ћелије остају метаболички активне па се у њима и даље одвија митохондријална активност и ћелијска респирација, гликолиза, деградација протеина и слични процеси (Schultz и сар., 2016). Такође, ове ћелије настављају интеракцију са суседним ћелијама, директним контактом или индиректно помоћу инфламаторних фактора, познатих под називом секреторни фенотип повезан са сенесценцијом или SASP (енг. *Senescence associated secretory phenotype*) (Petrova и сар., 2016). Феномен акумулације сенесцентних ћелија, које секретују SASP и доприносе хроничној инфламацији, је значајан у бројним болестима повезаним са старењем тако да би њихова прецизна детекција и елиминација сенолитичким агенсима, била један од потенцијалних терапијских приступа (Watanabe и сар., 2017). Са друге стране, сенесценција и SASP имају и доказане позитивне ефекте. Познато је да су сенесцентне ћелије присутне и током ембрионалног развоја костију и хрскавица са улогом у стимулацији репарације и ремоделације ткива. Сенесцентне ћелије су способне и за стварање матриксних металопротеиназа и могу имати улогу у превенцији фиброзе а процес сенесценције се може сматрати и тумор-супресорским механизмом (Liu и сар., 2019). За боље сагледавање позитивних и негативних ефеката сенесценције и постизање боље контроле самог процеса, потребно је разумевање услова у којима сенесценција настаје, као и прецизно профилисање SASP.

#### **1.4.1. Фактори који доводе до сенесценције**

Фактори који доводе до сенесценције су оксидативни стрес, скраћење теломера, оштећење ДНК, дисфункција митохондрија, активација онкогена и инфламација (Слика 5.).

Различити стресори, укључујући и оксидативни могу водити у сенесценцију, која се назива и стресом индукована сенесценција (Petrova и сар., 2016). ROS су продукт оксидативног метаболизма и његова акумулација води ка оштећењу макромолекула попут, протеина, липида и ДНК. Накупљање оваквих, оштећених макромолекула води

ка старењу ћелије (Dodig и сар., 2019). Нуспродукти оксидативног метаболизма се задржавају на месту свог настанка, митохондријама и управо је дисфункција митохондрија механизам који се доводи у везу са сенесценцијом (Ziegler и сар., 2015). Такође, ROS води у активацију туморсупресорских протеина као и протеина регулатора ћелијског циклуса попут p53, p21 и ретинобластома (енг. *retinoblastoma*, Rb) протеина (Pole и сар., 2016). Активација ових фактора води у застој ћелијског циклуса и сенесценцију уз производњу SASP који позитивном повратном спрегом индукују повећање ROS и доприносе старењу. Различити антиоксиданси који смањују степен оксидативног стреса, попут NAC (енг. *N-acetyl cysteine*), се могу посматрати и као инхибитори сенесценције и фактори који доприносе очувању ћелијске функције (Liao и сар., 2019).

Стресом индукована сенесценција може бити узрокована и одређеним агенсима попут бромдеоксиуридина, хидроксиуреа, цисплатине, доксорубицина, тимидина и др (Petrova и сар., 2016). Лекови који индукују сенесценцију могу довести до оштећења ДНК, активације топоизомераза, делују и као инхибитори циклин зависних киназа или индукују продукцију ROS. Хемиотерапијом индукована сенесценција се одвија путем активације стрес сигналних путева попут p38 и MAPK. Хидроксиуреа доводи до сенесценције тако што повећава ниво ROS у ћелијским линијама попут K562 и MCF10A (Ewald и сар., 2010; Petrova и сар., 2016).

Прави показатељ репликативне способности је дужина теломера. Теломере су крајњи делови хромозома који се састоје од неколико килобаза које се понављају (TTAGGG). Њихова главна улога је спречавање деградације хромозома и хромозомских фузија. (Victorelli и сар., 2017; Siderakis и сар., 2007). Ћелије се не могу бесконачно делити из разлога што се теломере скраћују при свакој ћелијској деоби а цео процес је строго контролисан ензимом теломераза. Сматра се да је ово тумор протективни механизам. Стресори попут оксидативног убрзавају скраћење теломера и воде у такозвану репликативну или ћелијску сенесценцију (Victorelli и сар., 2017). МСН су подложне репликативној сенесценцији након продужене култивације, као и превременој сенесценцији индукованој стресом након изложености стресорима као што су водоник пероксид и хемиотерапијски агенси (Petrova и сар., 2016).

Теломерична и нетеломерична ДНК оштећења воде активацији инхибитора циклин зависних киназа и туморсупресора p16, p53, p21 и p15 и доводе до сенесценције.

У фази клиничког испитивања су CDK4 инхибитори који индукују сенесценцију и своју примену би могли наћи у терапији карцинома дојке (Finn и сар., 2015).

## **1.4.2. Биомаркери сенесцентних ћелија**

Сенесцентне ћелије показују уочљиве фенотипске промене као што су: увећање ћелија и њихових једара, формирање хетерохроматинских фокуса, повећана експресија и активност сенесцентне бета галактозидазе, (енг. *senescence-associated  $\beta$ -galactosidase*, SA- $\beta$ -gal), експресија циклин-зависних киназних инхибитора (p16, p21) и испољеност инфламаторног фенотипа познатог као SASP (Singh и сар., 2016). Најважнији маркери сенесценције се могу поделити на интраћелијске и екстраћелијске (Слика 5.).

### **1.4.2.1. Интраћелијски маркери сенесценције**

Један од најзначајнијих маркера сенесцентних ћелија је ензим SA- $\beta$ -gal, изоформа ензима бета галактозидазе који разлаже бета галактозиде. Овај ензим се налази у лизозомима сенесцентних ћелија и његова повећана активност је један од маркера сенесценције. Бета галактозидаза је активна при рН 4, док је SA- $\beta$ -gal у сенесцентним ћелијама активна при рН 6. SA- $\beta$ -gal може бити детектована хистохемијски, имунохистохемијски а од недавно и проточном цитометријом (Yanagi и сар., 2017). С обзиром да SA- $\beta$ -gal није присутан искључиво у сенесцентним ћелијама него и у пресенесцентним ћелијама и ћелијама које се налазе у фази мировања, овај ензим није довољан биомаркер и мора се комбиновати са другима (Passos, 2018). Сличан маркер,  $\alpha$ -флукозидаза је у скорије време описан као маркер сенесцентних ћелија, али се о његовој специфичности још увек не зна довољно (Hildebrand и сар., 2013).

Маркери ДНК оштећења, попут  $\gamma$ H2AX, 53BP1 foci, Rad17 и других, могу се сматрати сенесцентним маркерима. Маркер који детектује прекид дволанчаног ДНК хеликса је  $\gamma$ H2AX, протеин из породице хистона H2A, може детектовати прекид ДНК који настаје као последица јонизујућег зрачења и није карактеристичан искључиво за сенесценцију. Овај хистон се може детектовати имунохистохемијски и имунофлуоресцентно (Charman и сар., 2012).

Репликативна сенесценција се може доказати и детекцијом скраћења теломера. Есеји за њихову детекцију још нису прецизно дефинисани, али квантитативни PCR и

флуоресцентна *in situ* хибридизација (енг. *fluorescence in situ hybridization* -FISH) (Cawthon, 2002) могу бити корисни у мерењу дужине теломера. (O'Sullivan и сар., 2005).

Познато је и да протеазоми, одговорни за разградњу оштећених протеина, показују повећану активност у сенесцентним ћелијама, (Chondrogianni и сар., 2003). Са старењем се повећава ниво ROS и оксидативни стрес, те се ROS као индиректан параметар такође може користити за доказивање сенесценције (Liochev, 2013).

Најзначајнија карактеристика сенесцентних ћелија је застој у ћелијском циклусу. Током застоја раста и деобе, под утицајем стресора, долази до активације регулатора ћелијског циклуса попут p53, p21<sup>CIP1</sup>, p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup> и p27. p21<sup>CIP1</sup> протеин спада у групу инхибитора циклин зависних киназа, који је значајан инхибитор ћелијске пролиферације и руководи прогресијом ћелијског циклуса из *G<sub>1</sub>* у *S* фазу а прекомерно је експримиран у сенесцентним ћелијама (Campisi, 2005). За перманентан застој у ћелијском циклусу потребни су p53 и p16<sup>INK4a</sup>. p53, регулатор ћелијског циклуса, у нормалној ћелији је инактивисан а када се активира доводи до застоја ћелијског циклуса. Овај протеин није специфичан маркер сенесценције, ћелије које су апоптотичне и туморске могу експримирати овај протеин. p16<sup>INK4a</sup> такође припада инхибиторима циклин зависних киназа задужених за фосфорилзацију и активацију тумор супресорног протеина Rb који води до застоја у *G<sub>1</sub>* фази. Сенесценција настаје када због инактивације супресорних протеина настане повећана експресија протеина p16<sup>INK4a</sup> (Campisi, 2005; Krishnamurthy и сар.,2004). Експресија ових маркера се може доказати хистохемијски и имунохистохемијски.

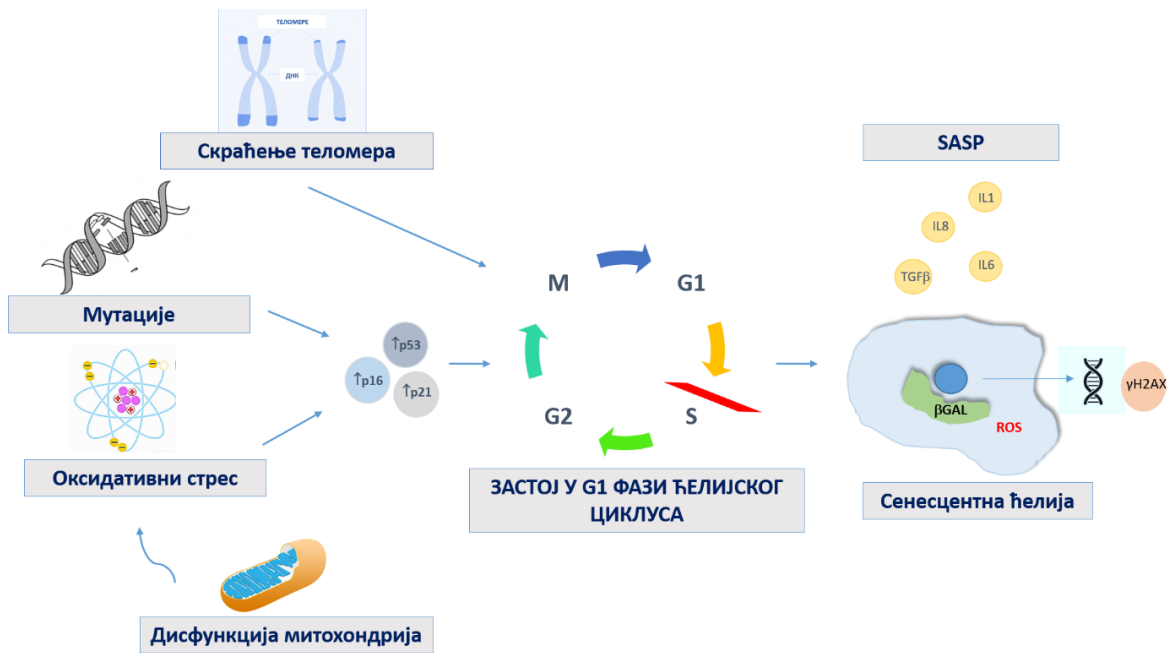
#### **1.4.2.2. Екстраћелијски маркери сенесценције**

Сенесцентне ћелије продукују факторе раста, цитокине, имуномодулаторе који могу бити антиинфламаторни и профибротични (попут TGF-β) или супротно проинфламаторни и антифибротични (попут IL-1β, IL-6 и IL-8) (Ito и сар., 2017). Најчешћи фактори створени од стране сенесцентних ћелија су IL-1β, IL-8 и IL-6, с тим што на тип и количину фактора који се стварају у оквиру SASP, утичу окружење, тип ћелија које постају сенесцентне, иницирајући фактори и друго (Chien и сар., 2011; Hodes и сар., 2016). Тако на пример, сенесцентне Т ћелије стварају TNF-α који има улогу у



промоцији остеопеније током старења (Effros, 2004), док сенесцентне глатке мишићне ћелије стварају проинфламаторне цитокине који стимулишу атеросклерозу (Minamino и сар., 2003). Сенесцентне ћелије такође могу појачано да експримирају IL-6 који се повезује са хиперинсулинемијом и плућном хипертензијом (Franckhauser и сар., 2008). Испитивањима на мишијим моделима утврђено је да стромални SASP фактори, првенствено IL-6, успостављају хроничну инфламацију и између осталог утичу на диференцијацију МСуЋ (Ruhland и сар., 2016).

Занимљиво је да сенесценција и SASP могу имати како про- тако и анти-туморску улогу. *In vitro*, као и истраживања која подразумевају коришћење мишијих модела су показала да SASP фактори секретовани од стране сенесцентних матичних ћелија стимулишу пролиферацију ћелија карцинома дојке (Turinetti и сар., 2016). Такође, слична истраживања карцинома коже су довела до закључка да сенесцентни фибробласти коже стимулишу пролиферацију преканцерских и малигно трансформисаних ћелија (Corré и сар., 2008). Са друге стране, сенесценција може имати и антитуморску улогу. Терапијом-индукована сенесценција може активирати цитотоксичне CD8+ Т лимфоците и NK ћелије које испољавају значајну антитуморску активност у карциномима панкреаса и плућа (Ruscetti и сар., 2018; Ruscetti и сар., 2020). Друга истраживања на мишијим моделима хепатоцелуларног карцинома довела су до откића да SASP произведен од стране сенесцентних ћелија води у активацију CD4+ имунског одговора који елиминише туморске ћелије (Iannello и сар., 2013). Цитокинима активирани сигнални путеви попут NF-κB, JAK/STAT (енг. *janus kinasis/signal transducer and activator of transcription*) се истражују као путеви који доприносе сенесценцији и SASP. Такође, потребно је испитати утицај сигналних путева који су активирани у малигним болестима и инфламацији, а значајни су за контролу ћелијског раста и пролиферације попут MAPK (ERK, JNK и p38) и mTOR (енг. *mammalian target of rapamycin*) (Kandhaya-Pillai и сар., 2017). Због различитих ефекта сенесцентних ћелија неопходно је прецизно профилисање SASP фактора као и сигналних путева који су активирани у овим ћелијама.



**Слика 5. Сенесценција.** Фактори који воде у сенесценцију и карактеристике сенесцентних ћелија

Још увек не постоји стандардизовани биомаркер („златни стандард“) за детекцију сенесценције. Да би се постигла задовољавајућа специфичност ниједан од ових појединачних маркера није довољан. Најбоља пракса је коришћене комбинације маркера да би се што тачније детектовале сенесцентне ћелије. С обзиром на комплексну природу сенесценције и у складу са начелима прецизне медицине, од суштинског је значаја разумевање целуларних и молекуларних механизма процеса.

## 2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

1. Испитати фенотипске карактеристике и способност диференцијације МСЋ из костне сржи и периферне крви здравих давалаца.
2. Испитати *in vitro* утицај ХУ на индукцију сенесценције МСЋ анализом фенотипа, активности сенесцентне  $\beta$ -галактозидазе, експресије сенесцентних маркера (p16INK4, p21Cip) и маркера ДНК оштећења ( $\gamma$ H2A.X).
3. Испитати имуномодулаторни утицај сенесценције МСЋ индуковане хидроксиуреом на пролиферацију Т лимфоцита и индукцију МСуЋ у популацији моноклеарних ћелија здравих давалаца периферне крви.
4. Анализирати ефекат сенесценције МСЋ индуковане ХУ на пролиферацију малигних JAK2-V617F позитивних ћелија и улогу ROS и TGF- $\beta$  у овом процесу.
5. Анализирати ефекат ХУ на TGF- $\beta$ 1 индуковану експресију про-фибротичног фенотипа MSC.

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Ова докторска дисертација је у целини урађена у Лабораторији за молекуларну онкологију, Института за медицинска истраживања, Универзитета у Београду, у оквиру пројекта Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије бр. ОИ175053 "Истраживање патогенезе хематолошких малигнитета", чији је руководилац научни саветник др Владан Чокић

#### 3.1. МАТЕРИЈАЛ

##### 3.1.1. Биолошки материјал

Као биолошки материјал за изоловање МНТ коришћена је периферна крв добијена венепункцијом од 20 добровољних здравих даваоца. Епифизни делови бутне кости су добијени од 2 мушка и 1 женског даваоца просечне старости 75 година (од 64 до 84 године) којима је оперативним путем уграђен вештачки кук. Писмена сагласност је добијена од сваког учесника у студији након њиховог информисања о сврси сакупљања биолошког материјала. Експериментални протокол је одобрен од стране Етичког одбора Клиничко болничког центра-Земун и Медицинског факултета, Универзитета у Београду.

##### 3.1.1.1. Ћелијске линије

У овом раду коришћене су ћелијске линије HEL 92.1.7, K562, HS5, MCF7 и MDA-MB-231. HEL 92.1.7 представљају хуману еритролеукемијску ћелијску линију које поседују хомозиготну JAK2-V617F мутацију. Ове ћелије су добијене захваљујући проф. др Силви Хермоут (Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire, Université de Nantes, France). K562 (ATCC, USA) је ћелијска линија хроничне мијелоидне леукемије која поседује Bcr/Abl фузиони ген. Обе ћелијске линије су гајене у комплетном RPMI-1640 медијуму (Biowest, France) у влажној атмосфери на 37°C са 5% CO<sub>2</sub>. Ћелије су пасажирани на 2-3 дана тако да почетна концентрација ћелија износи 2-4x10<sup>5</sup>/ml. Ћелије стромалне ћелијске линије, HS5 (ATCC, USA), као и ћелијске линије карцинома дојке (MCF7 и MDA-MB-231, ATCC, USA) су гајене у комплетном  $\alpha$ -MEM медијуму (*Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification*) ( $\alpha$ MEM, Biowest, France) са додатком 10% феталног говеђег серума (FBS енг. *Fetal Bovine Serum*, Biowest, France) и комбинацијом

антибиотици (пеницилин/стрептомицин, Biowest, France), који је мењан на 2-3 дана. Вијабилност и број хелија су одређени бојењем Трипан плавим.

### 3.1.2. Реагенси

Карактеристике примарних и секундарних антитела која су коришћена у експериментима су приказане у **Табели 1.** и **Табели 2.** Инхибитори сигналних путева и њихове карактеристике приказани су у **Табели 3.** Прајмери за PCR коришћени у експериментима приказани су у **Табели 4.**

**Табела 1.** Примарна антитела. (PE-фикоеритрин; FITC-флуоресцеин изотиоцијанат; APC-алофикоцијанин; ПЦ-проточна цитометрија; ИФ-имунофлуоресцентно обележавање; WB-Western blot).

АНТИТЕЛО	ПРОИЗВОЂАЧ	ПОРЕКЛО	ПРИМЕНА
CD90-PE коњуговано	BioLegend, California, USA	миш	ПЦ
CD44-FITC коњуговано	BioLegend, California, USA	миш	ПЦ
CD73- APC коњуговано	BioLegend, California, USA	миш	ПЦ
CD105-PE коњуговано	Invitrogen, USA	миш	ПЦ
CD45-FITC коњуговано	R&D, USA	миш	ПЦ
CD11b-FITC коњуговано	eBioscience, California, USA	миш	ПЦ
CDKN2A/p16INK4a	Abcam, UK	миш	ИФ
p21Cip	DakoCytomation A/S, DK	миш	ИФ
γH2A.X	R&D System, USA	миш	ИФ
HLA-DR APC коњуговано	BioLegend, CA, USA	миш	ПЦ
CD33-PE коњуговано	BioLegend, CA, USA	миш	ПЦ
CD14-FITC коњуговано	BioLegend, CA, USA	миш	ПЦ
CD15-PerCP коњуговано	BioLegend, CA, USA	миш	ПЦ
p-mTOR	Cell signaling Technology, USA	зец	WB
mTOR	Cell signaling Technology, USA	зец	WB

pERK1/2	Abcam, UK	зец	WB
ERK1/2	Abcam, UK	миш	WB
pp38	R&D System, USA	зец	WB
p38	R&D System, USA	зец	WB
pSTAT3	Abcam, UK	зец	WB
STAT3	Abcam, UK	зец	WB
JAK1	Santa Cruz Biotechnology, USA	зец	WB
TGF- $\beta$ рецептор 1	Santa Cruz Biotechnology, USA	миш	WB
TGF- $\beta$ рецептор 2	Santa Cruz Biotechnology, USA	миш	WB
pSMAD3	Santa Cruz Biotechnology, USA	миш	WB
SMAD3	Santa Cruz Biotechnology, USA	миш	WB
$\beta$ актин	R&D System, USA	миш	WB
$\alpha$ SMA	Abcam, UK	миш	ИФ
BrdU и BrdU -FITC коњуговано	Abcam, UK	миш	ПЦ

**Табела 2.** Секундарна антитела (HRP-пероксидаза рена, енг. *horse radish peroxidase*; FITC-флуоресцеин изотиоцијанат; WB-Western blot; ИФ-имунофлуоресцентно обележавање)

АНТИТЕЛО	ПРОИЗВОЂАЧ	ПОРЕКЛО	ПРИМЕНА
HRP коњуговано анти-мишје	Pierce, USA	коза	WB
HRP коњуговано анти-зечје	Santa Cruz Biotechnology, USA	коза	WB
FITC коњуговано анти-мишје	Sigma-Aldrich, USA	коза	ИФ

**Табела 3.** Цитокини и инхибитори сигналних путева

СУПСТАНЦА	ДЕЈСТВО	ПРОИЗВОЂАЧ
Аросинин	Инхибитор NADPH оксидазе (NOXs)	Sigma-Aldrich, USA
N-Acetyl Cysteine (NAC)	Сакупљач ROS-а	Sigma-Aldrich, USA
Rac1 инхибитор NSC23766	NOX 1 и 3 инхибитор	Sigma-Aldrich, USA
TBRi SB525334	Селективни инхибитор TGF- $\beta$ рецептора тип 1	Sigma-Aldrich, USA
Recombinant Human LAP	Пептид који везује и инактивира TGF- $\beta$ 1	R&D System, USA
Хумани рекомбинантни TGF- $\beta$ 1	Трансформишући фактор раста	R&D System, USA

**Табела 4.** Прајмери за PCR

Ген	Секвенца 5'-3'	Величина продукта (bp)	Т везивања прајмера	Произвођач
TGF- $\beta$ 1	F:GGGACTATCCACCTGCAAGA R:CCTCCTTGGCGTAGTAGTCG	239	51°C	Invitrogen, USA
GAPDH	F: ACCACAGTCCATGCCATCAC R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA	452	52°C	Invitrogen, USA

## 3.2. МЕТОДЕ

### 3.2.1. Изолација мононуклеарних ћелија

Венска крв здравих даваоца (30 ml) је прикупљана у епруветама са антикоагулансом K<sub>2</sub>EDTA. Узорци су разблаживани са стерилним фосфатним пуфером (PBS енг. *Phosphate buffered saline*, рН=7.2) којем је додат 2mM EDTA, у односу 1:1,2. 35 ml разблажене крви је пажљиво наношено на 15 ml лимфоцитног сепарационог медијума градијента густине 1,077 g/l (*Lymphocytes separation medium*, Caricorn Scientific GmbH, Germany) а одмах потом центрифугирано на 1400 rpm, 30 минута, на собној температури, без кочница. Након центрифугирања горњи слој плазме са тромбоцитима је аспириран и уклоњен, а међуслој са МНЋ је пажљиво сакупљен у нову епрувету. Ћелије су испране два пута у PBS, мешане са 0,4% раствором Трипан плавог (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA) у односу 1:9, а затим је ћелијски раствор наношен на *Bürker-Türk* плочицу са угравираном мрежицом за бројање ћелија. Живе ћелије су пребројане помоћу инвертног светлосног микроскопа (*Olympus*, Јапан) а број ћелија у милилитру медијума је рачунат по формули:

$$\text{бр. живих ћелија/ml} = \frac{\text{бр. ћелија у пољима}}{\text{бр. поља}} \times \text{коришћено разблажење ћелија у боји} \times 10^4$$

### 3.2.2. Изолација мезенхималних стромалних ћелија периферне крви

ПК МСЋ су изоловане по предходно описаном протоколу (Trivanović и сар., 2013). МНЋ, изоловане на предходно описан начин, су засејаване у броју  $2 \times 10^5$  по  $\text{cm}^2$  T-25 суда ( $25 \text{ cm}^2$ ) за ћелијску културу у комплетном храњивом медијуму  $\alpha$ MEM у влажној атмосфери на  $37^\circ\text{C}$  са 5%  $\text{CO}_2$ . ПК МСЋ су издвојене на основу своје способности да адхерирају за пластику, а неадхерентне ћелије су постепено елиминисане из културе мењањем медијума свака 3 до 4 дана. ПК МСЋ су гајене око 2 недеље до постизања супконфлуентности (80% конфлуентности) и уочавања колонија адхерентних ћелија са фибробластном морфологијом. Одлепљивање ћелија је рађено помоћу 0,25% трипсина са EDTA (Caricorn Scientific GmbH, Germany), а потом су ћелије опет засађиване у броју  $1,5\text{-}3 \times 10^4$  по  $\text{cm}^2$  суда. Свака наредна пасажа је рађена у истим условима, а након треће

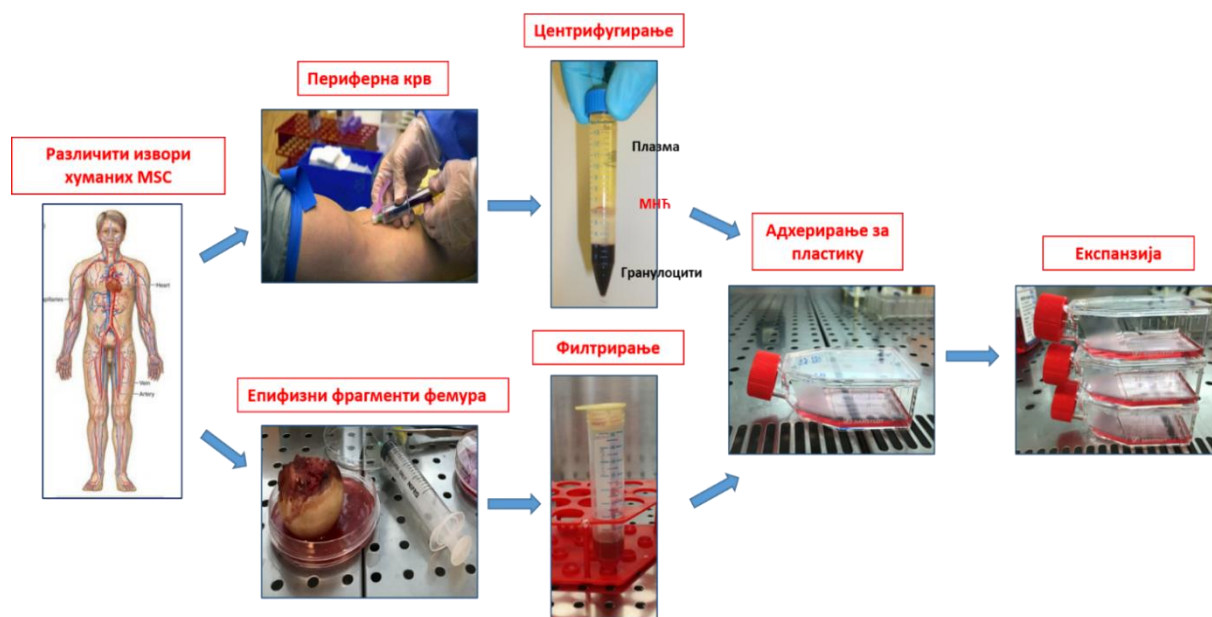


пасаже добијена је хомогена ћелијска култура (Слика 6.). Од засађених 20 узорка МНЋ периферне крви здравих даваоца, РВ МСЋ су успешно изоловане из 3 узорка.

### 3.2.3. Изолација мезенхималних стромалних ћелија костне сржи

КС МСЋ су изоловане из делова кости 3 даваоца, просечне сарости од 75 година, којима је оперативно замењен зглоб кука. Епифизни делови бутне кости су очишћени од заосталих делова меких ткива и стављани у посуду са комплетним  $\alpha$ -MEM медијумом. Костна срж је издвојена вишеструким испирањем трабекула кости медијумом и ћелијска суспензија је центрифугирана на 1600 rpm, 6 минута на собној температури. Након центрифугирања, супернатант са масним капљицама је одливен, а ћелије у талогу су испирани комплетним медијумом још 3 пута. Да би се уклонили делићи кости, ћелије су ресуспендоване и филтриране помоћу 70 $\mu$ m ћелијског филтера, а затим поново центрифугиране. Након пребројавања, ћелије су засађене у броју  $2 \times 10^5$  по  $cm^2$  суда за ћелијску културу. Даље гајење и култивисање је било идентично условима гајења ПК МСЋ (Слика 6.) КС МСЋ су успешно изоловане из делова бутне кости сва 3 даваоца.

Након изолације КС МСЋ и ПК МСЋ су коришћене у експериментима или залеђене на  $-70^\circ C$ , а потом су чуване у течном азоту.  $1 \times 10^6$  ћелија/ml су замрзаване у медијуму који се састоји од 10% DMSO и 90% FBS.



Слика 6. Поступак добијања хуманих МСЋ из периферне крви и костне сржи даваоца

### **3.2.4. Карактеризација мезенхималних стромалних ћелија**

Након треће пасаже МСЋ, вршена је њихова карактеризација на основу критеријума Комитета за мезенхималне матичне ћелије Међународног друштва за ћелијску терапију (Dominici и сар., 2006) а то су адхерентност за пластику, присуство фенотипа карактеристичног за МСЋ и способност диференцијације ка више ћелијских линија. Такође, анализиран је и ефекат хемиотерапеутског агенса, XY (Sigma-Aldrich, USA), на наведене карактеристике МСЋ.

#### **3.2.4.1. Имунофенотипизација мезенхималних стромалних ћелија**

Експресија површинских маркера анализирана је методом проточне цитометрије. Након гајења у стандардним условима МСЋ су одлепљиване помоћу 2mM EDTA и опране PBS-ом.  $2 \times 10^5$  МСЋ су инкубиране са 0,5% BSA, (енг. *Bovine serum albumine*) (Sigma-Aldrich, USA) у PBS-у 10 минута ради блокирања неспецифичног везивања протеина, а затим је додавано 4 $\mu$ l специфичног антитела. Присуство површинских маркера карактеристичних за МСЋ: CD90, CD44 и CD73 као и одсуство хематопоетских површинских маркера: CD45 и CD11b, испитивано је коришћењем специфичних антитела (Табела 1.). Након 30 минутног бојења на 4°C у мраку, ћелије су опране PBS-ом и фиксирани 2% формалдехидом. Експресија површинских антигена је анализирана помоћу проточног цитометра BD FACS Calibur (BD Bioscience, San Diego, CA, USA), а подаци су обрађени помоћу FCS express 5 софтвера.

#### **3.2.4.2. Диференцијација мезенхималних стромалних ћелија**

Ћелије су засађене у трипликату у плочи са 24 поља и гајене у стандардним условима до 80% конфлуентности. Затим, да би се усмериле ка остеогеној диференцијацији, ћелије су гајене у комплетном медијуму са 10mM  $\beta$ -глицерофосфатом, 10nm дексаметазоном (Applichem, Germany) и 50 $\mu$ g/ml аскорбинском киселином (Sigma-Aldrich, USA), током 21 дана. Адипогенеза је индукована медијумом са 0.5mM изобутилметилксантином (ИКСХ, енг. *isobutyl-methylxanthine*, Applichem, Germany), 125nM

индометацином, 5 $\mu$ M дексаметазоном, 850nM инсулином и 1 $\mu$ M розиглитазоном (Sigma-Aldrich, USA), у ком су ћелије гајене 21 дан. Медијуми су мењани свака 2-3 дана, а након завршене диференцијације ћелије су фиксиране 4% формалалдехидом. Ефикасност диференцијације одређена је бојењима *Oil Red O*, ради доказивања липидних капи у ћелији и *Alizarin Red S* (Merck Chemicals, Germany), којим су бојени депои калцијума. Анализа ћелија је вршена инвертним светлосним микроскопом (Olympus BX51, Olympus DP25, Japan).

### **3.2.5. Анализа вијабилности ћелија МТТ тестом**

Пролиферација и вијабилност МСЋ и HEL ћелија су анализиране 3-(4,5-Диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид (МТТ) тестом као што је описано раније (Krstić и сар., 2015). У сврху анализе ефекта ROS и NO ћелије су третиране H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Santa Cruz Biotechnology, USA), AAPH (енг. *2,2'-azobis 2 amidinopropane dihydrochloride*)-генератор ROS и DEA (енг. *Diethylamine nonoate*, донор NO) (Sigma-Aldrich, USA). Ћелије су засејаване у плочи са 96 поља у концентрацији од 10<sup>4</sup> по пољу. Након одговарајућих третмана, МТТ (Sigma-Aldrich, USA) је додат у свако поље тако да финална концентрација буде 0,5mg/ml а потом су ћелије инкубиране 2 сата на 37°C. Ћелије које су метаболички активне редукују тетразолијумску боју у нерастворљиви формазан, љубичасте боје. Након инкубације, медијум је уклоњен а преципитирани кристали формаза су растварани у 100 $\mu$ l изопропанола:DMSO (3:2). Апсорбанца је читана на 540nm на аутоматском ELISA читачу за микротитарске плоче (Labsystems Multiskan PLUS, Finland).

#### **3.2.5.1. Вијабилност HEL ћелија у кокултури са мезенхималним стромалним ћелијама**

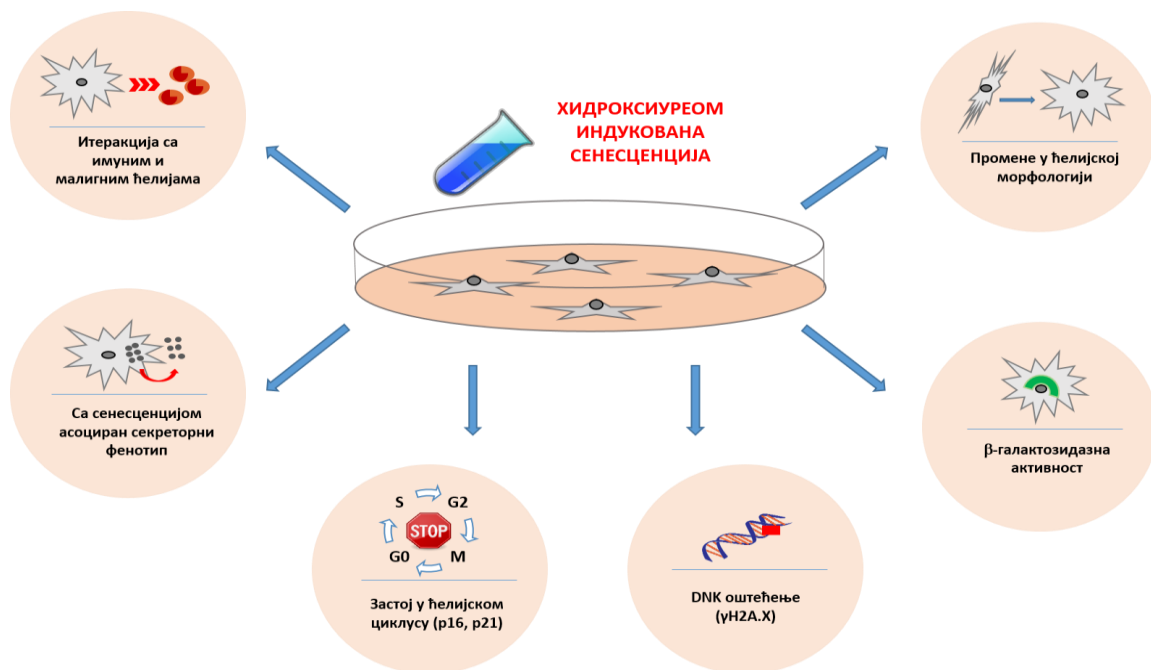
Утицај МСЋ третираних ХУ на вијабилност HEL ћелија испитиван је у кокултури, а након поређења са вијабилношћу HEL ћелија у ко-култури са нетретираним МСЋ и самостално пролиферишућим HEL ћелијама. Ћелије су гајене током 3 дана након чега је рађен МТТ тест а вијабилност HEL ћелија је рачуната према следећој формули:

Апсорбанца HEL ћелија = (MCT (+/-XY) + HEL апсорбанца) - MCT (+/-XY) апсорбанца

Тест је извођен под претпоставком да HEL ћелије у ко-култури не мењају значајно пролиферацију MCT.

### 3.2.6. Анализа хидроксиуреом индуковане сенесценције мезенхималних стромалних ћелија

За анализу утицаја XY на индукцију сенесценције (Слика 7.), MCT су третиране различитим концентрацијама XY (0-600 $\mu$ M) у различитим временским периодима (0-6 дана). Да би се утврдила стабилност сенесцентног фенотипа, ћелије третиране XY током 3 дана су гајене додатна 3 дана у комплетном медијуму без третмана. Такође, испитиван је и утицај инхибитора сигналних путева (Табела 3.) на XY индуковану сенесценцију MCT (XY-C-MCT).



Слика 7. Карактеристике XY-C-MCT

### 3.2.6.1. Промене у ћелијској морфологији након третмана хидроксиуреом

За анализу промена у ћелијској морфологији третиране и нетретиране МСТ $\bar{h}$  су бојене кристал виолет бојом. Након одговарајућег третмана, ћелије у монослоју су опране 2 пута раствором PBS а потом су фиксирани хладним метанолом током 2 минута. Фиксирани ћелије су бојене 0,1% раствором кристал виолет боје (енг. *Cristal violet*, Sigma-Aldrich, USA) на собној температури и инкубирани 10 минута за бојење нуклеуса или 20 минута за бојење целе ћелије. Након испирања дестилованом водом ћелије су анализирани и фотографисани инвертном светлосном микроскопијом.

### 3.2.6.2. Активност ензима $\beta$ -галактозидазе

$\beta$ -галактозидазна активност је анализирана уз помоћ кита за хистохемијско бојење сенесцентних ћелија (енг. *Senescence Cells Histochemical Staining Kit*, Sigma-Aldrich, USA) према упутству произвођача. Помоћу овог кита, детектују се преципитати плаве боје настали разградњом хромогеног једињења *X-gal* (5-бромо-4-хлоро-3-индолил- $\beta$ -D-галактопиранозид), помоћу ензима  $\beta$ -галактозидазе који се акумулира у лизозомима сенесцентних ћелија (Kurz и сар, 2000). Након третмана ХУ, МСТ $\bar{h}$  су опране PBS-ом а потом фиксирани раствором за фиксацију током 10 минута. Након фиксирања, ћелије су обојене раствором који садржи *X-gal* (*X-gal*, 5-бромо-4-хлоро-3-индолил- $\beta$ -D-галактопиранозид) на 37°C преко ноћи, у условима без CO<sub>2</sub>. Најмање 5 насумично одабраних поља по узорку је фотографисано и пребројане су  $\beta$ -галактозидаза позитивне плаво-зелено обојене ћелије. У експерименту у ком је утврђиван ефекат инхибиције mTOR упоредо са ХУ третманом КС МСТ $\bar{h}$  су третиране mTOR инхибитором, еверолимусом (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) у концентрацији од 100 nM а потом је анализирана  $\beta$ -галактозидазна активност. Анализиран је и број AVO (енг. *acidic vesicular organelle*) након окридин оранж (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany) бојења. Акридин оранж је пермеабилна боја која у везикулама које садрже киселину као што су лизозоми, емитује наранцасту флуоресценцу која је детектована епи-флуоресцентним микроскопом (Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Немачка).

### 3.2.6.3. Анализа експресије инхибитора циклин зависних киназа (p16, p21) и маркера ДНК оштећења ( $\gamma$ H2A.X)

p16, p21 и  $\gamma$ H2A.X (енг.  *$\gamma$ -histone family member X*) су детектовани имунофлуоресцентним бојењем. p16 и p21 су инхибитори циклин зависних киназа које ћелија користи да заустави ћелијски циклус и значајни су маркери сенесценције (Hernandez-Segura и сар., 2018). Акумулација  $\gamma$ H2A.X, маркера ДНК оштећења, је значајна у одржавању сенесценције (Ishaq и сар., 2018).  $10^5$  ћелија је посађено на округле стаклене љуспице у плочи са 24 поља и гајене су до постизања 50% конфлуентности. Након третмана ХУ, ћелије су фиксирани 4% параформалдехидом 3 минута а затим су пермеабелизоване помоћу 0.2% *Triton X-100* 5 минута. Да би се блокирало неспецифично везивање протеина, ћелије су инкубирани са 3% BSA у PBS-у 30 минута. Након блокирања, ћелије су инкубирани са одговарајућим разблажењима примарних антитела (**Табела 1.**) 30 минута, а затим и са одговарајућим разблажењима секундарних антитела (**Табела 2.**) и DAPI бојом (енг. Diamidine-20 -phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich, USA) у концентрацији од 1 $\mu$ g/ml додатних 30 минута. Визуализација једара је омогућена DAPI бојењем. Након испирања PBS-ом љуспице са ћелијама су фиксирани на микроскопске плочице помоћу *DABCO-Mowiol* медијума (Sigma-Aldrich, USA) и анализирани епи-флуоресцентним микроскопом (Axioskop 2 plus, Carl Zeiss, Немачка).

### 3.2.7. Анализа ћелијског циклуса и апоптозе

Анализа ћелијског циклуса је рађена проточном цитометријом након бојења пропидијум јодидом. Пропидијум јодид је флуоресцентна боја која пролази кроз мембрану пермеабелизованих ћелија и везује се за нуклеинске киселине омогућавајући одређивање фаза ћелијског циклуса на основу количине ДНК. Након култивације и одговарајућих третмана у плочи са 6 поља, ћелије су одлепљене трипсином и фиксирани леденим 70% етанолом 30 минута на 4°C. Ћелије су потом опране PBS-ом и центрифугирани на 1600 rpm 8 минута. Да би се елиминисало бојење РНК молекула, ћелијски талог је ресуспендован са 50 $\mu$ l раствора *RNase A* (Sigma-Aldrich, USA) у PBS-у (финалне концентрације 100  $\mu$ g/ml). Након тога, у узорак је додато 400 $\mu$ l раствора

пропидијум јодида (Molecular Probes, Life Technologies, USA) финалне концентрације 50µg/ml а потом су ћелије инкубиране 30 минута у мраку на собној температури. Интензитет флуоресцентне боје пропидијум јодид је квантификован проточним цитометром BD FACS Calibur (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Количина ДНК и сврставање по фазама ћелијског циклуса је анализирано помоћу ModFit LT 5 софтвера (Verity Software House, USA).

Апоптоза је анализирана анексин V–флуоресцеин изотиоцијанат (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) и пропидијум јодид бојењем према упутству произвођача и као што је раније описано код *Jurišić* и сар. (Jurišić и сар., 2004). Након бојења реакција је прекинута додавањем анексин V везујућег пуфера (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany). Контролне ћелије су биле ћелије бојене само анексин V или пропидијум јодидом. Ћелије су анализирани проточним цитометром BD FACS Calibur и Cell Quest софтвером (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Анексин V се везује за фосфатидилсерин, који се у раној апоптози премешта са унутрашње на спољашњу страну ћелијске мембране. Стога, рано апоптотичне ћелије представљају анексин V позитивне ћелије. Са друге стране касно апоптотичне ћелије би биле двоструко позитивне (Анексин V+/пропидијум јодид+), јер због нарушености пермеабилитета ћелијске мембране пропидијум јодид улази у ћелију и везује се за ДНК.

### 3.2.7.1. Бромодеооксиуридин бојење

Бромодеооксиуридин (BrdU, енг. *bromo-deoxyuridine*) есејем су анализирани ћелије у S фази ћелијског циклуса. Након култивације у плочи са 6 поља и ХУ третмана у трајању од 2 и 5 дана, третиране и нетретиране МСЋ су инкубиране са 10µM BrdU (**Табела 1.**) и остављене у култури још 24h. Потом су ћелије трипсинизоване и третиране 2M HCl током 30 мин ради денатурације ДНК. Неутрализација је извршена помоћу 0,1 M боракса а потом су ћелије опране раствором PBS. Након прања ћелија извршено је бојење са 5µl BrdU антителима (**Табела 1.**) током 30 мин у мраку, па је извршено бојење пропидијум јодидом и анализа ћелијског циклуса како је наведено у 3.2.3.4.

### 3.2.8. Анализа експресије протеина *Western blot* методом

Ниво експресије протеина ERK1/2, p38, STAT3, STAT5, SMAD3, TGF $\beta$  1 и 2 рецепторА, mTOR, као и њихових фосфорилисаних форми, су анализирани *Western blot* методом као што је раније описано у Обрадовић, 2019.

#### 3.2.8.1. Изолација протеина

МСЋ и HS5 ћелије су третиране 200 $\mu$ M ХУ у плочи са 6 поља, густине од 10<sup>5</sup> ћелија по пољу. Након 3 дана ћелије су опране PBS-ом и лизирание RIPA пуфером (2mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 7.6, 0.1% SDS, 150mM NaCl, 1% Na-деоксихолат, 1% Тритон X-100, 50mM NaF) којем су додати 1mM Na-ортованадат и коктел инхибитора протеаза (Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA), током 30 минута на леду. Укупни ћелијски лизати су центрифугирани на 12.000 rpm, 15 минута на 4°C и чувани на -80°C до употребе. ВСА (енг. *Bicinchoninic acid*, Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA) тест, који се заснива на мерењу апсорбанце узорка након додавања ВСА реагенса и поређењем са одговарајућим стандардима познате концентрације, је коришћен за одређивање концентрације протеина.

#### 3.2.8.2. Електрофореза и трансфер протеина на мембрану

Одређена концентрација укупног ћелијског лизата је мешана са пуфером за редукцију (250mM Tris pH 6,8, 30% глицерол, 10% SDS, 20% глицерол, 5%  $\beta$ -меркаптоетанол и 0,02% бромфенол плаво) у односу 5:1. Узорци са редукционим пуфером су инкубирани 7 минута на 95°C а затим су наносени на 8% или 10% полиакриламидни гел дебљине 1 или 1,5 mm и раздвајани SDS полиакриламидном гел електрофорезом (SDS-PAGE, engl. *Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*) при константној струји од 110 V током 1,5 сата. На гел су такође наносени и протеини познатих молекулских маса *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*, 10-250 kDa (Thermo Fisher Scientific, Lithuania). Након сепарације хомогената ћелија вршен је полусуви трансфер на поливинилиден флуоридну мембрану (GE Healthcare, USA) на 110mA током 1,5 сата на апарату PeqLAB (VWR International Ltd, UK).



### 3.2.8.3. Детекција протеина помоћу специфичних антитела

Да би се блокирало неспецифично везивање протеина, мембране су инкубиране у 4% раствору млека у 0,5% Tween-20 у PBS-у (PBST) током 60 минута на собној температури, након чега су мембране испиране у PBST и инкубиране са разблажењима одговарајућих примарних антитела (**Табела 1.**) преко ноћи на 4°C. Примарна антитела су разблажена према упуству произвођача у 4% млеку у PBST. Након инкубације мембрана са примарним антителом, мембране су испиране PBST и инкубиране са разблаженим секундарним антителима (**Табела 2.**) коњугованим пероксидазом рена у 4% млеку током 2 сата на собној температури. Потом, мембране су испиране PBST-ом и завршно PBS-ом током 30 минута. Обележени протеини на мембранама визуализовани су коришћењем хемилумисцентних реагенаса (ECL, енг. *enhanced chemiluminescence reagent system*; GE Healthcare, UK). Протеини су детектовани помоћу *ChemiDoc Imaging System* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) а интензитет трака је утврђиван помоћу дензитометријске обраде *Image Lab* софтвером (Bio-Rad Laboratories, Inc. Version 6.0.0.25) а након нормализације са  $\beta$ -актином.

### 3.2.9. ELISA TGF- $\beta$ 1

Секретовани TGF- $\beta$ 1 у ћелијском супернатанту је квантификован помоћу TGF- $\beta$ 1 ELISA (енг. *enzyme-linked immunosorbent assay*) кита (Abcam, Cambridge, UK) а по упуству произвођача. Контролне МСТ $\beta$ , МСТ $\beta$  третиране 200 $\mu$ М ХУ и МСТ $\beta$  третиране 200 $\mu$ М ХУ и 100 $\mu$ М апоцинином (Sigma-Aldrich, USA) су гајене током 3 дана. Након завршене инкубације, ћелије су опране PBS-ом 3 пута и гајене у медијуму без серума наредна 2 дана. Медијум је сакупљен и центрифугиран на 1200 rpm и чуван на -20°C до ELISA анализе. Ћелије су лизирание RIPA пуфером и измерена је концентрација протеина ради нормализације услова.

100 $\mu$ l сваког узорка или стандарда познате концентрације је додато у ELISA плочу са 96 поља и инкубирано 2 и по сата на собној температури како би се извршило везивање антигена из узорка на површину плоче. По завршеној инкубацији, поља су испирана 4 пута раствором за испирање. Потом, 100 $\mu$ l раствора TGF- $\beta$ 1 антитела је додато у свако поље и инкубирано 1 сат на собној температури. Након инкубације свако

поље је опрано 3 пута пуфером за испирање а затим је у свако поље сипано по 100µl стрептавидин-HRP (енг. *horse radish peroxidase*) раствора са којим су узорци остављени током 45 минута на собној температури. Узорцима је додато 100µl ТМВ (енг. 3,3',5,5'-*Tetramethylbenzidine*) хромогеног супстрата за HRP и инкубација је настављена још 30 минута у мраку на собној температури. Оксидација ТМВ доводи до појаве плаве боје раствора, при чему је интензитет боје директно пропорционалан количини антигена у узорку. Да би се реакција зауставила, 50µl СТОП раствора је додато у свако поље а потом је апсорбанца читана на 450nm на аутоматском ELISA читачу за микротитарске плоче. Концентрација TGF-β1 у узорцима је одређивана на основу стандардне криве.

### **3.2.10. Анализа генске експресије на нивоу информационе РНК**

#### **3.2.10.1. Реверзна транскрипција и реакција ланчане полимеризације**

Ради одређивања експресије транскрипта TGF-β1 гена у МСЋ након третмана ХУ, из ћелијског талоба је изолована укупна РНК. Реакцијом реверзне транскрипције добијена је комплементарна ДНК од укупне РНК из узорка. Експресија TGF-β1 транскрипта одређена је путем ланчане реакције полимеризације (енг. *Polymerase Chain Reaction* - PCR) коришћењем прајмера приказаних у **Табели 4.** као што је претходно описано (Trivanović и сар., 2016).

#### **3.2.10.2. РНК изолација**

МСЋ су засејане у плоче са шест поља у концентрацији од  $2 \times 10^5$  ћелија по пољу. Након достизања супконфлуентности, ћелије су третиране 200µM ХУ и 100µM апоцинином 3 дана а затим су лизиране додавањем 1ml хладног TRIzol-a (Ambion Life Technology, USA) по пољу. Ћелије су лизиране током 5 минута а потом су узорци пребачени у епендорфице са 200µl хлороформа. После 3 минута инкубације на собној температури, лизат је снажно промућкан, а затим центрифугиран на 12.000 rpm, 4°C током 15 минута. На овај начин, у лизату су издвојене три фазе: доња, црвене боје, фенол-хлороформ фаза са протеинима; интерфаза, беле боје са ДНК; и горња, безбојна фаза са РНК. Горња фаза је пажљиво сакупљена у епендорфице са 500 µl изопропанола и узорци су инкубирани 10 минута на собној температури. Узорци су центрифугирани на 12.000 rpm, 4°C током 15 минута. Након одливања супернатанта у епендорфицама је

остао бели талог са РНК који је опран 70% етанолом и центрифугиран на 12.000 rpm, 4°C, 5 минута. Након центрифугирања, талог је осушен на собној температури 10 минута, а затим је растворен у дестилованој води пречишћеној од нуклеаза. Концентрација и чистоћа РНК је измерена помоћу спектрофотометра *NanoDrop* (Implen, Germany) а узорци су до употребе чувани на -80°C.

### 3.2.10.3. Реверзна транскрипција

Тотална РНК изолована на претходно описан начин, је служила за добијање комплементарне ДНК према упутству произвођача уз помоћ кита за реверзну транскрипцију *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, USA). 2µg РНК је додато у смешу која се састојала од 1µl реверзне транскриптазе, 2µl деоксинуклеотида, 1µl прајмера, 0,5µl рибонуклеазних инхибитора и дестиловане воде без нуклеаза која је додата до укупне запремине од 20µl. Реверзне транскрипција је вршена у термоблоку апарата MultiGene optimax (Labnet, USA) према следећем програму: 25°C 10 минута, 37°C 120 минута и 85°C 5 минута. ДНК добијена на овај начин је коришћена у семиквантитативном PCR-у у реалном времену (RT-PCR, енг. *real time polymerase chain reaction*).

### 3.2.10.4. RT-PCR

Реакциона смеша се састојала од 1µl cDNA, прајмера (10µM), раствора деоксинуклеотида (500 µM), MgCl (2mM), Taq DNK полимеразе (50 U/ml) (PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific, USA) и дестиловане воде пречишћене од нуклеаза до финалне запремине од 25µl. Амплификација се вршила по програму који се састојао од иницијалне денатурације, 5 минута на 94°C; 33 циклуса: денатурације, 45 секунди на 94°C, везивања прајмера, 30 секунди на 52–54°C и елонгације 90 секунди на 72°C; терминалне елонгације 10 минута на 72°C и хлађење на 8°C до употребе. За детекцију експресије TGF-β1 коришћени су прајмери приказани у **Табели 4**. За нормализацију количине комплементарне ДНК у сваком узорку коришћен је глицералдехид 3-фосфат дехидрогеназа (GAPDH, енг. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*).

### 3.2.10.5. Раздвајање продуката електрофорезом

Продукти PCR су раздвајани на 1,5% агарозном гелу са 0,4 $\mu$ g/ml етидијум-бромидом (Sigma-Aldrich, USA) у Трис ацетатном-EDTA пуферу током 50 минута на 100 V и 400 mA. Траке су визуализоване уз помоћ UV светлости у програму BioDoc Analyze (Analytik Jena Group, Germany). Интензитет трака је квантификован помоћу Image Master total lab и NIH-Image J софтвера и интензитет експресије TGF- $\beta$ 1 је нормализован у односу на експресију GAPDH.

### 3.2.11. Детекција интраћелијског ROS

Унутраћелијска акумулација ROS је процењивана помоћу боје 2',7'-дихлорофлуоресцеин диацетата (DCFDA, енг. 2',7' –*dichlorofluorescein diacetate*, Sigma–Aldrich, USA) која се интрацелуларно конвертује помоћу ензима естеразе, у присуству ROS, у флуоресцентну супстанцу 2',7' –дихлорофлуоресцеин (DCF, енг. 2',7' –*dichlorofluorescein*). 2x10<sup>4</sup> ћелија по пољу је посејано у плочу са 96 поља и третирано ХУ у растућој концентрацији (0-400 $\mu$ M) током 0-4 дана. Након тога ћелије су опране PBS-ом и инкубиране са 5  $\mu$ M DCFDA у PBS-у током 20 минута, а потом су лизиране 0,1 M NaOH. Ћелијски лизати су пребачени у тамну плочу са 96 поља и флуоресценца је детектована помоћу флуоресцентног читача микротитарских плоча Chameleon tm, 425-104 multilabel counter (Bioscan, Washington, USA).

### 3.2.12. Детекција интраћелијског NO

Унутраћелијски NO се детектује помоћу DAF (енг. *diacetate 4-amin-5-methylamino-2', 7'-difluoroscein diacetate*) који се у присуству NO конвертује у флуоресцентни бензотриазол, DAF2. 10<sup>5</sup> МСЋ по пољу је посејано у плочу са 24 поља и третирано ХУ у концентрацији од 200  $\mu$ M током 3 дана. Након тога ћелије су опране PBS-ом и инкубиране са 5  $\mu$ M DAF током 20 минута, а потом је флуоресценца је детектована проточном цитометријом.

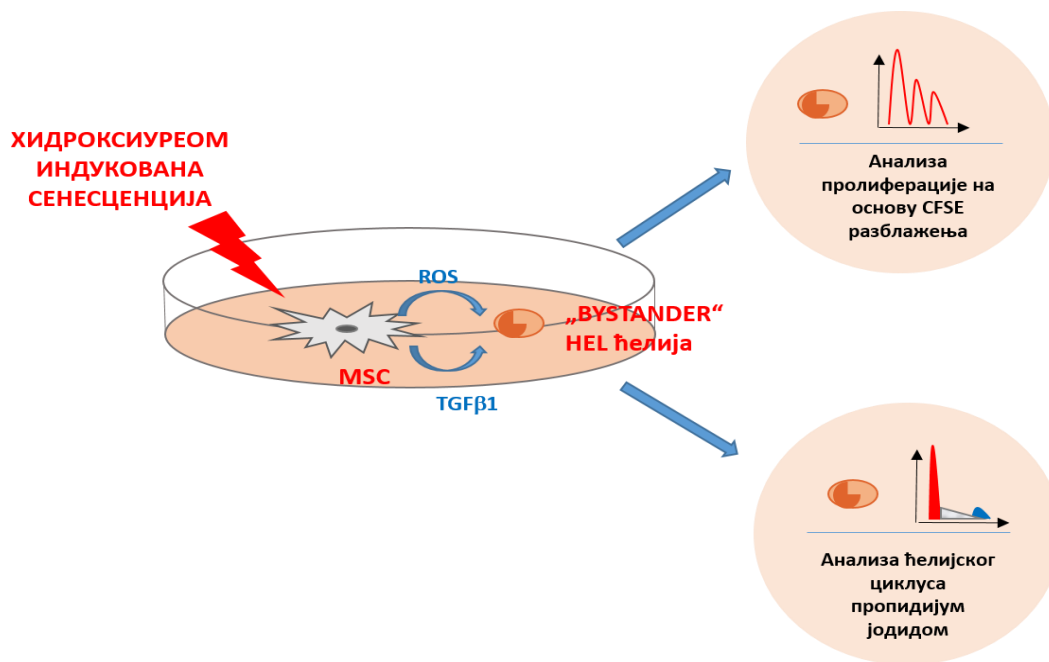
### 3.2.13. Анализа ћелијске адхезије

Да бисмо испитали како сенесценција МСЋ утиче на адхерентност HEL ћелија у ко-култури, 10<sup>5</sup> МСЋ је посађено на округле стаклене љуспице у плочи са 24 поља и

инкубиране преко ноћи у стандардним условима. Ћелије су затим третиране током 3 дана са 200  $\mu\text{M}$  ХУ ради индукције сенесценције. Нетретиране ћелије служиле су као контрола. Након тога, једра МСЋ су бојена у плаво Hoechst 33342 трихидрохлорид бојом (Sigma–Aldrich, USA) у концентрацији од 5  $\mu\text{g/ml}$  током 15 минута на собној температури а потом су МСЋ опране два пута PBS-ом. HEL ћелије су, обојене зелено помоћу CFSE (енг. *carboxyfluorescein succinimidyl ester*, Sigma–Aldrich, USA) боје у концентрацији од 1  $\mu\text{M}$  током 10 минута, на собној температури. Затим је  $10^5$  обојених HEL ћелија су додате у свако поље са третираним и нетретираним МСЋ и инкубација је настављена још 3 дана на 37°C са 5%  $\text{CO}_2$  у влажној атмосфери. По завршетку инкубације љуспице са ћелијама су опране два пута PBS-ом да се уклоне неадхериране HEL ћелије и фиксиране 4% формалдехидом а потом су лепљене за микроскопске плочице помоћу DABCO-Mowiol медијума и фотографисане епи-флуоресцентним микроскопом. Осам до десет насумично одабраних поља са сваке љуспице је фотографисано и зелене ћелије су пребројане помоћу ImageJ софтвера.

#### **3.2.14. Кокултура мезенхималних стромалних ћелија и HEL ћелија за анализу *bystander* ефекта**

Индиректни, *bystander* ефекат је биолошки ефекат третираних ћелија на суседне нетретиране ћелије који се не може објаснити директним утицајем компоненте коришћене за третман (Asur RS и сар., 2009). За процену *bystander* ефекта ХУ индукованих сенесцентних МСЋ на HEL ћелије, анализирана је пролиферација и ћелијски циклус HEL ћелија након ко-културе са ХУ индукованим сенесцентним и контролним МСЋ (Слика 8.).



Слика 8. Bystander ефекат ХУ индуковане сенесценције МСЋ на малигне HEL ћелије

### 3.2.14.1. Анализа пролиферације HEL ћелија у кокултури

МСЋ су третиране  $200\mu\text{M}$  ХУ током три дана да би се индуковала сенесценције. Нетретиране МСЋ су гајене у стандардном медијуму током истог периода. Да би на крају третмана имали приближно исти број ХУ третираних и нетретираних ћелија, а због циторедуктивног ефекта ХУ, третираних ћелија је засађено  $0,15 \times 10^6$ , а нетретираних  $0,1 \times 10^6$  по пољу. Овај однос је добијен претходним бројањем ХУ третираних и нетретираних ћелија по истеку инкубационог периода од 3 дана. По завршетку инкубационог периода, ХУ третиране МСЋ су опране 3 пута медијумом да се уклоне остаци ХУ, а нетретираним ћелијама је замењен медијум свежим стандардним медијумом.

$10^6$  HEL ћелија су растворене у 1ml PBS којем је додато 0,1 % FBS и CFSE (енг. *carboxyfluorescein succinimidyl ester*) боја у концентрацији  $1\mu\text{M}$ . Ћелије су бојене инкубирањем 10 минута на собној температури. Да би се зауставила реакција, додат је 1ml FBS и ћелије су инкубирале још додатних 10 минута а потом опране три пута са PBS-ом. Потом,  $0,3 \times 10^6$  HEL (*bystander*) ћелија је додавано по пољу са ХУ третираним и нетретираним МСЋ и инкубација је настављена још 3 дана. Додатних  $0,3 \times 10^6$  CFSE обојених HEL ћелија су самостално пролиферисале у култури током 3 дана и служиле су као контролне ћелије. HEL ћелије које су одмах након CFSE бојења третиране

Митомицином (40  $\mu\text{g/ml}$ ) 30 минута, како би се зауставила пролиферација, а потом фиксиране, су коришћене за мерење почетне количине CFSE боје и означене су као ћелије 0 времена.

За анализу пролиферације HEL ћелија, по завршеној инкубацији, ћелијска суспензија је сакупљена и ћелије су фиксиране 2% формалдехидом у PBS-у. CFSE разблажење је анализирано проточном цитометријом помоћу BD FACS Calibur (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Број ћелијских деоба и пролиферациони индекси су анализирани помоћу FCS express 5 софтвера (De Novo Software, Los Angeles, CA). Пролиферациони индекс, просечан број деоба које су ћелије имале од почетка култивисања, је рачунат као збир ћелија у свим генерацијама подељен са бројем оригиналних, родитељских ћелија (Roederer и сар., 2011).

#### **3.2.14.2. Анализа ћелијског циклуса HEL ћелија у кокултури**

МСЋ су гајене на исти начин као што је описано у одељку 3.2.9.1. У свако поље са ХУ третираним и нетретираним МСЋ додато је  $0,3 \times 10^6$  HEL ћелија и гајене су још 3 дана.  $0,3 \times 10^6$  HEL ћелија је самостално пролиферисало у култури и ове ћелије су означене као контролне. По завршетку инкубације контролне HEL ћелије и суспензија са HEL ћелијама које нису адхерирале за МСЋ су сакупљене, фиксиране леденим 70% етанолом 30 минута на  $4^\circ\text{C}$  и бојене пропидијум јодидом за анализу фаза ћелијског циклуса. Поступак бојења пропидијум јодидом и анализа ћелијског циклуса су описани у одељку 3.2.3.4.

#### **3.2.15. Имуномодулаторни утицај хидроксуреом индукованих сенесцентних мезенхималних стромалних ћелија**

Имуномодулаторни ефекат ХУ индукованих сенесцентних МСЋ је испитан анализом улоге ових ћелија у индукцији МСУЋ из МНЋ периферне крви и пролиферацији Т-лимфоцита након стимулације.

##### **3.2.15.1. Пролиферација Т лимфоцита у кокултури**

Да би се испитао утицај ХУ индукованих сенесцентних МСЋ на пролиферацију Т лимфоцита у укупној популацији МНС, ове ћелије су гајене у ко-култури током 3 дана. МСЋ су третиране ХУ као што је описано у одељку 3.2.9.1. МНЋ су изоловане из венске

крви здравих даваоца као што је описано у одељку 3.1.2.1. и бојене CFSE бојом по истом принципу као и HEL ћелије (одељак 3.2.9.1.). Пролиферација Т лимфоцита је стимулирана анти-CD3/CD28 антителом (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) по упуству произвођача. 25µl/ml CD3/CD28 Т ћелијског активатора је додато у суспензију са  $10^6$  MNC.  $0,3 \times 10^6$  активираних и CFSE обојених МНЋ је додато по пољу са третираним и нетретираним МСЋ. Такође, као контролне ћелије коришћене су CD3/CD28 активирани и неактивирани CFSE обојени МНЋ, које су гајене без МСЋ. Пролиферација Т лимфоцита процењена је на основу степена разблажења CFSE боје проточном цитометријом.

### **3.2.15.2. *In vitro* индукција мијелоидних супресорних ћелија**

МНЋ су гајене са МСЋ да би се испитао њихов утицај на модулацију МСУЋ током 3 дана. Као контролне ћелије служиле су МНЋ које су гајене у стандардном медијуму током истог периода. Након гајења, ћелије су анализирани на експресију површинских маркера за МСУЋ тако што су инкубирани 30 минута на 4°C у мраку са 4µl анти-CD33, анти-HLA DR, анти-CD14 и анти-CD15 антитела (**Табела 1.**). По завршеној инкубацији ћелије су опране од вишка антитела PBS-ом и фиксирани 2% формалдехидом а потом анализирани проточном цитометријом.

### **3.2.16. Анализа фиброзе**

Да би се утврдио утицај TGF-β1 на испољеност профибротичног фенотипа, КС МСЋ су третиране TGF-β1 (**Табела 1.**) у растућим концентрацијама (2,5, 5 и 10 ng/ml) а потом је испитана експресија фибробластног αSMA маркера (**Табела 1.**) имунофлуоресцентном методом. Ефекат ХУ-С-МСЋ на профибротични фенотип је испитан након котретмана ХУ (200µM) и TGF-β1 (5 ng/ml) на основу експресије αSMA маркера. Имунофлуоресцентно бојење вршено је као што је описано у одељку 3.2.3.3.

### **3.2.17. Статистичка анализа**

Сви резултати су представљени у виду слика, графикана и табела. За обраду и графичку презентацију података коришћени су статистички програми SPSS (Statistical



Package for the Social Sciences for Windows, SPSS Inc. USA) и GraphPad Prism (San Diego, Kalifornija, USA).

Експерименти су поновљени најмање 3 пута и резултати су приказани као средње вредности  $\pm$  стандардна грешка средње вредности. Статистичка обрада резултата вршена је применом параметријских (Студентов т-тест и једнофакторска анализа варијансе (*one way ANOVA*) и непараметријских (*Mann Whitney*) тестова. Сви статистички тестови су посматрани на нивоу значајности нулте хипотезе  $p < 0,05$ .

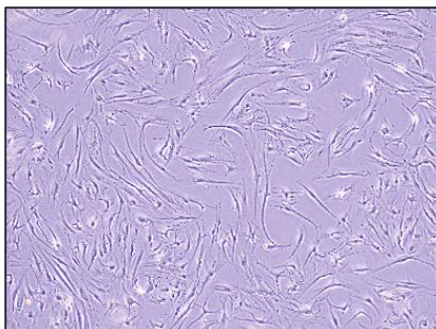
## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. КАРАКТЕРИСТИКЕ МЕЗЕНХИМАЛНИХ СТРОМАЛНИХ ЋЕЛИЈА

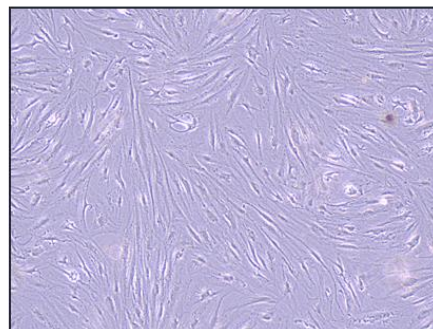
#### 4.1.1. Морфологија мезенхималних стромалних ћелија и способност адхерирања за пластику

Морфолошке карактеристике МСЋ изолованих из периферне крви и костне сржи проучаване су помоћу инверзног фазно-контрастног микроскопа током гајења у ћелијској култури. У првим данима након изолације, примећене су колоније хетерогеног изгледа, које су поред дугачких, вретенастих ћелија чврсто адхерираних за подлогу, чиниле и нешто мање ћелије полигоналног изгледа, слабије адхерентности. Након двонедељног култивисања ћелија, већинску популацију су чиниле дугачке и вретенасте, адхерентне МСЋ фибробластне морфологије, док је популација слабије адхерентних полигоналних ћелија редукована испирањем и променом медијума. Око 20. дана гајења ћелија, колоније МСЋ су изгледале хомогено и достизале су супконфлуентност (80-90% испуњености површине флашка) (Слика 9. А и Б), те су надаље одлепљиване и пасажиране. Ћелије су одржаване у култури до 12. пасаже, до које су задржавале униформан изглед и фибробластну морфологију.

А



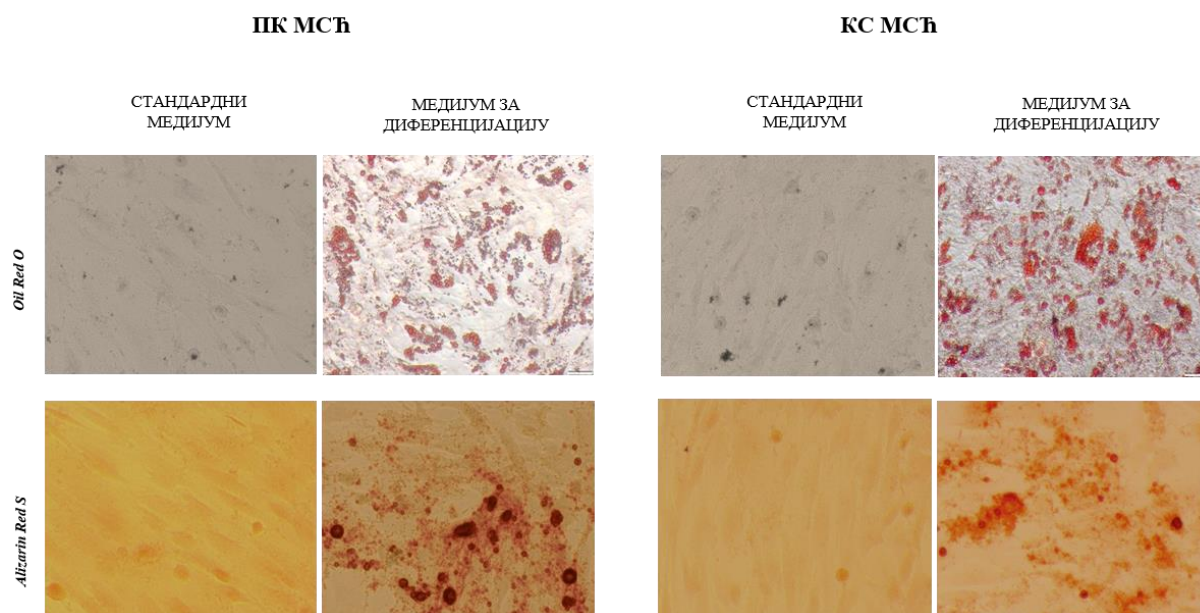
Б



**Слика 9. Морфологија МСЋ.** Морфолошке карактеристике МСЋ изолованих из периферне крви А) и костне сржи Б) након 3. пасаже. Анализирано инвертним светлосном микроскопијом (увеличање 10х).

#### 4.1.2. Диференцијациони потенцијал мезенхималних стромалних ћелија

Способност диференцијације у различите ћелијске лозе једна је од главних карактеристика МСЋ. Ради анализе њиховог диференцијалног потенцијала, МСЋ су гајене током 14 дана за остеогену и 21 дан за адипогену диференцијацију у присуству и одсуству специфичних медијума за диференцијацију (Слика 10.). По завршеној култивацији ПК-МСЋ и КС-МСЋ, *Oil Red O* бојењем, којим су бојене унутарћелијске липидне капи, утврђена је способност диференцијације ових ћелија у адипоците. Поред тога, ПК-МСЋ и КС-МСЋ су се диференцирале и у остеобласте, што је доказано детекцијом њихове активности *Alizarin Red S* бојењем, којим су бојени ванћелијских калцијумски депозити.

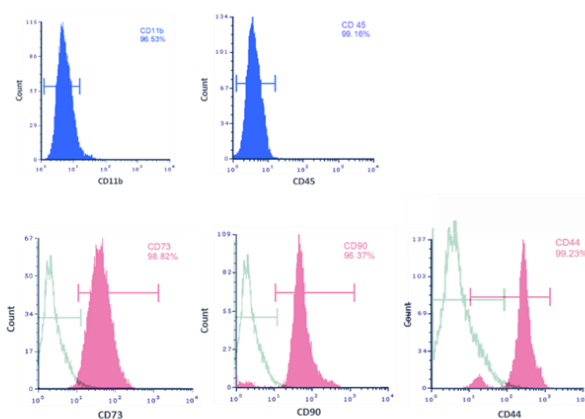


**Слика 10. Адипогена и остеогена диференцијација МСЋ.** ПК-МСЋ и КС-МСЋ су гајене у стандардним или диференцијационим медијумима ради утврђивања адипогеног и остеогеног диференцијалног потенцијала. Ефикасност диференцијације је процењена фазно-контрастном микроскопијом, а након *Oil Red O* бојења којима су бојене липидне капи или *Alizarin Red S* бојења којима су бојени депои калцијума (увеличање 40х).

### 4.1.3. Имунофенотипизација

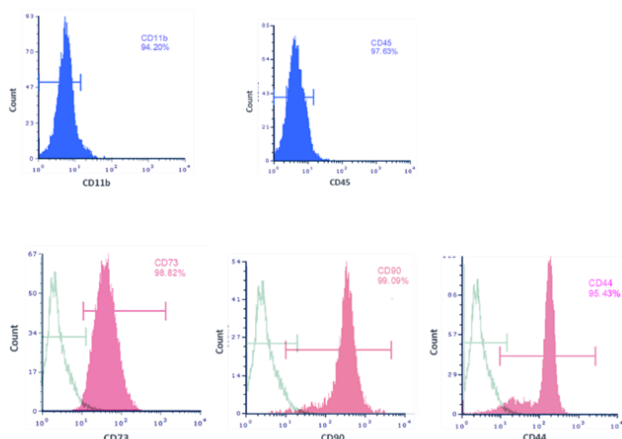
Ради потврде мезенхималне природе КС МСЋ и ПК МСЋ, проточном цитометријом је анализирана експресија површинских антигена карактеристичних за МСЋ (CD44, CD90 и CD73) и одсуство експресије леукоцитних антигена (CD45 и CD11b). Више од 96% анализираних ПК МСЋ је било позитивно на CD44, CD90 и CD73, док је мање од 5% ћелија било позитивно на CD45 и CD11b (Слика 11. А). Слични резултати су добијени и са КС МСЋ (Слика 11. Б) код којих је више од 95% ћелија експримирао CD44, CD90 и CD73, а мање од 10% CD45 и CD11b.

А



Antigen	% (± SEM)
CD11b	3.47 (3.1)
CD45	0.84 (3.3)
CD73	98.82 (2.7)
CD90	96.73 (3.2)
CD44	99.23 (0.8)

Б



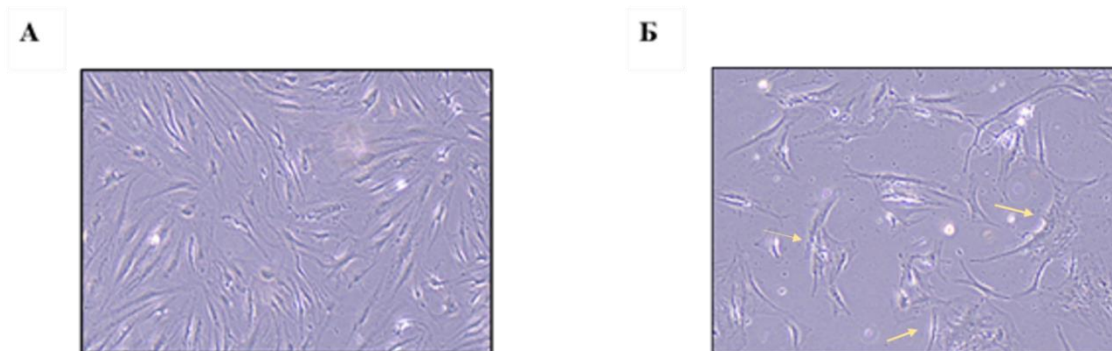
Antigen	% (± SEM)
CD11b	5.8 (2.9)
CD45	2.37 (3.8)
CD73	98.62 (3.2)
CD90	99.09 (3.3)
CD44	95.43 (2.8)

**Слика 11. Имунофенотип МСЋ.** ПК МСЋ А) и КС МСЋ Б) су анализирани на присуство мезенхималних (CD44, CD90 и CD73) (розе хистограм) и леукоцитних површинских антигена (CD11b и CD45) (плави хистограм) проточном цитометријом. У поређењу са изотипском контролом (зелени хистограм).

## 4.2. ЕФЕКТИ И МЕХАНИЗМИ ДЕЛОВАЊА ХИДРОКСИУРЕЕ НА МЕЗЕНХИМАЛНЕ СТРОМАЛНЕ ЋЕЛИЈЕ

### 4.2.1. Утицај хидроксиурее на морфолошке карактеристике мезенхималних стромалних ћелија

КС-МСЋ су послужиле као модел за испитивање утицаја ХУ на морфолошке особине МСЋ. Ћелије су третиране ХУ у концентрацији од 200 $\mu$ М током 3 дана. Фазно-контрастном микроскопијом анализирана је морфологија ХУ третираних и нетретираних ћелија. Третман је довео до смањења укупног броја ћелија а уочене су и промене у морфологији и распореду ћелија, од карактеристичног танког и вретенастог облика МСЋ које су формирале униформне колоније, ка ћелијама са већом количином цитоплазме и неправилним распоредом (Слика 12.).

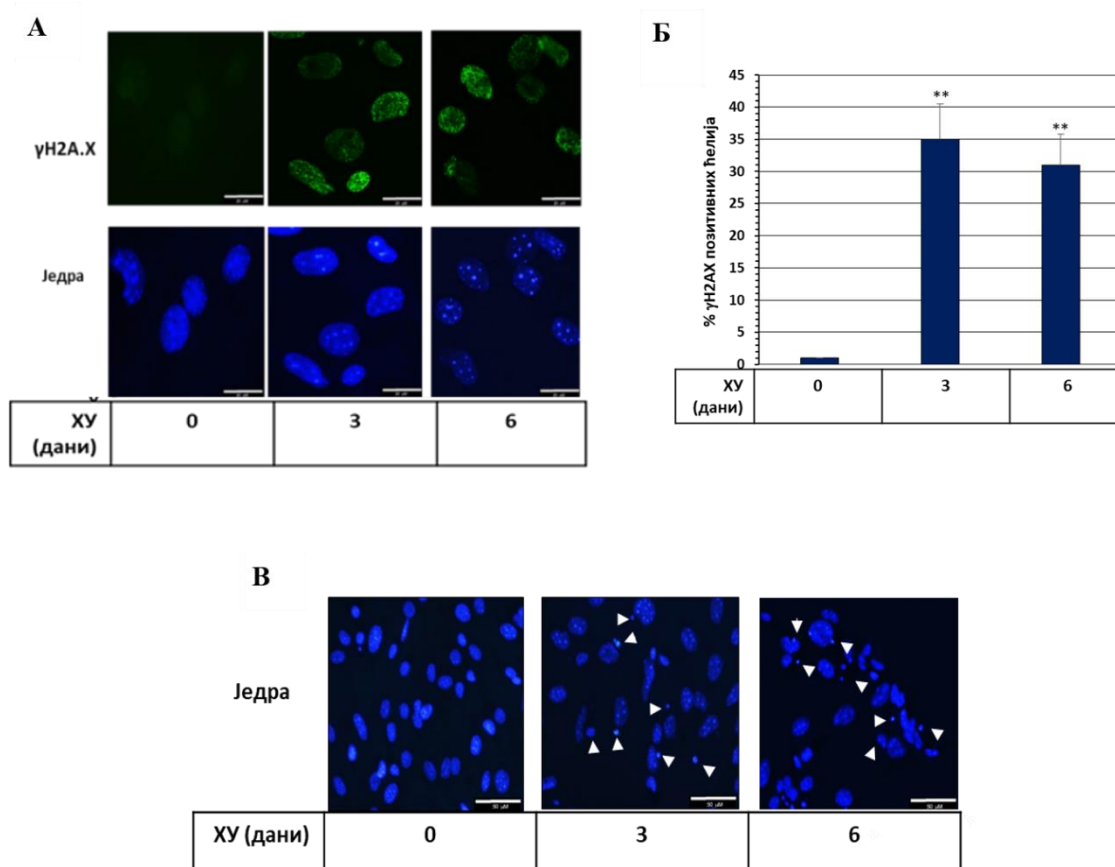


**Слика 12.** Утицај ХУ на морфологију МСЋ. Морфолошке карактеристике нетретираних А) и ХУ третираних (200 $\mu$ М, 3 дана) КС МСЋ Б). Стрелицама су назначене измењене ћелије. Детектовано фазно-контрастном микроскопијом (увеличање 20х).

### 4.2.2. Генотоксични ефекат хидроксиурее на мезенхималне стромалне ћелије

Да би се установило да ли ХУ доводи до ДНК оштећења, ПК-МСЋ су третиране 200 $\mu$ М ХУ током 3 и 6 дана а потом је имунофлуоресцентном микроскопијом анализирана експресија фосфорилисане изоформе хистона H2AX ( $\gamma$ H2AX), маркера двоструког прекида ДНК. Након третмана ХУ у оба временска интервала, регистровано је статистички значајно повећане експресије  $\gamma$ H2AX (Слика 13. А и Б). Такође, примећено је формирање микронуклеуса у близини великих ћелијских једара (Слика 13. В), који представљају хромозомске фрагменте или читаве хромозоме заостале након

деобе ћелија са хромозомским оштећењима. Ови резултати сугеришу да је ефекат ХУ на МСЋ генотоксичан.



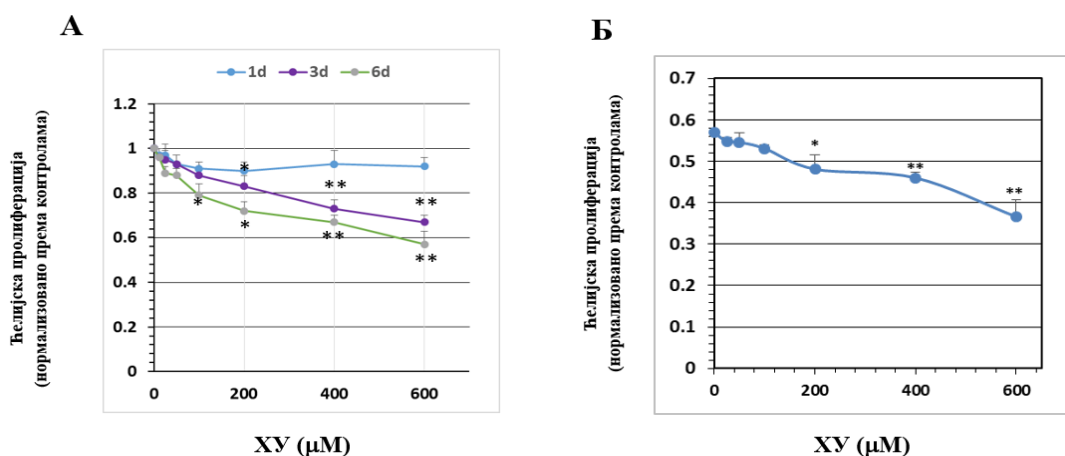
**Слика 13. ХУ-индуковани генотоксични ефекат на МСЋ.** А) Имунофлуоресцентна анализа експресије  $\gamma$ H2AX (зелено) након третмана ПК-МСЋ 200 $\mu$ M ХУ током 3 и 6 дана. Једра су детектована DAPI бојењем (плаво) (увеличање 100x, скала 20 $\mu$ m). Б) Стубићи показују проценат  $\gamma$ H2AX позитивних ћелија у експерименталним условима наведеним у А. Резултати представљају средње вредности 3 независна експеримента  $\pm$  SEM (\*\*p < 0,01 у поређењу са нетретираним ћелијама). В) Детекција микронуклеуса након третмана ПК-МСЋ као што је наведено у А. Микронуклеуси су обележени стрелицама (увеличање 40x, скала 50 $\mu$ m). Приказане су репрезентативне фотографије 3 независна експеримента.

#### 4.2.3. Утицај хидроксиурее на вијабилност мезенхималних стромалних ћелија

У циљу испитивања цитотоксичности ХУ, ПК-МСЋ су изложене различитим концентрацијама овог агенса (25, 50, 100, 200, 400 и 600 $\mu$ M) током различитог временског периода (1, 3 и 6 дана). По истеку инкубационог периода, вијабилност ПК-МСЋ је анализирана МТТ тестом. Резултати указују на дозно-зависно смањење

вијабилности ћелија након 3. и 6. дана ХУ третмана, док једнодневни третман није значајно утицао на вијабилност ћелија (Слика 14. А). Тродневни третман ХУ у концентрацији од 100 $\mu$ М је смањио вијабилност за 25%, а у концентрацији од 600 $\mu$ М за 33% у поређењу са нетретираним ћелијама. Третман у трајању од 6 дана је имао сличан, дозно зависни ефекат те је концентрација ХУ од 100 $\mu$ М редуковала пролиферацију за 37%, а 600 $\mu$ М за 42% (Слика 14. А).

На исти начин испитиван је ефекат растућих концентрација ХУ на КС-МСЋ током тродневног третмана. Третман ХУ у концентрацији од 200, 400 и 600 $\mu$ М је довео до статистички значајног смањења пролиферације КС-МСЋ (Слика 14. Б).



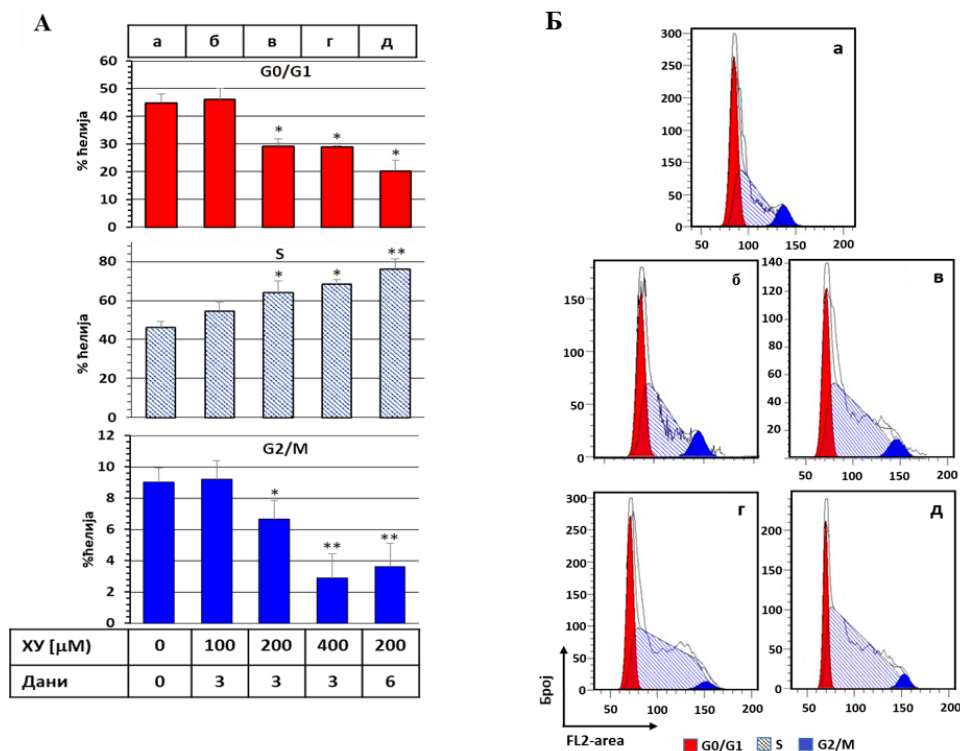
**Слика 14. Ефекат ХУ на пролиферацију МСЋ.** А) МТТ тест вијабилности ПК-МСЋ након третмана растућим концентрацијама хидроксиуреа (25 $\mu$ М, 50 $\mu$ М, 100 $\mu$ М, 200 $\mu$ М, 400 $\mu$ М и 600 $\mu$ М) током 1 дана (плава линија), 3 дана (љубичаста линија) и 6 дана (зелена линија). А) МТТ тест вијабилности КС-МСЋ након третмана ХУ (25 $\mu$ М, 50 $\mu$ М, 100 $\mu$ М, 200 $\mu$ М, 400 $\mu$ М и 600 $\mu$ М) 3 дана (плава линија). Резултати представљају средње вредности 3 независна експеримента  $\pm$  SEM. Статистичка значајност у односу на нетретиране ћелије добијена *t* тестом: \**p* < 0,05 и \*\**p* < 0,01.

Надаље је у експериментима коришћена 200 $\mu$ М концентрација ХУ, која представља концентрацију овог агенса у крви пацијената након оралне терапијске примене (Marusyk и сар., 2007). Поред тога што је ова концентрација терапијски значајна, она има цитостатски ефекат на МСЋ али није цитотоксична.

#### 4.2.4. Утицај хидроксиурее на ћелијски циклус и апоптозу мезенхималних стромалних ћелија

У следећем кораку испитан је утицај ХУ на расподелу ћелија по фазама ћелијског циклуса проточном цитометријом а након бојења пропидијум јодидом. За анализу ћелијског циклуса ПК-МСЋ су третиране различитим концентрацијама ХУ (100 $\mu$ М, 200 $\mu$ М и 400 $\mu$ М) током 3 дана, као и ХУ у концентрацији од 200 $\mu$ М у трајању од 6 дана. Тродневни третман ПК-МСЋ ХУ у концентрацији од 100 $\mu$ М довео је до повећања броја ћелија у *S* фази али то повећање није било статистички значајно. Третман већим концентрацијама ХУ (200 $\mu$ М и 400 $\mu$ М) у трајању од 3 дана је довео до статистички значајног повећања броја ћелија у *S* фази, док је број ћелија у *G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>* и *G<sub>2</sub>/M* фази био значајно мањи у односу на контролне ћелије. Продужени третман 200 $\mu$ М ХУ током 6 дана довео је до застоја ћелијског циклуса у *S* фази на рачун значајног смањења броја ћелија у *G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>* и *G<sub>2</sub>/M* фази у поређењу са контролном групом, али није било значајне разлике у односу на тродневни третман истом концентрацијом (Слика 15.).

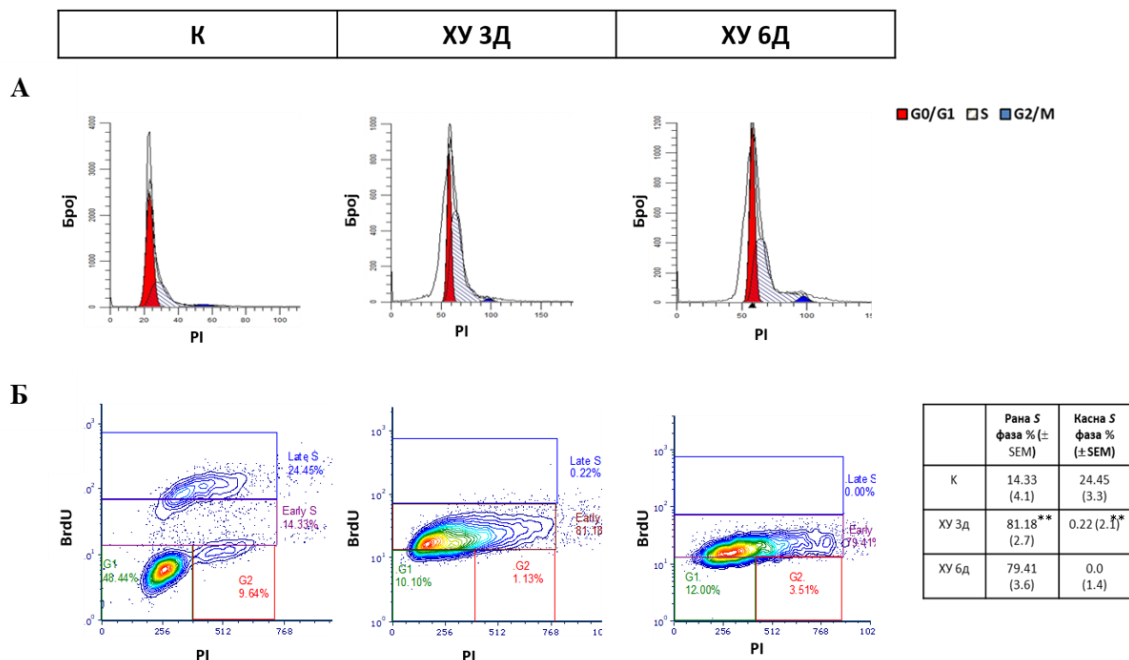




**Слика 15. Ефекат ХУ на ћелијски циклус ПК-МСТЋ.** Анализа ћелијског циклуса ПК-МСТЋ након третмана ХУ (100μМ, 200μМ и 400μМ) 3 дана и 200μМ ХУ 6 дана и бојења пропидијум јодидом. А) Стубићи представљају проценат ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса, црвени су ћелије у *G0/G1*, шрафирани у *S*, а плави у *G2/M* фази. Б) Репрезентативни хистограми који показују фазе ћелијског циклуса на основу садржаја ДНК. а, б, в, г и д представљају експерименталне услове наведене у А. Резултати представљају средње вредности 3 независна експеримента ± SEM. Статистичка значајност у односу на нетретирание ћелије добијена t тестом: \* $p < 0,05$  и \*\* $p < 0,01$ .

Бромо-деоксиуридин је нуклеозидни аналог који се у ДНК уграђује током *S* фазе. Ова анализа дозвољава да се идентификује и квантификује застој у ДНК синтези, као и у ком делу *S* фазе се застој дешава (Capella и сар., 2011). Како је експеримент са пропидијум јодидом показао да третман са ХУ доводи до повећања броја ћелија у *S* фази ћелијског циклуса, желели смо да утврдимо да ли је то повећање резултат застоја у раној или касној *S* фази. Стога су ХУ третиране (200μМ ХУ 3 и 6 дана) и нетретиране ћелије обележене бромо-деоксиуридином. Након тога ћелије су бојене антителом специфичним за бромо-деоксиуридин и пропидијум јодидом и анализирание проточним цитометром. Процент нетретираних МСТЋ у *G1* фази је износио 48.4%, у раној *S* фази 14.33%, у касној *S* фази 24.45% и у *G2* фази 9.64%. Са друге стране након третмана ХУ 3 дана у *G1* фази је било 10.1% ћелија, у раној *S* фази 81.1%, у касној *S* фази 0.22% а у *G2* фази

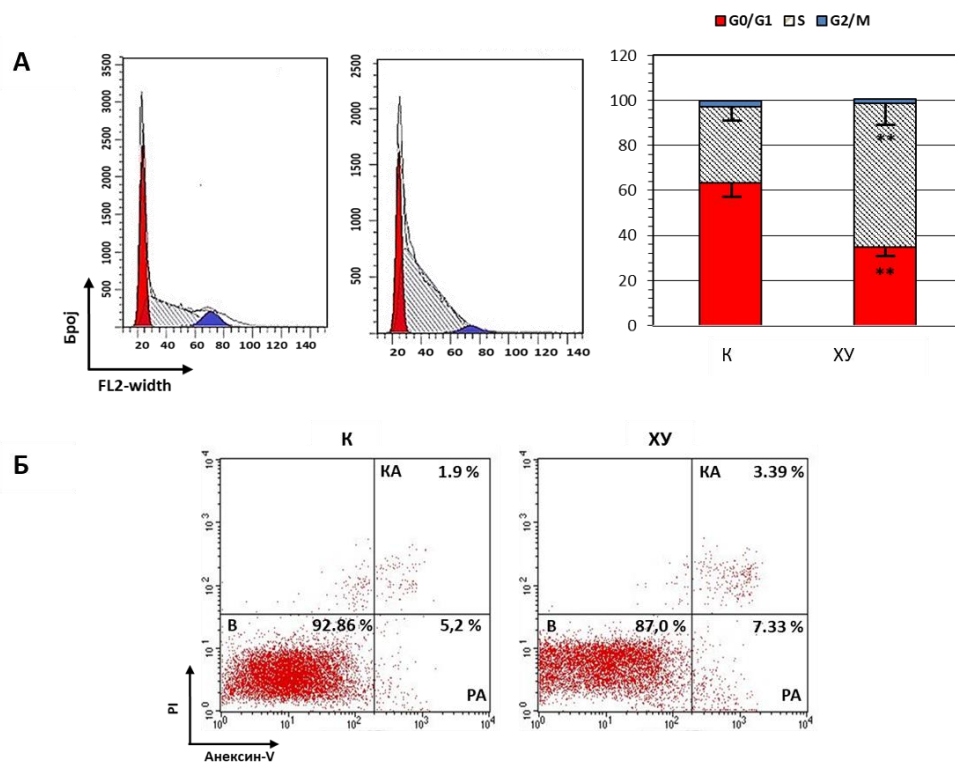
1.1%, а слични резултати су добијени и након шестодневног третмана (Слика 16.). Резултати упућују да ХУ доводи до блокаде ћелијског циклуса у *S* фази уз акумулацију МСЋ у раној *S* фази и смањење даље прогресије циклуса ка *G2* фази.



**Слика 16. ХУ узрокован застој ПК-МСЋ у *S* фази ћелијског циклуса.** Проточном цитометријом анализирани су нетретирани ПК-МСЋ (К), ћелије третиране ХУ 200 $\mu$ М 3 дана (ХУ 3д) и 6 дана (ХУ 6д) а након бојења бромдеоксиуридином (BrdU) и пропидијум јодидом (PI). А) Хистограми представљају распоред ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса. Б) Процент ћелија у раној (љубичасти квадрат) и касној (плави квадрат) *S* фази ћелијског циклуса на основу BrdU и PI позитивности. Третман ХУ доводи до акумулације ћелија у раној *S* фази ћелијског циклуса. Резултати представљају средње вредности 3 независна експеримента  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0,01$  у поређењу са нетретираним ћелијама)

Такође су и КС-МСЋ показале ХУ узроковано повећање броја ћелија у *S* фази ћелијског циклуса на рачун смањења броја ћелија у *G0/G1* фази а након тродневног третмана 200 $\mu$ М ХУ (Слика 17. А). С обзиром да је МТТ показао смањену вијабилност ћелија, а анализа ћелијског циклуса је показала застој у ћелијском циклусу, надаље је анализирано да ли су ове промене узроковане повећањем броја апоптотичних ћелија након ХУ третмана (200 $\mu$ М ХУ 3 дана). Рано апоптотичне ћелије су анексин V позитивне ћелије, а касно апоптотичне или рано некротичне ћелије су двоструко позитивне на анексин V и пропидијум јодид. Иако се након ХУ третмана, анексин V/пропидијум јодид есејем региструје благи тренд повећања како рано апоптотичних (са 5.2% на 7.3%) тако

и касно апоптотичних МСЋ (са 1.9% на 3.9%), то повећање није било статистички значајно (Слика 17. Б).



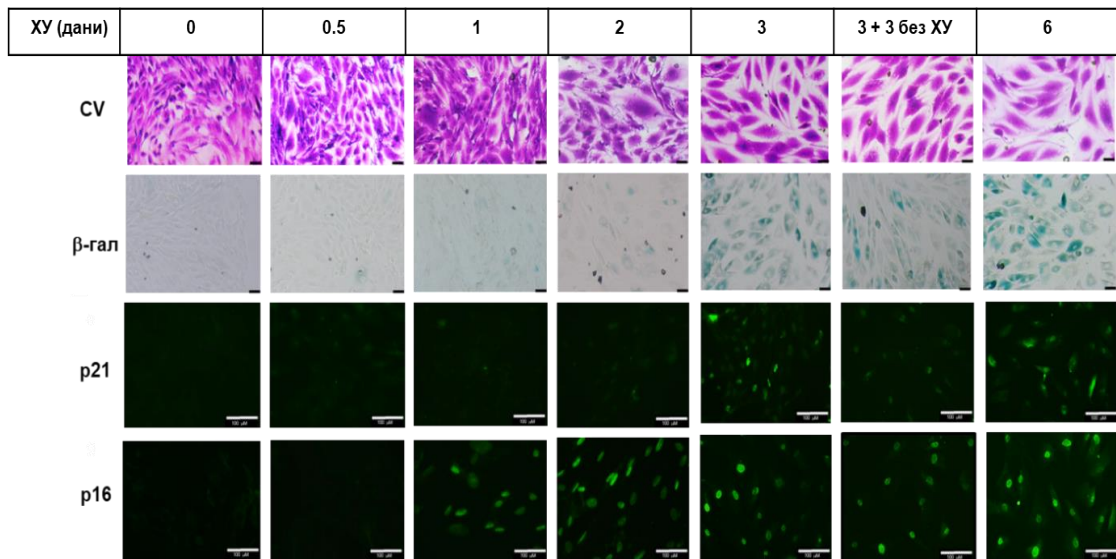
**Слика 17. Ефекат ХУ на ћелијски циклус и вијабилност КС-МСЋ.** КС-МСЋ су третиране ХУ (200 $\mu$ М) 3 дана а потом је проточном цитометријом анализиран ћелијски циклус и вијабилност ћелија након бојења пропиридијум јодидом (PI) и анексином V. А) Хистограми показују фазе ћелијског циклуса на основу садржаја ДНК, а стубићи показују процентуалну заступљеност ћелија по фазама ћелијског циклуса. ХУ доводи до значајног повећања ћелија у S фази. Б) Анализа вијабилности и процента апоптотичних ћелија није показала разлику између ХУ третираних и нетретираних ћелија. В-вијабилне ћелије; РА-рана апоптоза; КА-касна апоптоза. Резултати представљају средње вредности 3 независна експеримента  $\pm$  SEM. Статистичка значајност у односу на нетретиране ћелије добијена t тестом: \* $p < 0,05$  и \*\* $p < 0,01$ .

#### 4.2.5. Анализа хидроксиуреом индуковане сенесценције мезенхималних стромалних ћелија

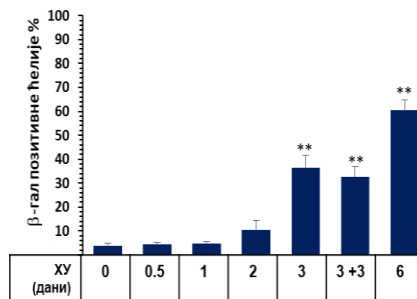
Стабилан застој у ћелијском циклусу који није праћен повећањем у броју апоптотичних ћелија води у сенесценцију, стање карактерисано специфичним морфолошким и метаболичким променама. ПК-МСЋ су третиране ХУ у концентрацији од 200 $\mu$ М током 12 сати, 1, 2, 3 или 6 дана а потом је сенесценција анализирана

посматрањем промена у морфологији ћелија након кристал виолет бојења, анализом експресије маркера сенесценције  $\beta$ -галактозидазе, p16<sup>ink4a</sup> и p21<sup>CIP1</sup>. Након 3. и 6. дана третмана, ХУ је довела до морфолошких промена које су се манифестовале као увећање и заравњење ћелија (Слика 18., први ред). Такође,  $\beta$ -галактозидаза позитивне ћелије су биле уочљиве након 3. дана третмана, а њихов број је значајно повећан након 6. дана третмана (Слика 18., други ред). Анализа експресије инхибитора циклин зависних киназа p21<sup>CIP1</sup> је показала да МСЋ показују слабу експресију од 3. дана третмана (Слика 18., трећи ред). Анализиран је још један инхибитор циклин зависних киназа, p16<sup>ink4a</sup> који је показао појачану експресију након једнодневнoг третмана, а број позитивних ћелија се повећавао са продужењем третмана (Слика 18., четврти ред). Да би се утврдила стабилност сенесцентног фенотипа, ПК-МСЋ су након трoдневнoг третмана остављене без третмана у стандардном медијуму још 3 дана (Слика 18., 3+3), а потом су анализирани маркери сенесценције. Експресија p21<sup>CIP1</sup> је била детектабилна иако смањена, док су  $\beta$ -галактозидаза и p16<sup>ink4</sup> били експримирани и након што су три дана гајене без третмана, што указује на стабилност промена.

А

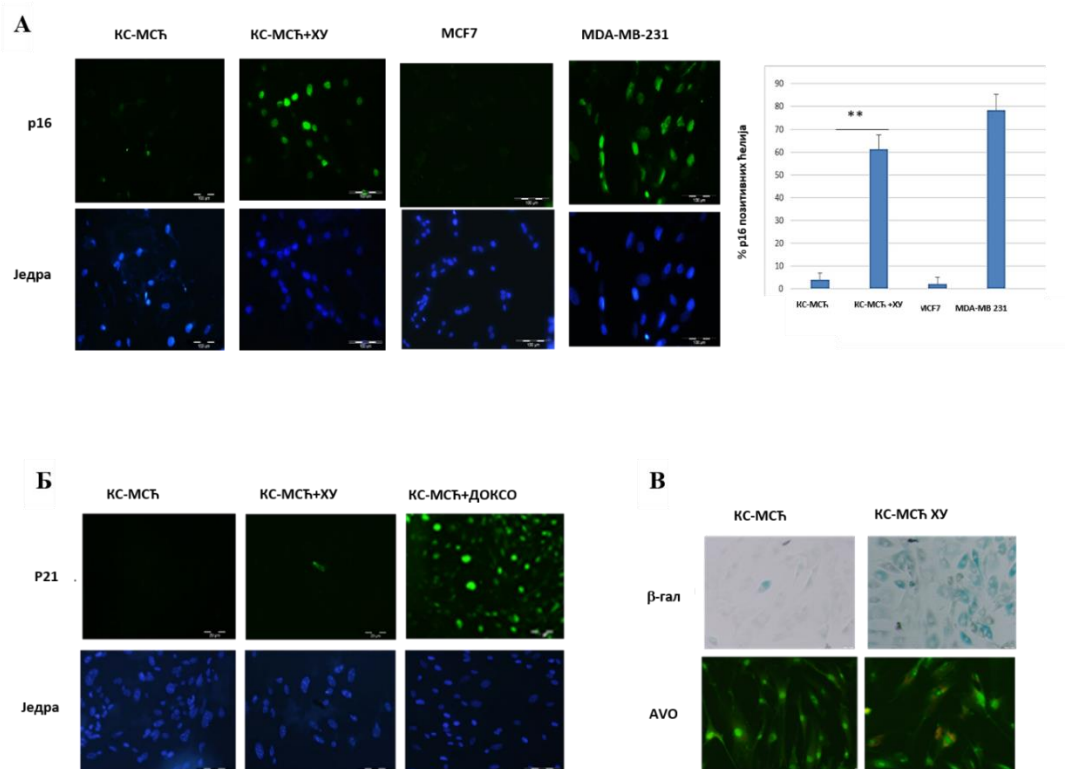


Б



**Слика 18. ХУ-индукована сенесценција ПК-МСТЋ.** А) ПК-МСТЋ су третиране 200 $\mu$ М ХУ у назначеним временским интервалима, а потом је анализирана морфологија ћелија, након бојења кристал виолетом (енг. *crystal violet*, CV) (љубичасто), инвертном микроскопијом (први ред) и  $\beta$ -галактозидна активност (зелено) хистохемијским бојењем (други ред). Увеличање 20 $\times$ , скала 50 $\mu$ м. Имунофлуоресцентним бојењем анализирана је експресија p16<sup>ink4</sup> (зелено) (трећи ред) и p21<sup>CIP1</sup> (зелено) (четврти ред), увеличање 20 $\times$ , скала 100 $\mu$ м. Б) Стубићи представљају број сенесцентних,  $\beta$ -галактозидаза позитивних ћелија, након третмана 200 $\mu$ М ХУ у наведеним временским интервалима. Резултати представљају средње вредности 3 независна експеримента  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0,01$  у поређењу са нетретираним ћелијама)

Квантификација  $p16^{ink4}$  позитивних КС-МНЋ потврдила је да третман ХУ (200 $\mu$ М, 3 дана) доводи до повећане експресије сенесцентног маркера  $p16^{ink4a}$  у односу на нетретиране ћелије (Слика 19. А): Као негативна и позитивна контрола за имунофлуоресцентно бојење  $p16^{ink4}$  су анализиране и ћелијске линије карцинома дојке МСF7- $p16^{ink4}$  дефицијентна и МDА-МВ-231-која експримира  $p16^{ink4a}$ . Са друге стране ХУ третиране КС-МСЋ су такође слабо експримирале  $p21^{cip1}$ , што је потврђено имунофлуоресцентном анализом, а као позитивна контрола су анализиране и ћелије третиране доксорубицином (100nМ) (Слика 19. Б). Познато је да је повећана експресија  $\beta$ -галактозидазе повезана са повећањем броја и величине унутарћелијских органела лизозома (Gorgoulis и сар., 2019). Анализа присуства АVO након акридин оранж бојења, показала је повећан број ових органела након дводневног третмана КС-МСЋ ХУ који коинцидира са повећањем експресије  $\beta$ -галактозидазе (Слика 19. В).



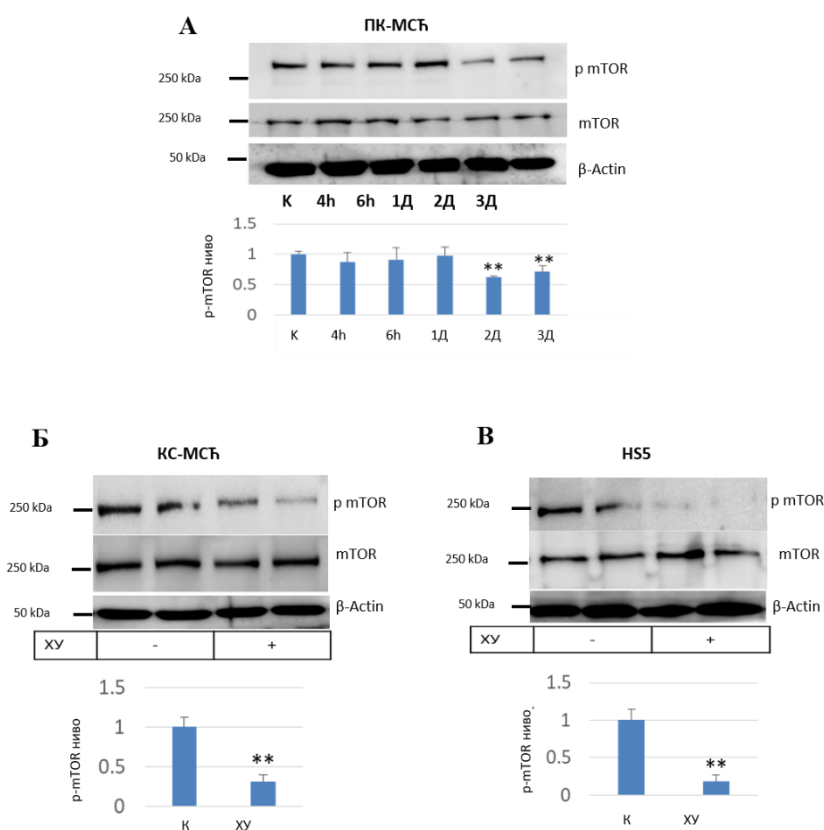
**Слика 19. ХУ-индукована сенесценција КС-МСЋ.** Квантификација p16<sup>ink4a</sup> позитивних КС-МСЋ нетретираних или третираних 200μM ХУ 3 дана. Као негативна и позитивна контрола анализирани су МСF7 и МDА-МВ-231 ћелије. Стубићи представљају проценат p16<sup>ink4</sup> позитивних ћелија. Б) Анализа експресије p21<sup>CIP1</sup> (зелено) уз позитивну контролу (КС-МСЋ третиране доксорубицином (ДОКСО), 100nM, 3 дана). Увеличање 20x, скала 100μm. В) Инвертном микроскопијом анализирана је β-галактозидна активност (зелено) хистохемијским бојењем. Увеличање 20x, скала 80μm. Анализиран је и број АVO (енг. *acidic vesicular organelle*) након дводневног третмана КС-МСЋ ХУ акридин оранж бојењем (наранџасто). Увеличање 20x, скала 100μm. Резултати представљају средње вредности 3 независна експеримента ± SEM (\*\*p < 0,01 у поређењу са нетретираним ћелијама)

#### 4.2.6. Молекуларни механизми укључени у хидроксиуреом индуковану сенесценцију мезенхималних стромалних ћелија

Инхибиција ћелијске пролиферације може настати као последица деловања екстрацелуларних или интрацелуларних сигнала који доводе до застоја у ћелијском циклусу и сенесценције (Penncook и сар., 2020). Да бисмо испитали ефекат ХУ на активацију различитих сигналних путева у МСЋ, ПК-МСЋ су третиране ХУ (200μM) у временском интервалу до 72 сата (4h, 6h, 24h, 48h, 72h) а потом је анализирана

експресија укупних и фосфорилисаних форми ензима mTOR, ERK1/2, p38 и STAT3, као и експресија JAK1.

Овај третман је довео до смањења у фосфорилацији и активацији mTOR протеина, а ефекат је био израженији што је инкубација била дужа (48-72 сата) (Слика 20. А). Инхибиција пролиферативног mTOR сигналног пута је даље потврђена ХУ третманом (200 $\mu$ М, 3 дана) КС-МСЋ и HS5, ћелијске линије стромалних ћелија костне сржи (Слика 20. Б и Ц).

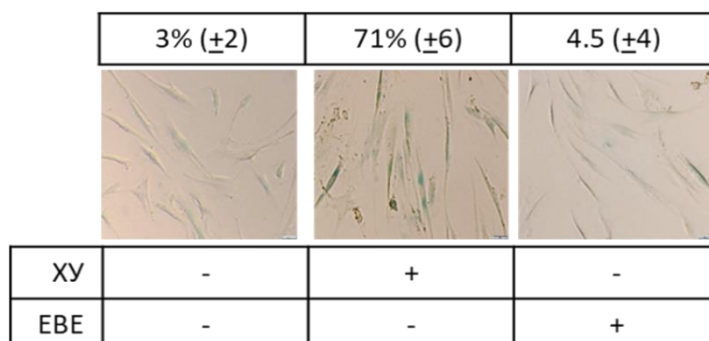


**Слика 20. ХУ посредована инхибиција mTOR активације у МСЋ.** Анализа фосфорилације mTOR протеина *Western blot* методом након третмана А) ПК-МСЋ ХУ (200 $\mu$ М) у назначеним временским периодима, КС-МСЋ Б) и HS5 В) након третмана ХУ (200 $\mu$ М, 3 дана) Стубићи испод слика показују релативне дензитометријске вредности добијеног сигнала. Актин је коришћен као контрола за количину протеина. Приказани су репрезентативни гелови, молекулске протеинске масе су изражене у kDa. Резултати представљају средње вредности 3 независна експеримента  $\pm$  SEM (\*\* $p < 0,01$  у поређењу са нетретираним ћелијама)

Како бисмо испитали да ли је смањење активације mTOR сигналног пута довољно да индукује сенесценцију КС-МСЋ, ћелије смо третирали mTOR инхибитором (Еверолимус) у концентрацији од 100 nM и трајању од 3 дана и посматрали експресију

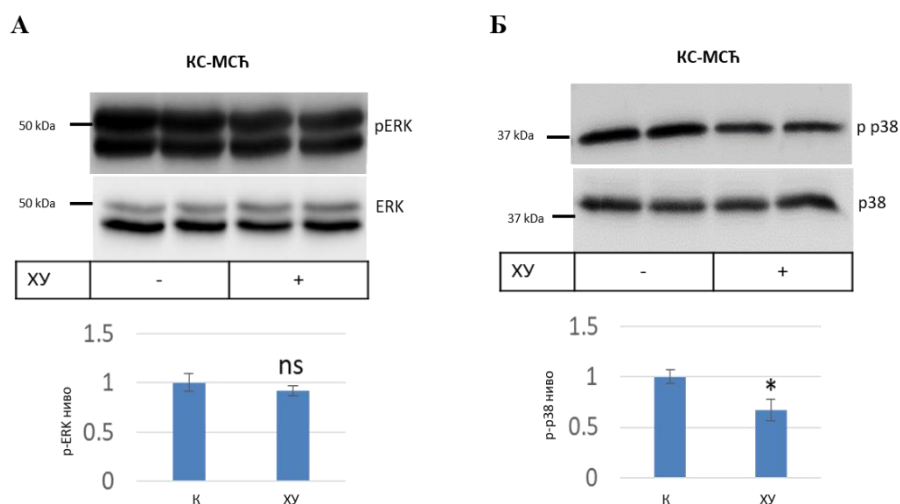


$\beta$ -галактозидазе. Инхибиција mTOR сигналног пута није довела појаве сенесцентних  $\beta$ -галактозидаза позитивних КС-МСЋ (Слика 21.) што указује на чињеницу да инхибиција mTOR сигналног пута није довољна да изазове ХУ-С-МСЋ.



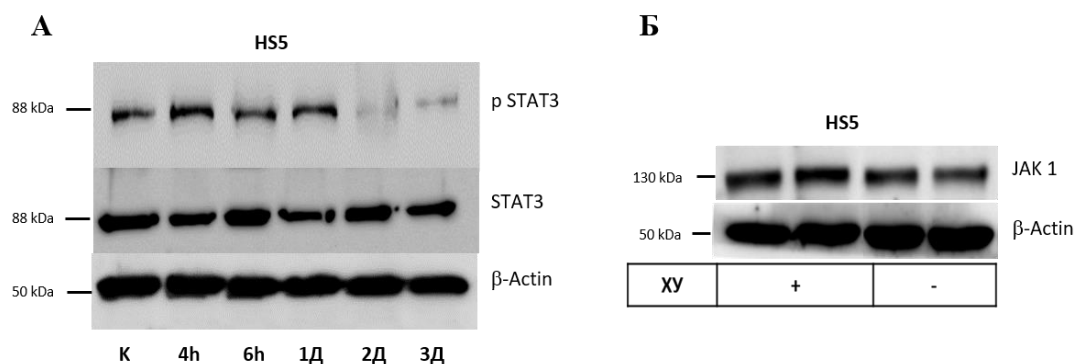
**Слика 21. mTOR сигнални пут у ХУ-С-МСЋ.** КС-МСЋ су третиране ХУ (200 $\mu$ М, 3 дана) или mTOR инхибитором Еверолимусом (ЕВЕ) (100nm, 3 дана) а потом је анализирана  $\beta$ -галактозидна активност (зелено) хистохемијским бојењем. Увеличање 20x, скала 50 $\mu$ м.

Са друге стране, тродневни третман ХУ није у значајнијој мери модификовао фосфорилацију ERK 1/2 протеина у КС-МСЋ, док је овај третман проузроковао редукцију фосфорилације p38 протеина, упућујући на потенцијалну улогу ERK/MAPK у ХУ посредованој инхибицији пролиферације МСЋ (Слика 22. А и Б).



**Слика 22. Утицај ХУ на ERK/MAPK у КС-МСЋ.** КС МСЋ су третиране ХУ (200 $\mu$ М, 3 дана) а потом је анализирана фосфорилација ERK А) и p38 Б) протеина *Western blot* методом. Стубићи испод слика показују релативне дензитометријске вредности добијеног сигнала. Приказани су репрезентативни гелови, молекулске протеинске масе су изражене у kDa. Резултати представљају средње вредности 3 независна експеримента  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$  у поређењу са нетретираним ћелијама; ns-без статистичке значајности)

Да бисмо испитали утицај ХУ на JAK/STAT сигнални пут, HS5 ћелије смо третирали 4, 6, 24, 48 или 72h са 200 $\mu$ M ХУ а потом смо детектовали експресију укупног и фосфорилисаног STAT3 протеина *Western blot* методом, док смо експресију JAK1 анализирали након 3 дана ХУ третмана са 200 $\mu$ M ХУ. Третман ХУ смањује експресију активне фосфорилисане форме STAT3 протеина са максималним ефектом након 2 и 3 дана третмана. Третман ХУ редуковао је експресију JAK1 (Слика 23. А и Б).



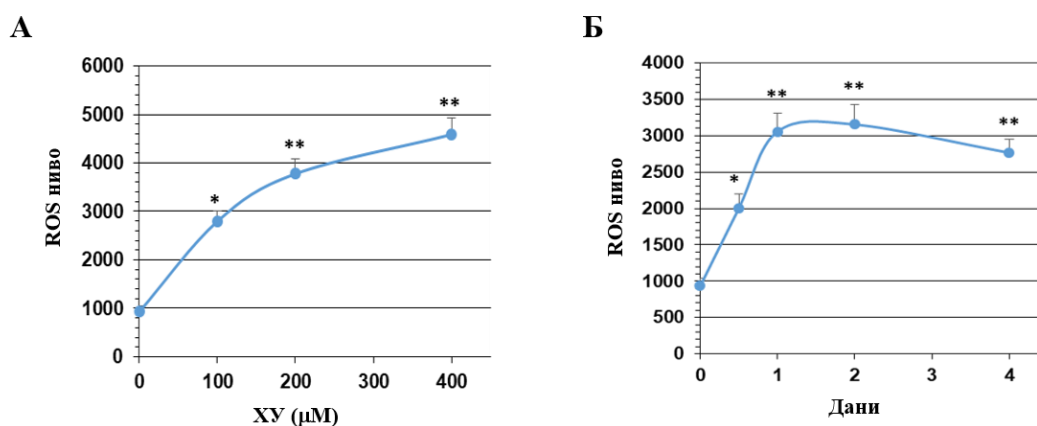
**Слика 23. ХУ посредована инхибиција JAK/STAT у МСЋ.** А) Анализа фосфорилације STAT3 сигналног пута *Western blot* методом након третмана HS5 ХУ (200 $\mu$ M) у назначеним временским периодима. Б) Експресија JAK1 сигналног пута након третмана ХУ (200 $\mu$ M, 3 дана) HS5 ћелија анализирано *Western blot* методом. Актин је коришћен као контрола за количину протеина. Приказани су репрезентативни гелови, молекулске протеинске масе су изражене у kDa.

Ови резултати показују да третман ХУ доводи до значајног смањења активације пролиферативних mTOR, MAPK и JAK/STAT сигналних путева, што је у складу са показаним цитостатичким ефектом ХУ на МСЋ.

#### 4.2.7. Улога ROS у хидроксиуреа индукованој сенесценцији мезенхималних стромалних ћелија

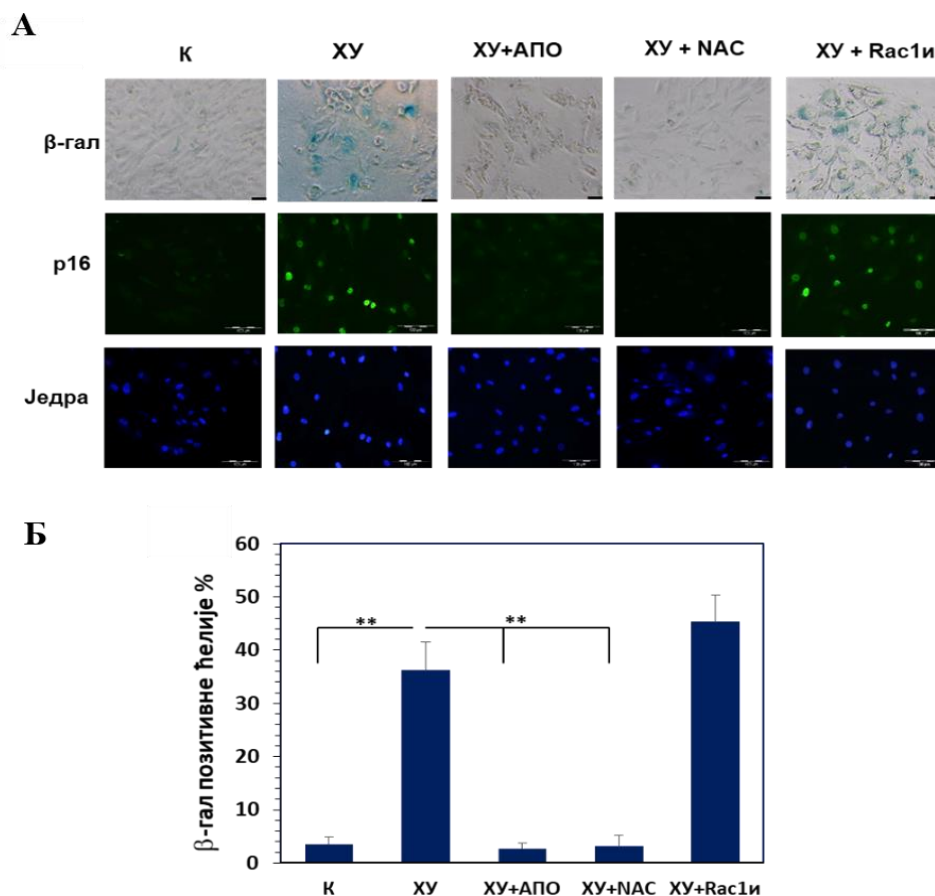
Познато је да је ћелијска сенесценција удружена са повећаним унутарћелијским нивоом ROS (Korovila I и сар., 2017). Да бисмо утврдили да ли третман ХУ доводи до повећања ROS, ПК-МСЋ су третирани са 200 $\mu$ M 3 дана, а затим бојене DCFDA агенсом који се у присуству ROS конвертује у флуоресцентни DCF, те је интензитет флуоресценције био индикатор унутарћелијског ROS. Третман ХУ ПК-МСЋ доводи до

дозно-зависног повећања унутарћелијског ROS (Слика 24. А). Примећено је да 200 $\mu$ М ХУ доводи до троструког повећања ROS у ПК-МСЋ након једнодневнoг третмана, а слични резултати су добијени након третмана у трајању од 2, 3 и 4 дана (Слика 24. Б).



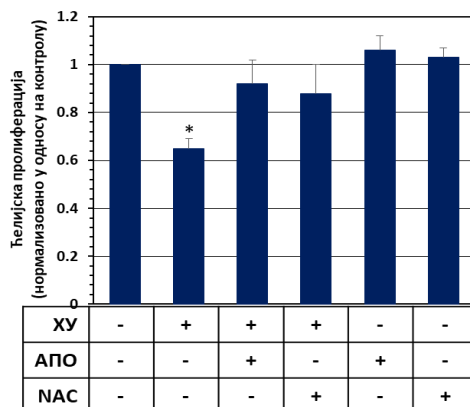
**Слика 24. ХУ-индукован ROS у ПК-МСЋ.** Плава линија репрезентује ниво ROS у ПК-МСЋ након третмана ХУ у концентрацији од 100, 200 и 400 $\mu$ М током 3 дана А) и након третмана 200 $\mu$ М ХУ у трајању од 12 сати, 1, 2 или 4 дана Б). Резултати представљају средње вредности 3 независна експеримента  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$  и \*\* $p < 0,01$  у поређењу са нетретираним ћелијама).

У циљу утврђивања улоге различитих механизма генерисања ROS у ХУ-С-МСЋ, ПК МСЋ су котретирани 200 $\mu$ М ХУ и 100 $\mu$ М апоцинином, инхибитором NADPH оксидазе (NOXs), или 25nM NAC, сакупљачем ROS, током 3 дана. Котретмани ХУ и АПО или NAC инхибирали су ХУ индуковану експресију сенесцентних маркера  $\beta$ -галактозидазе и p16 (Слика 25. А и Б), што указује на значајну улогу ROS-а у индукцији сенесценције. Познато је да је у активацији NOX 1 и 3 значајна улога Rac1 протеина (Skonieczna M и сар, 2017), те су ХУ-С-ПК МСЋ ко-третиране и Rac1 инхибитором NSC23766 (25 $\mu$ М) током 3 дана. Присуство овог инхибитора није утицао на способност ХУ да индукује експресију  $\beta$ -галактозидазе и p16 маркера (Слика 25. А и Б), што имплицира да генерисање ROS у ХУ-С-ПК МСЋ није посредовано Rac1 зависним ензимима NOX 1 и 3.



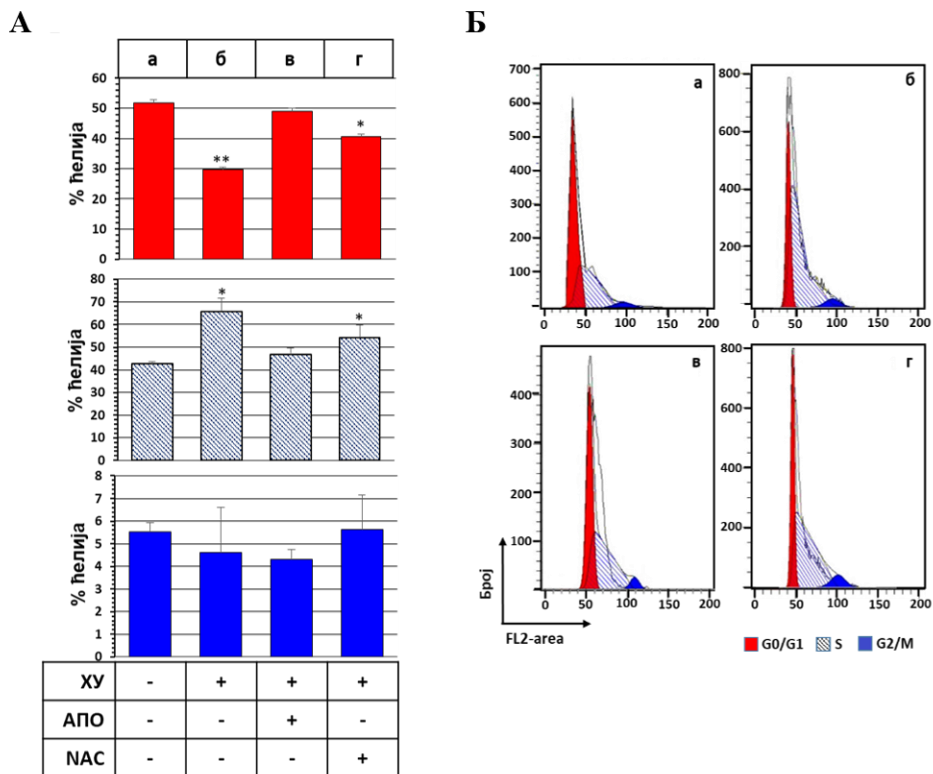
**Слика 25. Улога ROS у ХУ-С-ПК МСЋ.** А) ПК-МСЋ су третиране 200 $\mu$ М ХУ 3 дана самостално и у присуству 100 $\mu$ М апоцинина (АПО), 5nМ NAC или 25 $\mu$ М Rac1 инхибитора NSC23766 (Rac1и) ради анализе сенесценције. Ко-третман АПО и NAC-ом је инхибирао ХУ-индуковану експресију  $\beta$ -галактозидазе (зелено) (горњи ред) и p16 маркера (зелено) (средњи ред). Једра су визуализована DAPI бојењем (плаво)(доњи ред). Приказане су репрезентативне фотографије 3 независна експеримента анализирано имунохистохемијском (увеличање 20x, скала 40 $\mu$ m) и имунофлуоресцентном (увеличање 20x, скала 100 $\mu$ m) методологијом. Б) Стубићи приказују проценат  $\beta$ -галактозидаза позитивних ћелија након наведених третмана. Резултати представљају средње вредности 3 независна експеримента  $\pm$  SEM (\*\*p < 0,01 у поређењу са нетретираним ћелијама).

Даљи експерименти су спроведени са циљем испитивања улоге оксидативног стреса у ХУ посредованој инхибицији пролиферације ПК-МСЋ. У ту сврху ПК МСЋ су котретиране АПО у концентрацији од 100 $\mu$ М или NAC 5nМ а потом је њихова пролиферација испитана МТТ тестом. Инхибиција продукције ROS промоћу АПО или NAC спречава ХУ индуковану инхибицију пролиферације ПК-МСЋ, док самостални третмани са АПО и NAC нису утицали на пролиферацију ПК-МСЋ (Слика 26.).



**Слика 26. Ефекат АПО и НАС на пролиферацију ХУ-С-ПК МСЋ.** МТТ анализа пролиферације ПК-МСЋ третираних ХУ (200 $\mu$ М) и ко-третираним АПО (100 $\mu$ М) и НАС (5nМ) током 3 дана. Резултати представљају средње вредности 3 независна експеримента  $\pm$  SEM ( $t$  тест \* $p < 0,05$  у поређењу са нетретираним ћелијама).

Анализа ћелијског циклуса проточном цитометријом након бојења пропидијум јодидом је показала да АПО у ко-третману са ХУ повећава број ПК-МСЋ у  $G_0/G_1$  фази до нивоа контроле и спречава ХУ индуковану акумулацију ћелија у  $S$  фази циклуса (Слика 27. А и Б). Котретман ХУ и НАС такође доводи до повећаног броја ћелија у  $G_0/G_1$  и смањеног броја ћелија у  $S$  фази у односу на ХУ третман, мада у нешто мањој мери него АПО (Слика 27. А и Б).



**Слика 27. Ефекат АПО и НАС на ХУ-индукован застој ћелијског циклуса у S фази.** ПК-МСТћ су третиране ХУ (200 $\mu$ М), самостално или комбиновано са АПО (100 $\mu$ М) и НАС (5nМ) 3 дана, а потом је анализиран ћелијски циклус након пропидијум јодид бојења. Стубићи представљају проценат ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса, црвени су ћелије у *G0/G1*, шрафирани у *S*, а плави у *G2/M* фази. Б) Репрезентативни хистограми који показују фазе ћелијског циклуса на основу садржаја ДНК. а, б, в у г представљају експерименталне услове наведене у А. Резултати представљају средње вредности 3 независна експеримента  $\pm$  SEM. Статистичка значајност у односу на нетретиране ћелије добијена t тестом: \* $p < 0,05$  и \*\* $p < 0,01$ .

Ови резултати упућују на значајну улогу ROS у ХУ-С-ПК МСТћ и инхибицији пролиферације ПК-МСТћ.

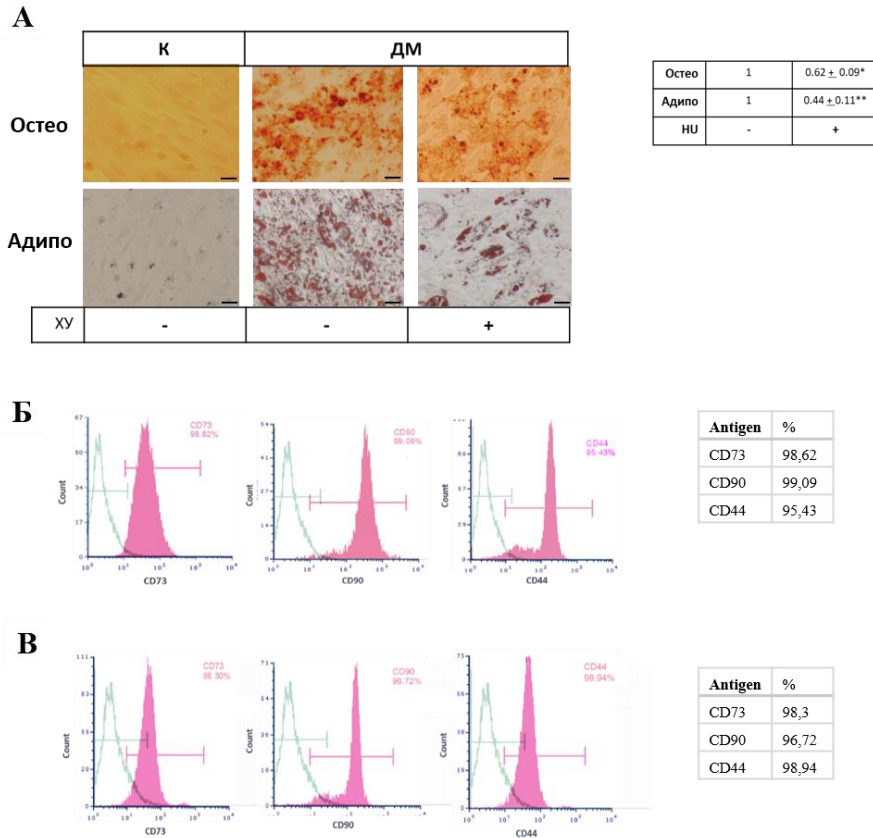
#### 4.3. УТИЦАЈ ХИДРОКСИУРЕЕ НА ФУНКЦИОНАЛНА СВОЈСТВА МЕЗЕНХИМАЛНИХ СТРОМАЛНИХ ЋЕЛИЈА

МСТћ порекла костне сржи и циркулишуће МСТћ представљају ћелије које су у сталној комуникацији са својом околином путем продукције солубилних фактора. Њихова активност, укључујући способност диференцијације, имуномодулације и стимулације фиброзе, зависе од промена у њиховој микросредини (Fuchs и сар., 2004;

Maskinon и сар., 2013). Као део микросредине тумора, ове ћелије се налазе и у сталној комуникацији са туморским ћелијама којима могу пружити подршку или инхибирати њихова раст (Tsai и сар., 2011). Стога, у даљем току смо истраживали да ли ХУ-С-МСЋ мења функционалне карактеристике МСЋ укључујући способност диференцијације, интеракције са туморским и имунским ћелијама, као и на испољеност профибротичног фенотипа.

#### 4.3.1. Утицај хидроксиурее на диференцијацију мезенхималних стромалних ћелија

Након тродневног третмана 200 $\mu$ М ХУ испитана је способност диференцијације КС МСЋ у адипоците гајењем ћелија у медијуму за диференцијацију и након тога бојењем липидних капи *Oil Red O* бојом. Интензитет *Oil Red O* је квантификован спектрофотометријски након лизе ћелија. Утврђен је мањи интензитет *Oil Red O* бојења у поређењу са нетретираним ћелијама који сугерише смањен капацитет ћелија третираних са ХУ да се диференцирају у адипоците. Слични резултати добијени су и испитивањем ефекта ХУ на остеогену диференцијацију бојењем калцијумских депоа помоћу *Alizarin Red S* бојењем. ХУ третман КС-МСЋ довео је до значајног смањења остеогене диференцијације у односу на нетретирани контролне ћелије (Слика 28. А). Додатно показано је да третман ХУ није битно утицао на матичност и експресију мезенхималних и леукоцитних површинских маркера у поређењу са нетретираним ћелијама (Слика 28. Б).



**Слика 28. Утицај ХУ на експресију површинских маркера и диференцијациони потенцијал МСЋ.** А) КС-МСЋ су третиране ХУ (200 $\mu$ М, 3 дана) и гајене у стандардним (К) или диференцијационим медијумима (ДМ) ради утврђивања остеогеног (остео) и адипогеног (адипо) диференцијационог потенцијала. Ефикасност диференцијације је процењена инвертном светлосном микроскопијом, а након *Oil Red O* или *Alizarin Red S* бојења којима су бојени депои калцијума (увеличање 40x). У табели је приказана квантификација степена диференцијације у поређењу са нетретираном контролом (вредност=1). Розе хистограми приказују експресију површинских маркера CD73, CD90 и CD44 КС МСЋ без термана Б) и након ХУ третмана В). Зелени хистограми су изотипске контроле. У табели је приказан проценат позитивних ћелија. Приказани су репрезентативни резултати 3 независна експеримента. Резултати представљају средње вредности 3 независна експеримента  $\pm$  SEM. Статистичка значајност у односу на нетретиране ћелије добијена t тестом: \*p < 0,05 и \*\*p < 0,01.

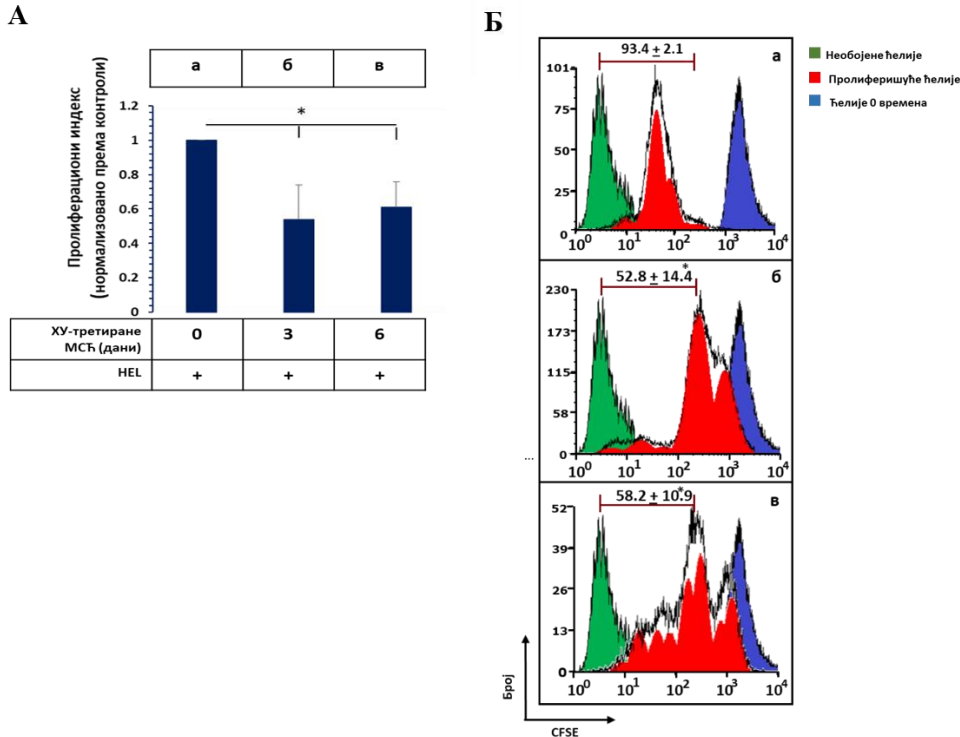
#### 4.3.2. Утицај хидроксуреом индуковане сенесценције мезенхималних стромалних ћелија на пролиферацију туморских ћелија

Да би се испитао утицај ХУ-С-ПК МСЋ на пролиферацију малигнух ћелија, ПК-МСЋ су третиране 200 $\mu$ М ХУ током 3 или 6 дана ради индукције сенесценције а потом су ове сенесцентне ћелије гајене у кокултури са малигнум ћелијама још 3 дана.



#### 4.3.2.1. Ефекат хидроксиуреом индуковане сенесценције мезенхималних стромалних ћелија на пролиферацију HEL ћелија

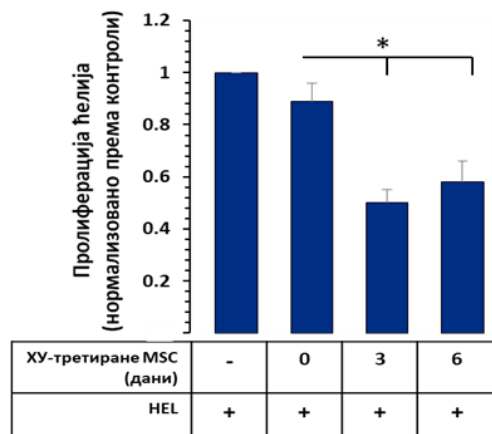
У овом експерименту анализиран је утицај ХУ-С-ПК МСЋ на пролиферацију *bystander* HEL ћелија које су обележене CFSE бојом и гајене у кокултури још 3 дана (Слика 29. Б, хистограм б). Као контрола, нетретиране ПК-МСЋ гајене су у кокултури са HEL ћелијама обележене CFSE бојом (Слика 29. Б, хистограм а) у истом временском периоду. Да би се одредила почетна неразблажена концентрација боје, једна група HEL ћелија је третирана митомицином (40 g/ml, 30 минута) непосредно након CFSE бојења, са циљем заустављања пролиферације и те ћелије су назване ћелије 0 времена (Слика 29. Б, плави хистограм). Необојене HEL ћелије су коришћене као контрола за крајњу концентрацију боје након пролиферације, с обзиром да интензитет боје са пролиферацијом ћелија слаби (Слика 29. Б, зелени хистограм). На основу разлике у интензитету CFSE боје необојених ћелија (зелени хистограм) и ћелија које поседују највећи интензитет CFSE боје јер им је пролиферација инхибирана (плави хистограм), одредили смо популацију пролиферишућих ћелија (Слика 29. Б, црвени хистограм). *Bystander* HEL ћелије, које су током 3 дана гајене у кокултури са ХУ-С-ПК-МСЋ, су смањено пролиферисале у поређењу са ћелијама гајеним са нетретираним ПК-МС, што је доказано мерењем пролиферационог индекса (Слика 29. А). Пролиферациони индекс, просечан број деоба које су ћелије имале од почетка култивисања HEL ћелије гајених са нетретираним МСЋ је веома висок износи  $93.4 \pm 2.1$  (Слика 29. А и Б, панел а). *Bystander* HEL ћелије, које су током 3 дана гајене са ХУ-С-ПК-МСЋ, имају пролиферациони индекс  $52.8 \pm 14.4$  (Слика 29. А и Б, панел б). Дужина третмана МСЋ ХУ није довела до значајне разлике у степену инхибиције пролиферације HEL ћелија, с обзиром да су HEL ћелије инкубиране са ХУ третираним ПК-МСЋ током 6 дана имале пролиферациони индекс  $58.2 \pm 10.9$  (Слика 29. А и Б, панел в).



**Слика 29. Инхибиција пролиферације HEL ћелија помоћу ХУ-С-ПК МСЋ.** А) Стубићи представљају пролиферативни индекс CFSE обојених HEL ћелија након култивисања са нетретираним ПК-МСЋ и ХУ-С-ПК-МСЋ (ХУ 200 $\mu$ М, 3 и 6 дана). Б) Хистограм приказује пролиферацију CFSE обојених HEL ћелија у ко-култури са ПК-МСЋ у истим условима као у А. Зелени хистограм интензитет CFSE боје необојених HEL ћелија, плави хистограм интензитет CFSE боје непролиферишућих HEL ћелија 0 времена третираних митомицином, црвени хистограм пролиферишуће HEL ћелије. Браон линијом је означен пролиферациони индекс који представља проценат пролиферишућих ћелија са разблаженим интензитетом CFSE боје једнаком разлици интензитета CFSE боје непролиферишућих и необојених ћелија. а, б и в представљају услове експеримента као у А. Приказани су репрезентативни резултати 3 независна експеримента као средње вредности  $\pm$  SEM (t тест \* $p < 0,05$  у поређењу са нетретираним ћелијама).

Да ПК-МСЋ ћелије претретиране ХУ (200 $\mu$ М, 3 или 6 дана) подједнако смањују пролиферацију HEL ћелија потврђено је и МТТ есејем (Слика 30.).

Вијабилност HEL ћелија након ко-културе са ХУ третираним ПК-МСЋ праћена је МТТ есејем. ПК-МСЋ ћелије су третиране 200 $\mu$ М ХУ у трајању од 3 или 6 дана, а затим инкубиране са HEL ћелијама. Као контрола коришћене су HEL ћелије инкубиране са нетретираним ПК-МСЋ и HEL ћелије у монокултури. Резултат је показао смањење апсорбанце HEL ћелија гајених у кокултури са ХУ-С-МСЋ у поређењу са нетретираним МСЋ, што указује да ХУ-С-МСЋ имају цитостатски ефекат на HEL ћелија и потврђује резултате добијене проточном цитометријом.

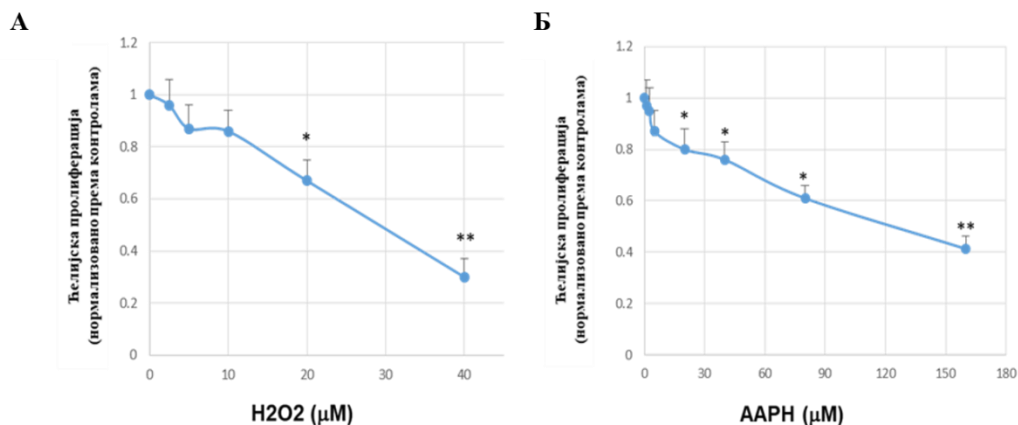


**Слика 30. Анализа вијабилности HEL ћелија у ко-култури са ХУ-С-ПК МСЋ.** вијабилност HEL ћелија након тродневног гајења у медијуму, са нетретираним ПК-МСЋ и ХУ-С-ПК-МСЋ (ХУ 200 $\mu$ М, 3 и 6 дана) анализирана МТТ тестом. Приказани су репрезентативни резултати 3 независна експеримента као средње вредности  $\pm$  SEM (t тест \* $p < 0,05$  у поређењу са нетретираним ћелијама).

#### 4.3.2.1.1. Улога ROS и TGF $\beta$ у инхибицији пролиферације HEL ћелија помоћу хидроксуреом индукованих сенесцентних мезенхималних стромалних ћелија

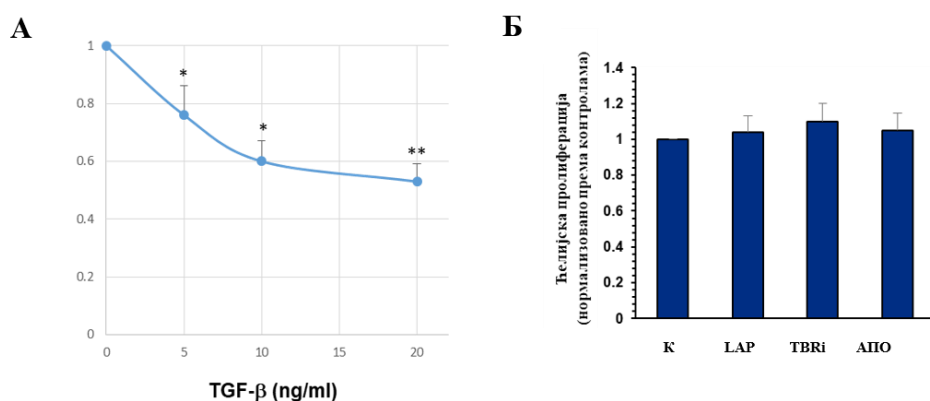
Тестирали смо два потенцијална механизма којима ХУ-С-ПК-МСЋ инхибирају пролиферацију HEL ћелија. Према подацима из литературе (Alexandre и сар., 2007; Schelker и сар., 2018) механизми који су укључени у регулацију пролиферације туморских ћелија од стране сенесцентних ћелија су повећана продукција ROS и продукција TGF- $\beta$ 1 као једног од фактора SASP. У сврху неутралисања ефекта TGF- $\beta$ 1 у наредним експериментима коришћени су LAP који везује и инактивише TGF- $\beta$ 1 и селективни инхибитор TGF- $\beta$ 1 рецептора тип 1 (енг. *inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  type I receptor*, TBRi), SB525334. Такође, продукција ROS може да има стимулативни ефекат на продукцију TGF- $\beta$ 1 (Schelker и сар.,2018), па смо испитали ефекат ROS зависне продукције TGF- $\beta$ 1 на пролиферацију HEL ћелија, коришћењем апоцинина као NOX зависног ROS инхибитора.

Да бисмо утврдили утицај ROS на вијабилност HEL ћелија, HEL ћелије су гајене са H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и AAPH (генератор ROS) током 3 дана па је њихова вијабилност анализирана МТТ тестом. Резултати сугеришу да третмани H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и AAPH доводи до дозно-зависног смањења вијабилности HEL ћелија (Слика 31.).



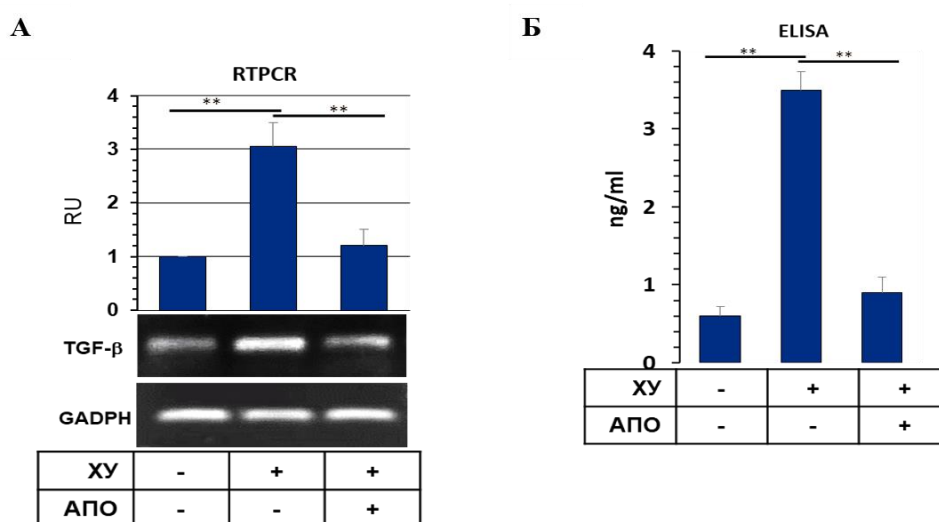
**Слика 31. Ефекат H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и AAPH на вијабилност HEL ћелија.** HEL ћелије су третиране растућим концентрацијама H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> током 3 дана А) и растућим концентрацијама AAPH (ROS произвођач) током 3 дана Б) а потом је анализирана њихова вијабилност МТТ тестом. Приказани су репрезентативни резултати 3 независна експеримента као средње вредности ± SEM (t тест \*p < 0,05 и \*\*p < 0.005.у поређењу са нетретираним ћелијама).

У сврху испитивања утицаја TGF-β1 на пролиферацију HEL ћелија, ћелије су третиране растућим концентрацијама TGF-β1 (5, 10, 20ng/ml) током 3 дана а потом је вијабилност анализирана МТТ тестом. HEL ћелије су показале дозно-зависно смањење апсорбанце након третмана са TGF-β1 (Слика 32. А) у поређењу са нетретираним ћелијама. Са друге стране, мерењем апсорбанце третираних и нетретираних HEL ћелија, закључено је да на вијабилност HEL ћелија нису имали ефекат третмани апоцинином (100μM), LAP (4μg/ml) и TBRi (0,1μM) (Слика 32. Б) .



**Слика 32. Ефекат TGF-β, LAP, TBRi и АПО на вијабилност HEL ћелија.** А) HEL ћелије су третиране растућим концентрацијама TGF-β током 3 дана А) и LAP (4μg/ml), TBRi (0,1μM) и АПО (апоцинин) (100μM) током 3 дана Б) а потом је анализирана њихова вијабилност МТТ тестом. Приказани су репрезентативни резултати 3 независна експеримента као средње вредности ± SEM (t тест \*p < 0,05 и \*\*p < 0.005 у поређењу са нетретираним ћелијама).

С обзиром да HEL ћелије показују смањену вијабилност након третмана TGF- $\beta$ 1 у монокултури, у даљем току смо испитали експресију TGF- $\beta$ 1 транскрипта и продукцију TGF- $\beta$ 1 од стране ХУ-С-ПК МСЋ у поређењу са нетретираним ПК МСЋ. Такође, анализирали смо да ли је продукција TGF- $\beta$  од стране ХУ-С-ПК МСЋ, зависна од продукције ROS коришћењем апоцинина. Након третмана ПК-МСЋ ХУ (200 $\mu$ М, 3 дана) и комбинованог третмана ХУ и апоцинином (100 $\mu$ М, 3 дана) анализирана је генска експресија TGF- $\beta$ 1 RT-PCR методом и продукција солубилног TGF- $\beta$ 1 ELISA методом. Закључено је да третман ХУ повећава експресију TGF- $\beta$ 1 гена, као и продукцију солубилног TGF- $\beta$ 1 од стране ПК-МСЋ. Са друге стране, третман са апоцинином поништава ХУ индуковану повећану продукцију и генску експресију TGF- $\beta$ 1 од стране ПК-МСЋ (Слика 33. А и Б).

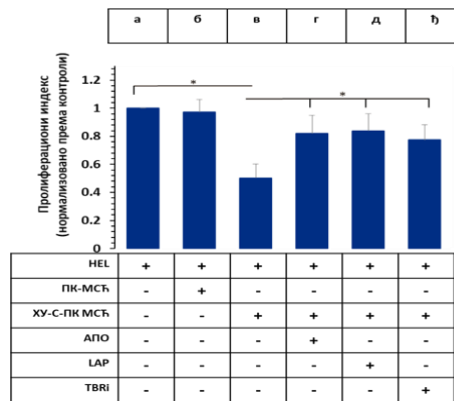


**Слика 33. ХУ индукована продукција TGF- $\beta$ 1 је посредована инхибицијом продукције ROS.** ПК-МСЋ су третирани ХУ (200 $\mu$ М, 3 дана) у присуству/одсуству АПО (100 $\mu$ М, 3 дана) па је анализирана експресија mRNA TGF- $\beta$ 1 RT PCR методом А) или је анализирана продукција TGF- $\beta$ 1 ELISA методом Б). Као *housekeeper* ген је коришћен GAPDH. Приказани су репрезентативни резултати 3 независна експеримента као средње вредности  $\pm$  SEM (t тест \* $p < 0,05$  и \*\* $p < 0.005$  у поређењу са нетретираним ћелијама).

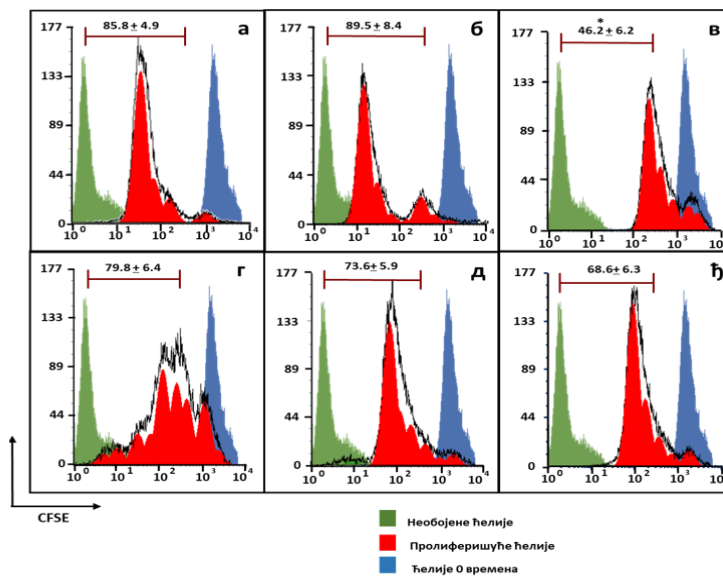
До сада смо показали да ХУ-С-ПК МСЋ производе ROS и TGF- $\beta$ 1 и да ови фактори могу да утичу на пролиферацију HEL ћелија у монокултури. У следећем кораку испитана је улога ROS и TGF- $\beta$ 1 у ХУ-С-ПК-МСЋ посредованој инхибицији пролиферације *bystander* HEL ћелија у условима ко-културе. У ту сврху ПК МСЋ су

третиране ХУ (200 $\mu$ М, 3 дана) и котретиране модулаторима продукције ROS и TGF- $\beta$ 1, апоцинином LAP (4 $\mu$ g/ml, 3 дана) или TBRi (0,1 $\mu$ М, 3 дана), а затим гајене у кокултури са HEL ћелијама обележеним CFSE бојом. Пролиферација HEL ћелија је праћена проточном цитометријом на основу пролиферативних индекса на исти начин као што је описано у одељку 4.3.2.1. На основу пролиферативног индекса и разблажења CFSE боје долазимо да закључка да нема значајне разлике у пролиферацији HEL ћелија које су гајене самостално и HEL ћелија гајених са нетретираним ПК-МСТ $\bar{h}$ . Са друге стране, HEL ћелије су смањено пролиферисале у ко-култури са ХУ-С-ПК-МСТ $\bar{h}$ , док су апоцинин, LAP и TBRi заштитили *bystander* HEL ћелије од инхибиторног утицаја ХУ-С-ПК-МСТ $\bar{h}$  (Слика 34.).

А

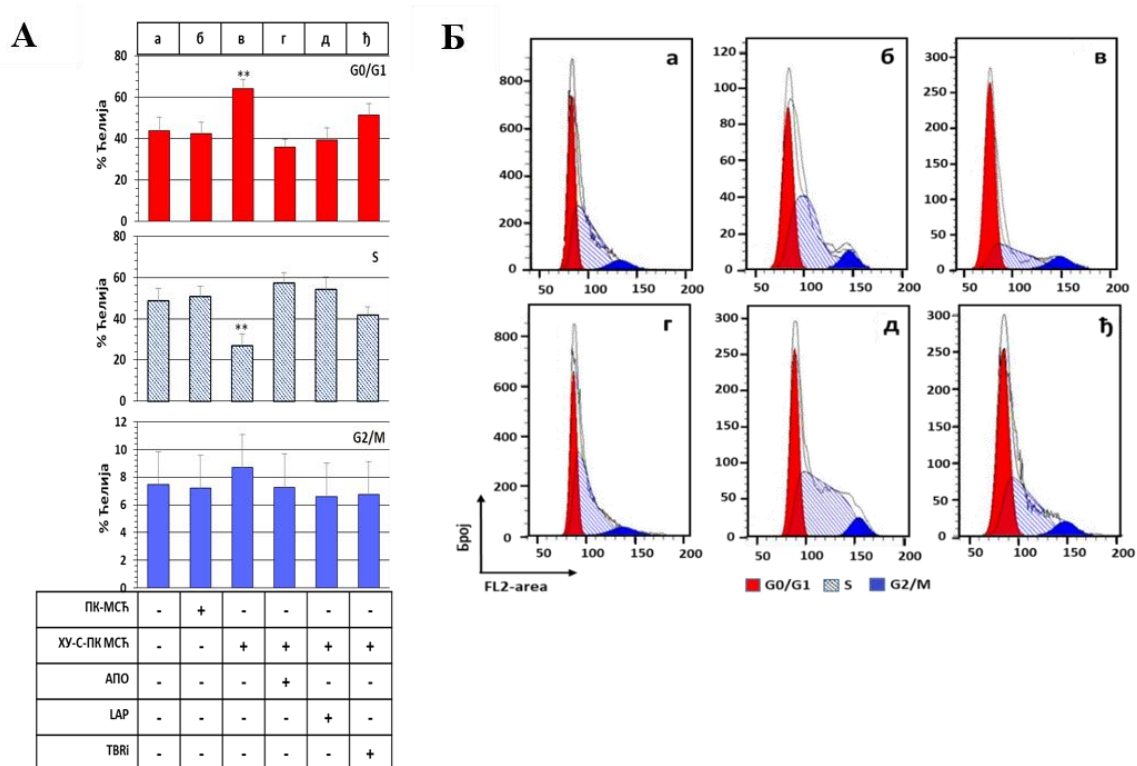


Б



**Слика 34. Инхибиција пролиферације HEL ћелија помоћу ХУ-С-ПК-МСЋ посредована оксидативним стресом и TGF- $\beta$ 1.** Стубићи представљају пролиферациони индекс CFSE-обојених HEL ћелија након тродневне пролиферације самостално или у ко-култури са ПК-МСЋ, са ХУ-С-ПК МСЋ у присуству и одсуству АПО, LAP и TBRi А). Хистограми приказују пролиферацију CFSE обојених HEL ћелија у ко-култури са ПК-МСЋ у истим условима као у А. Зелени хистограм интензитет CFSE боје необојених HEL ћелија, плави хистограм интензитет CFSE боје непролиферишућих HEL ћелија 0 времена третираних митомицином, црвени хистограм пролиферишуће HEL ћелије. Браон линијом је означен проценат пролиферишућих ћелија добијен на основу разблажења CFSE боје. Ћелије 0 времена су HEL ћелије третиране Митомицином (40  $\mu$ g/ml, 30 минута) непосредно након бојења. Приказани су репрезентативни резултати 3 независна експеримента као средње вредности  $\pm$  SEM (t тест \*p < 0,05 у поређењу са нетретираним ћелијама).

У истим експерименталним условима је анализиран ћелијски циклус HEL ћелија проточним цитометром након бојења пропидијум јодидом (Слика 35.). У поређењу са HEL ћелијама гајеним са нетретираним ПК-МСЋ, HEL ћелије гајене са ХУ-С-ПК-МСЋ су показале застој у  $G_0/G_1$  фази ћелијског циклуса на рачун смањења броја ћелија у  $S$  фази. Са друге стране, HEL ћелије које су пролиферисале у ко-култури са ХУ - ПК-МСЋ ко-третираним са апоцинином, LAP или TBRi имале су сличну дистрибуцију по фазама ћелијског циклуса као HEL ћелије које су пролиферисале са нетретираним ПК-МСЋ. Иако су HEL ћелије у ко-култури са ХУ-С-ПК-МСЋ показале смањену дистрибуцију у  $G_2/M$  фази, ова разлика није била статистички значајна.



**Слика 35. Инхибиција продукције оксидативног стреса и TGF- $\beta$ 1 штите пролиферацију HEL ћелија од инхибиторног ефекта ХУ-С-МСЋ.** (А) Апоцинин, LAP и TBRi спречавају инхибицију пролиферације HEL ћелија од ХУ-С-МСЋ. Стубићи представљају проценат ћелија у различитим фазама ћелијског циклуса А), док хистограм показује фазе ћелијског циклуса на основу садржаја ДНК Б), а, б, в, г, д и ђ репрезентују експерименталне услове наведене у А. Приказани су репрезентативни резултати 3 независна експеримента као средње вредности  $\pm$  SEM (t тест \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  у поређењу са нетретираним ћелијама).

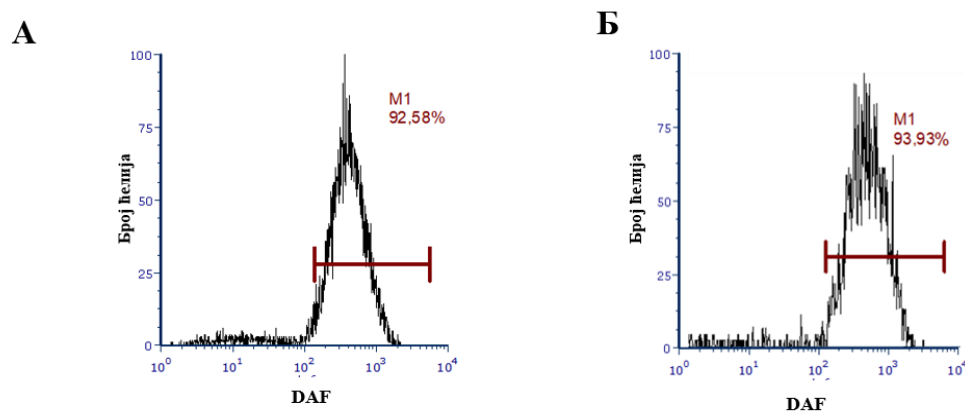
Ови резултати, откривају молекуларни механизам деловања ХУ-С-ПК-МСЋ на пролиферацију HEL ћелија. ХУ доводи до повећане продукције ROS и повећане



секреције TGF- $\beta$ 1 од стране ПК-МСЋ ћелија, који онда доводе до смањене пролиферације малигних HEL ћелија. Инхибиција продукције ROS или TGF- $\beta$ 1 сигналног пута довољна је да спречи инхибиторно деловање ХУ-С-МСЋ на пролиферацију HEL ћелија и застој ћелијског циклуса у у  $G_0/G_1$  фази.

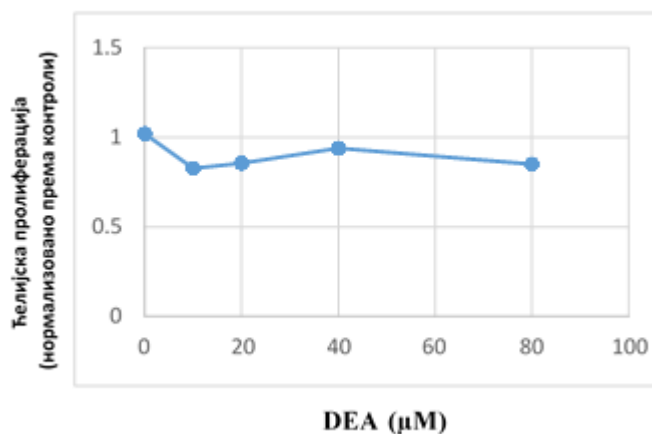
#### 4.3.2.1.2. Улога NO у инхибицији пролиферације HEL ћелија посредованој хидроксиуреом индукованим сенесцентним мезенхималним стромалним ћелијама

Због литературних података да продукција NO од стране МСЋ може утицати на пролиферацију малигних ћелија (Cassetta и сар., 2018), испитана је продукција NO од стране ХУ-С-МСЋ, као и утицај NO на вијабилност HEL ћелија. ПК МСЋ су третиране ХУ (200 $\mu$ М, 3 дана) а потом је у поређењу са нетретираним ПК МСЋ проточном цитометријом процењена продукција NO помоћу индикатора DAF који се у присуству NO претвара у флуоресцентни дериват DAF2. Процент ћелија које су позитивне на DAF2 је приближно једнак код нетретираних и ХУ-С-МСЋ, и износи 93.93% за нетретиране (Слика 36. А), односно 92.58% за ХУ-С-МСЋ (Слика 36. Б). Закључено је да МСЋ производе високе концентрације NO, али да третман ХУ не утиче на продукцију NO.



**Слика 36. Продукција NO од стране ХУ-С-МСЋ.** ПК-МСЋ су третиране ХУ (200 $\mu$ М, 3 дана) Б) а потом су заједно са нетретираним ћелијама А) бојене са DAF-FM и интрацелуларна флуоресценца је анализирана ради утврђивања нивоа NO. M1- DAF-FM позитивне ћелије.

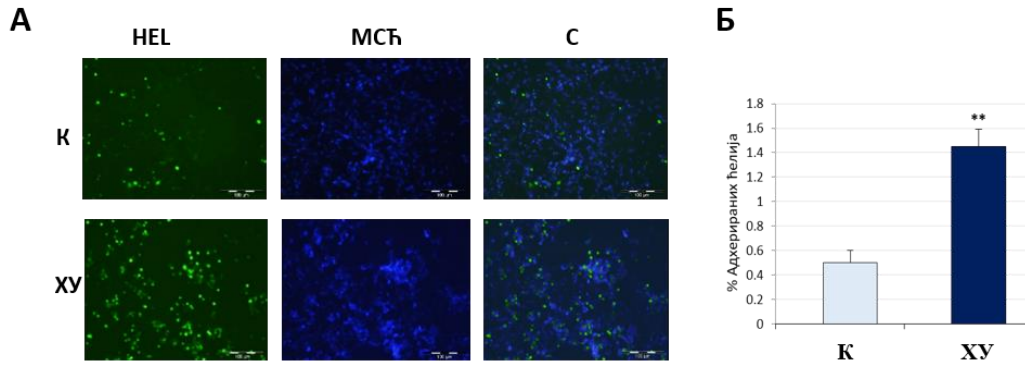
Испитујући ефекат различитих концентрација DEA (генератор NO) (10, 20, 40, 80  $\mu\text{M}$ ) на вијабилност HEL ћелија, мерећи апсорбанцу третираних и нетретираних ћелија показали смо да NO нема утицаја на вијабилност ових ћелија (Слика 37.).



**Слика 37. Ефекат NO на вијабилност HEL ћелија.** HEL ћелије су третиране растућим концентрацијама DEA (10, 20, 40, 80  $\mu\text{M}$ ) током 3 дана а потом је анализирана њихова вијабилност МТТ тестом.

#### 4.3.2.1.3. Повећана адхезија HEL ћелија на хидроксиуреа индуковане сенесцентне мезенхималне стромалне ћелије

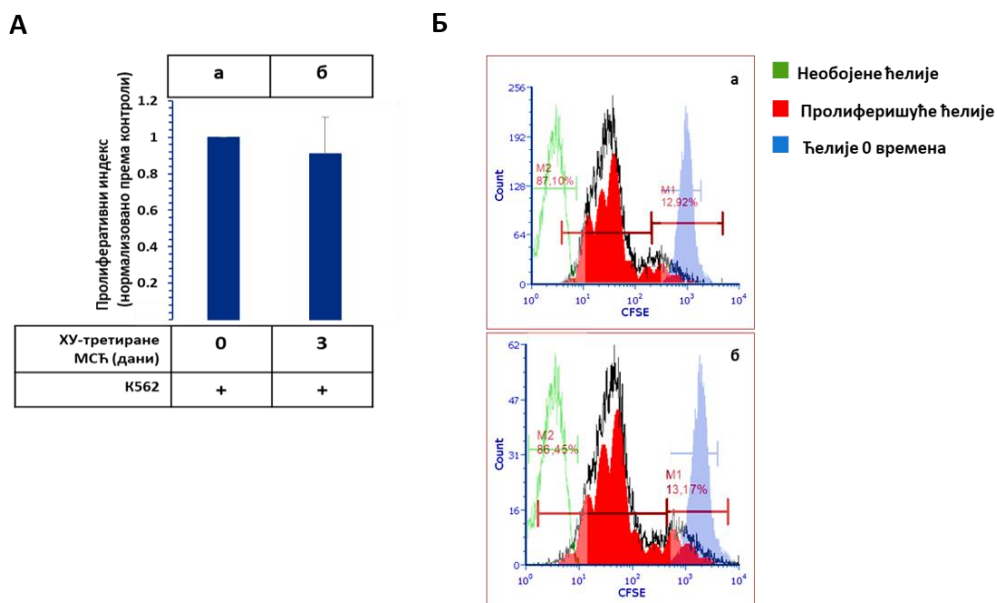
Познато је да сенесценција модификује способност ћелија да адхерирају на друге ћелије (Lunyak и сар., 2017). Из тог разлога спроведен је експеримент са циљем утврђивања способности HEL ћелија да адхерирају за ХУ-С-ПК МСЋ (ХУ 200 $\mu\text{M}$ , 3 дана) и контролне, нетретиране ћелије. Након 3 дана, третиране и нетретиране ПК МСЋ су ради визуализације бојене Hoechst 33342 а потом су још један дан гајене са CFSE бојеним HEL ћелијама. По завршеној инкубацији ћелије су опране да би се уклониле неадхериране HEL ћелије и посматране епи-флуоресцентним микроскопом. Значајнији проценат HEL ћелија адхерирао је за ХУ-С-МСЋ након једнодневног заједничког гајења ових ћелија у поређењу са контролом. Притом, није било промена у морфологији адхерираних HEL ћелија (Слика 38.).



**Слика 38. Адхерирање HEL ћелија на ХУ-С-ПК МСЋ.** А) Контролне ПК-МСЋ (К) и третиране ПК-МСЋ (ХУ 200 $\mu$ М 3 дана) (плаво) су гајене 1 дан са HEL ћелијама (зелено). С-спојене слике. Приказане су репрезентативне фотографије 3 независна експеримента (увеличање 20x, скала 100 $\mu$ m). Б) Стубићи показују статистички значајну разлику у способности HEL ћелија да адхерирају на третиране и нетретиране МСЋ. Приказани су репрезентативни резултати 3 независна експеримента као средње вредности  $\pm$  SEM (t тест  $**p < 0,01$  у поређењу са нетретираним ћелијама).

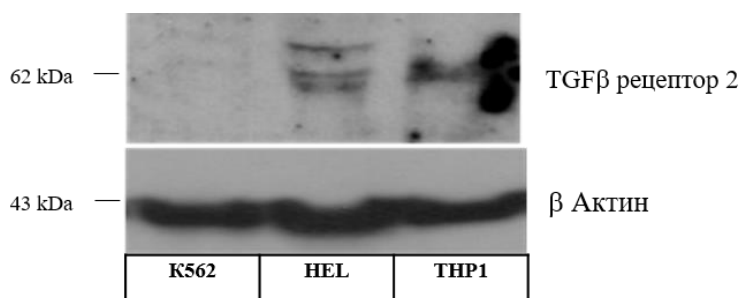
#### 4.3.2.2. Ефекат хидроксиуреом индукованих сенесцентних мезенхималних стромалних ћелија на пролиферацију K562 ћелија

Да би испитали ефекат ХУ-С-ПК МСЋ на пролиферацију K562 ћелија, ХУ-С-ПК-МСЋ и нетретиране ПК-МСЋ су гајене са CFSE обележеним K562 ћелијама 3 дана. Једна група K562 ћелија је третирана митомицином одмах по CFSE бојењу, са циљем заустављања пролиферације и те ћелије су назване ћелије 0 времена. Након 3 дана методом проточне цитометрије анализиран је утицај ХУ-С-ПК МСЋ и нетретираних ПК-МСЋ на пролиферацију K562 ћелија. Пролиферација K562 ћелија је праћена на основу пролиферативних индекса на исти начин као што је описано у одељку 4.3.2.1. Резултати су показали да није било разлике у пролиферацији ових ћелија што је показано на основу мерења пролиферационог индекса и степена разблажења CFSE боје (Слика 39).



**Слика 39. Пролиферација K562 у ко-култури са ХУ-С-ПК МСЋ.** А) Стубићи представљају пролиферативни индекс CFSE обележених K562 ћелија након гајења са нетретираним ПК-МСЋ и ХУ-С-ПК-МСЋ (ХУ 200 $\mu$ М, 3 дана). Б) Хистограми приказују пролиферацију CFSE обојених K562 ћелија у ко-култури са ПК-МСЋ у истим условима као у А. Браон линијом је означен проценат пролиферишућих ћелија у две генерације (M1 и M2) добијен на основу разблажења CFSE боје. Ћелије 0 времена су HEL ћелије третиране Митомицином (40  $\mu$ g/ml, 30 минута) непосредно након бојења. а и б представљају услове експеримента као у А.

Методом *Western blot* анализирана је експресија TGF- $\beta$ 1 рецептора 2 на HEL и K562 ћелијама. Као позитивна контрола су послужиле THP1 ћелије за које је познато да експримирају овај рецептор. Резултати показују да K562 ћелије не експримирају TGF- $\beta$  рецептор 2, док HEL и THP1 ћелије експримирају овај рецептор (**Слика 40.**).



**Слика 40. Експресија TGF- $\beta$  рецептора 2 код ћелијских линија.** Експресија TGF- $\beta$  рецептора 2 анализирана је *Western blot* методом код K562, HEL и THP1 ћелија. Актин је коришћен као контрола за количину протеина. Приказани су репрезентативни гелови, молекулске протеинске масе су изражене у kDa.

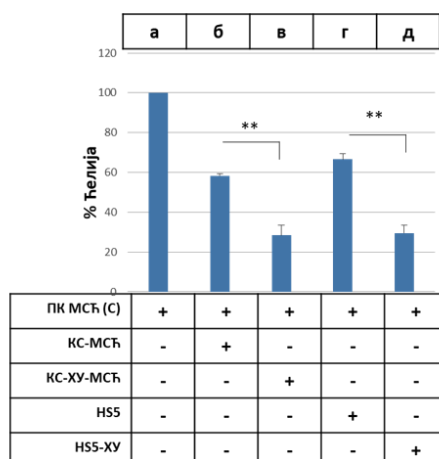
### **4.3.3. Имуномодулаторни ефекат хидроксиуреом индукованих сенесцентних мезенхималних стромалних ћелија**

Имуномодулаторни утицај ХУ-С-МСЋ је процењен на основу ефекта ових ћелија на пролиферацију Т лимфоцита и индукцију МСуЋ.

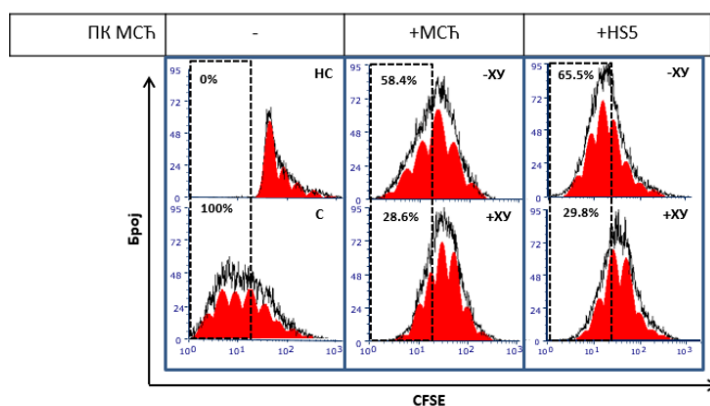
#### **4.3.3.1. Инхибиција пролиферације Т лимфоцита посредована хидроксиуреом индукованим сенесцентним мезенхималним стромалним ћелијама**

Једна од најзначајнијих карактеристика КС-МСЋ је њихова способност редукције пролиферације и активације Т ћелија (Skonieczna и сар., 2017). Да бисмо испитали овај ефекат ХУ третиране (200 $\mu$ М, 3 дана) и нетретиране КС-МСЋ, као и ћелије стромалне ћелијске линије HS5, су гајене у кокултури са ПК МНЋ још 3 дана. У групи ПК МНЋ пролиферација Т ћелија је активирана уз помоћ  $\alpha$ CD3/CD28 *micro-beads* пре кокултуре. Оба типа нетретираних ћелија, КС-МСЋ и HS5 су смањиле пролиферацију  $\alpha$ CD3/CD28 активираних Т лимфоцита на 65.5% односно 58.4% у поређењу са самосталном пролиферацијом стимулираних Т лимфоцита у монокултури, која је означена је са 100% (Слика 41. А и Б). Предтретман ХУ у трајању од 3 дана је повећао способност МСЋ да инхибирају Т ћелијску пролиферацију, редукујући пролиферацију Т ћелија на 29.8% у кокултури са ХУ-С-КС МСЋ и 28.6% у кокултури са ХУ-С- HS5. Третман ХУ је дуплирао имуносупресорни потенцијал МСЋ (Слика 41. А и Б).

А



Б



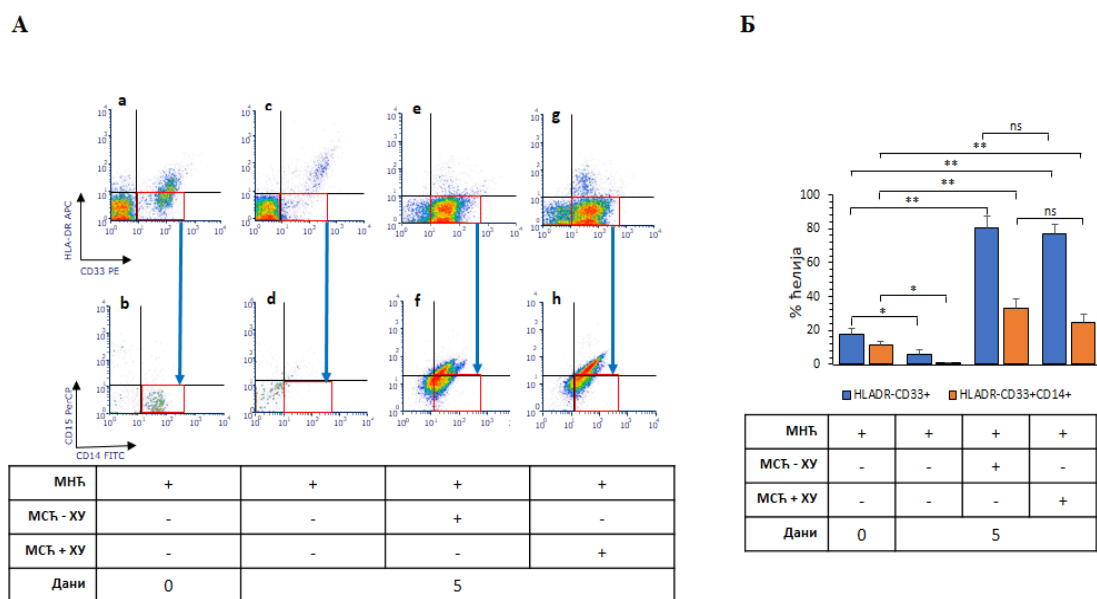
**Слика 41. ХУ потенциран инхибиторни ефекат МСЋ на Т ћелијску пролиферацију.**

А) Стубићи представљају проценат пролиферишућих ћелија добијен на основу разблажења CFSE боје. КС-МСЋ и HS5 ћелије су третиране ХУ (200 $\mu$ М, 3 дана) а потом су гајене 5 дана са ПК МНЋ обојеним CFSE бојом и третираним са  $\alpha$ CD3/CD28 *micro-beads* ради стимулације Т ћелијске пролиферације. Експериментална контрола су ПК-МСЋ нестимулисане (НС) и стимулисане (С) са  $\alpha$ CD3/CD28. Б) Хистограм приказује пролиферацију CFSE обојених ПК-МНЋ у истим условима као у А. Приказани су репрезентативни резултати 3 независна експеримента као средње вредности  $\pm$  SEM (t тест  $**p < 0,01$  у поређењу са нетретираним ћелијама).

**4.3.3.2. Индукција МСуЋ посредована хидроксиуреом индукованим сенесцентним мезенхималним стромалним ћелијама**

Још један начин на који МСЋ модулирају имуни одговор је путем индукције и експанзије имуносупресивних ћелија као што су МСуЋ (Wu и сар., 2020). Да би се испитао ефекат ХУ на способност индукције МСуЋ од стране МСЋ, ПК-МНЋ здравих испитаника су гајене током 5 дана самостално у медијуму, као и у кокултури са

нетретираним и ХУ третираним (200 $\mu$ М, 3 дана) КС-МСЋ. Након 5 дана МНЋ су анализирани проточном цитометријом на експресију МСуЋ маркера (CD33, HLA DR, CD14 и CD15) (Слика 42. А). На основу анализе експресије маркера укупних МСуЋ (CD33+/HLA DR-) и М-МСуЋ (CD33+/HLA DR-, CD14+/CD15-) показано је да је инкубација ПК МНЋ са КС МСЋ довела до повећане индукције и укупних МСуЋ (Слика 42. Б, плави стубићи) и М-МСуЋ (Слика 42. Б, наранџасти стубићи), у поређењу са ПК МНЋ које су гајене у монокултури. Са друге стране, није било значајне разлике у броју акумулираних М-МСуЋ током гајења са ХУ третираним и нетретираним КС-МСЋ (Слика 42.). Слични резултати су добијени када су ПК-МНЋ гајене са HS5.

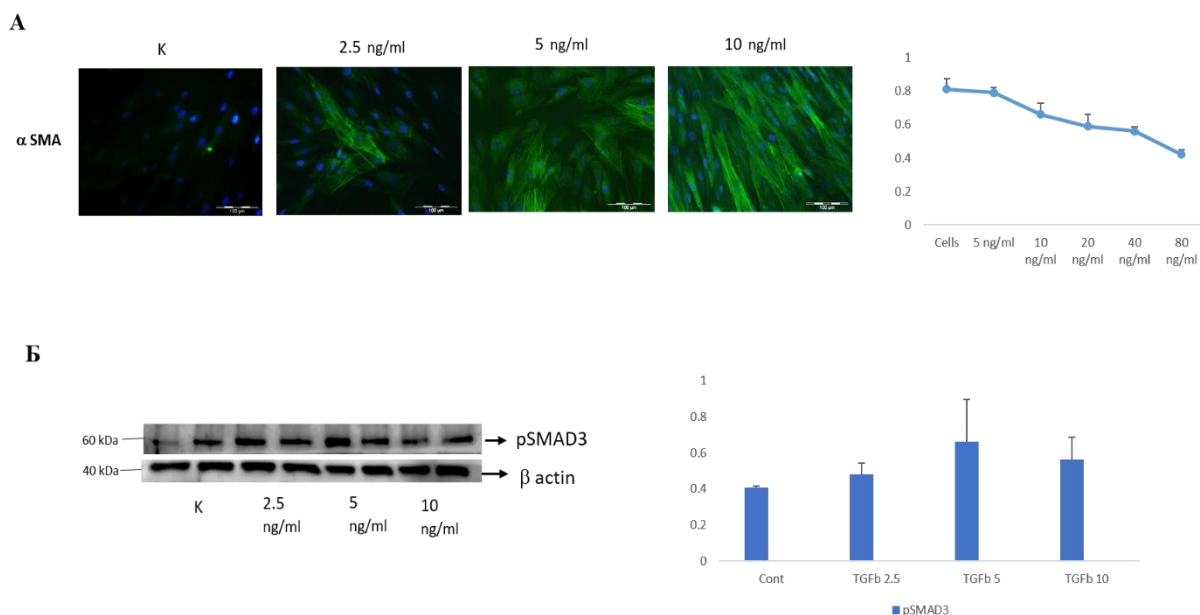


**Слика 42. Утицај КС-МСЋ на индукцију М-МСуЋ.** А) КС МСЋ су третиране ХУ (200 $\mu$ М, 3 дана) а потом су гајене 5 дана са ПК МНЋ здравих донора. Контролна група ПК-МНЋ је гајена у монокултури у истом временском периоду. ПК МНЋ су анализирани проточном цитометријом на присуство површинских маркера за МСуЋ. Квантификоване су ћелије означене црвеним квадратићем и означене као МСуЋ (HLADR-, CD33+) и М-МСуЋ (HLADR-, CD33+, CD14+, CD15-). Б) Стубићи показују квантификоване МСуЋ (плави стубићи) и М-МСуЋ (наранџасти стубићи). Приказани су репрезентативни резултати 3 независна експеримента као средње вредности  $\pm$  SEM (t тест \* $p < 0,05$  у поређењу са нетретираним ћелијама).

Ови резултати, као и резултати у 4.3.3.1. упућују на значајну способност МСЋ да врши имунолошку супресију путем инхибиције пролиферације Т ћелија и експанзије имуносупресивних МСуЋ. ХУ је потенцирала МСЋ посредовану супресију Т лимфоцита док није имала ефекат на експанзију укупних и моноцитних МСуЋ.

#### 4.3.4. Ефекат хидроксиуреом индукованих сенесцентних мезенхималних стромалних ћелија на испољавање профибротичног фенотипа

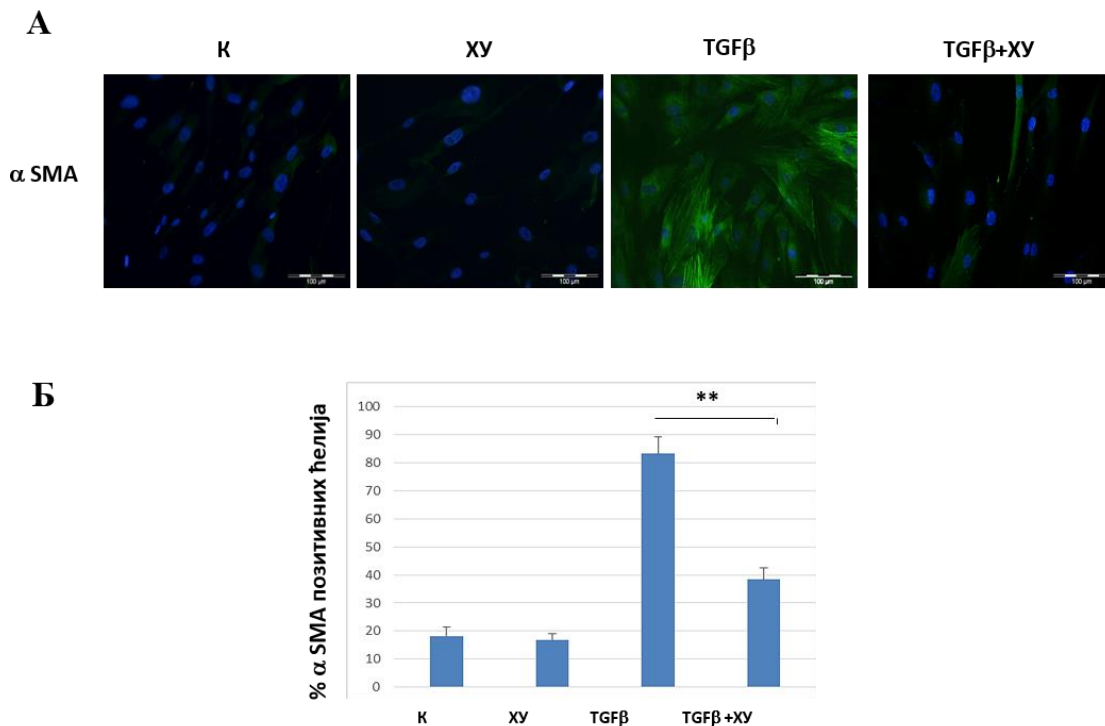
Познато је да сенесцентне ћелије ограничавају процес фиброзе спречавајући трансформацију МСЋ у миофибробласте (Meng и сар., 2020). За потребе овог истраживања формиран је TGF- $\beta$ 1 зависни модел фиброзе. КС МСЋ су третиране растућим концентрацијама TGF- $\beta$ 1 (2.5, 5 и 10ng/ml) током 2 дана, а потом је имунофлуоресцентном методом праћена експресија миофибробластног маркера  $\alpha$ SMA и фосфорилација SMAD3 протеина *Western blot* методом. Овај третман је довео до дозно-зависног повећања експресије  $\alpha$ SMA (Слика 43. А) и повећања фосфорилације и активације SMAD3 протеина (48-72 сата) (Слика 43. Б).



**Слика 43. TGF $\beta$ 1 дозно зависна индукција профибротичног фенотипа МСЋ.** КС МСЋ су третиране растућим концентрацијама TGF- $\beta$ 1 (2.5, 5 и 10ng/ml) током 2 дана. А) Имунофлуоресцентна анализа  $\alpha$ SMA позитивних ћелија (зелено). Једра су визуализована DAPI бојењем (плаво). Приказане су репрезентативне фотографије 3 независна експеримента (увеличање 20x, скала 100 $\mu$ m). Б) Фосфорилација SMAD3 након третмана XV (200 $\mu$ M, 3 дана) КС-МСЋ анализирано *Western blot* методом. Табела показује релативне денситометријске вредности добијеног сигнала.  $\beta$  актин је коришћен као контрола за количину протеина. Приказани су репрезентативни гелови, молекулске протеинске масе су изражене у kDa. Приказани су репрезентативни резултати 3 независна експеримента као средње вредности  $\pm$  SEM (t тест \* $p < 0.05$  и \*\* $p < 0,01$  у поређењу са нетретираним ћелијама).

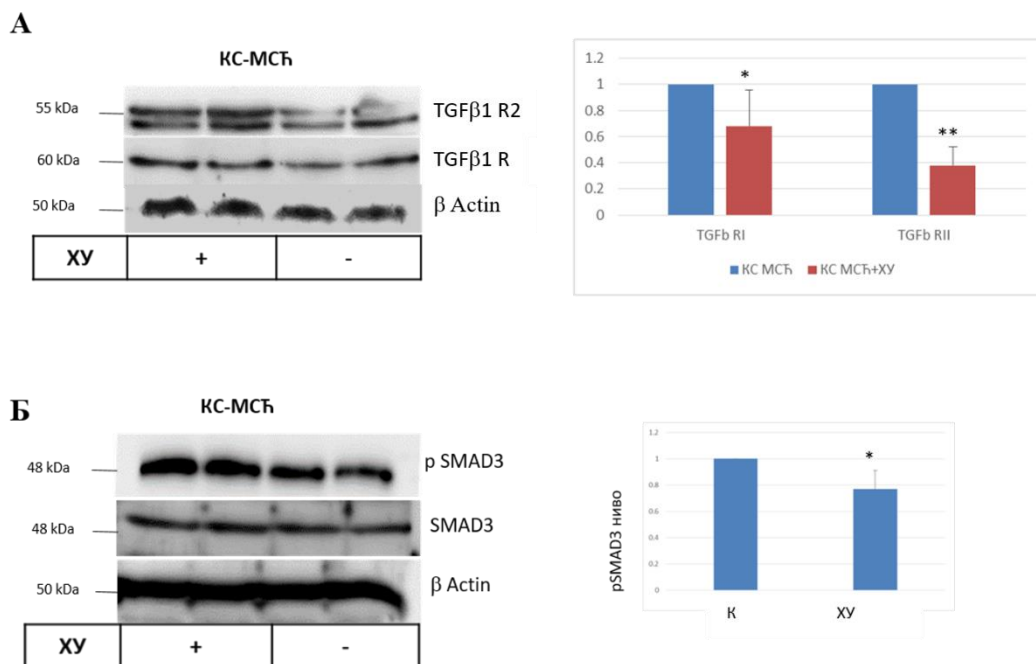


У даљем току, са циљем испитивања утицаја ХУ-С-МСЋ на профибротични ефекат TGF- $\beta$ 1, ХУ третиране (200 $\mu$ М, 3 дана) и нетретиране КС МСЋ су инкубирани у присуству TGF- $\beta$ 1 у концентрацији од 5ng/ml још 2 дана, а потом је имунофлуоресцентном микроскопијом анализирана позитивност на интрацелуларни маркер миофибробласта  $\alpha$ SMA (Слика 44. А). На основу квантификације  $\alpha$ SMA позитивних ћелија (Слика 44. Б) закључено је да су ХУ-С-МСЋ биле отпорне на профибротични ефекат TGF- $\beta$ 1 који се огледа у индукцији миофибробластног фенотипа.



**Слика 44. Утицај ХУ-С-МСЋ на испољавање TGF- $\beta$  зависног профибротичног фенотипа КС-МСЋ.** КС-МСЋ су третиране TGF- $\beta$  (5ng/ml, 2 дана) појединачно или у комбинацији са ХУ (200 $\mu$ М, 2 дана) а потом је имунофлуоресцентном микроскопијом испитивана испољеност миофибробластног фенотипа ( $\alpha$  SMA позитивне ћелије) (зелено). Једра су визуализована DAPI бојењем (плаво). Приказане су репрезентативне фотографије 3 независна експеримента (увеличање 20x, скала 100 $\mu$ m). Б) Стубићи показују статистички значајно смањење TGF $\beta$  индуковане  $\alpha$ SMA позитивности након третмана ХУ. Приказани су репрезентативни резултати 3 независна експеримента као средње вредности  $\pm$  SEM (t тест \*\* $p$ <0,01 у поређењу са нетретираним ћелијама).

Да би смо утврдили механизам којим ХУ-С-МСЋ показују смањену осетљивост на профибротични ефекат TGF- $\beta$ , КС МСЋ су третиране ХУ (200 $\mu$ М, 3 дана) а потом је у овим ћелијама *Western blot* анализом испитана експресија рецептора за TGF- $\beta$ 1 и фосфорилација SMAD3 протеина. Упоредо су као контрола анализирани нетретиране КС МСЋ. Резултати су показали да је третман ХУ довео до статистички значајног снижења експресије рецептора 1 и 2 за TGF- $\beta$ 1 (Слика 45. А). Поред тога, овај третман је смањио фосфорилацију TGF- $\beta$ 1-зависног протеина SMAD3 (Слика 45. Б). Ови резултати упућују на заључак да у ХУ-С-МСЋ постоји смањена активација TGF $\beta$ /SMAD3 сигналног пута.



**Слика 45. Утицај ХУ на експресију рецептора за TGF- $\beta$ 1 и SMAD3 у КС-МСЋ.** А) Анализа експресије рецептора за TGF $\beta$ 1 1 и 2 *Western blot* методом након третмана КС-МСЋ ХУ (200 $\mu$ М) 3 дана. Б) Фосфорилација SMAD3 након третмана ХУ (200 $\mu$ М, 3 дана) КС-МСЋ анализирано *Western blot* методом. Стубићи поред слика показују релативне дензитометријске вредности добијеног сигнала.  $\beta$ -актин је коришћен као контрола за количину протеина. Приказани су репрезентативни гелови, молекулске протеинске масе су изражене у kDa. Приказани су репрезентативни резултати 3 независна експеримента као средње вредности  $\pm$  SEM (t тест \* $p < 0.05$  и \*\* $p < 0,01$  у поређењу са нетретираним ћелијама).

Према нашим резултатима ХУ-С-МСЋ су отпорне на профибротични ефекат TGF- $\beta$ 1 који се огледа у смањеној индукцији  $\alpha$ SMA позитивних миофибробласта, услед смањене експресије рецептора за TGF- $\beta$ 1 и смањене активације TGF- $\beta$ /SMAD3 сигналног пута у ХУ-С-МСЋ.

## 5. ДИСКУСИЈА

Ћелијске културе већ деценијама представљају један од најзначајнијих модел система за изучавање физиолошких и биохемијских ћелијских процеса, молекуларних основа болести, а представљају и одличну платформу за испитивање механизма деловања терапијских агенаса. Примарне ћелије репрезентују ткива из којих потичу и представљају терминално диференциране ћелије са ограниченим пролиферативним капацитетом, а изузетак су недиферентоване, матичне ћелије. Матичне ћелије имају капацитет регенерације и диференцијације у специјализоване ћелије ткива и органа и као такве, представљају значајно средство у ћелијској терапији, ткивном инжењерингу и регенеративној медицини (Atala и сар., 2008; Caglayan и сар., 2019). Бројне етичке дилеме које прате примену плурипотентних ембрионалних матичних ћелија нису везане за примену адултних мултипотентних матичних ћелија. Адултне МСЋ представљају одличан експериментални модел и имају велику примену како у клиничким тако и у фундаменталним истраживањима због својих повољних карактеристика. Оне су по својој природи адхерентне, расту релативно брзо, имају способност диференцијације а због своје хипоимуногености представљају и значајно средство за циљану испоруку лекова и хемиотерапеутика у ткива (Pittenger и сар., 2019). Постоји више од 1050 клиничких студија које сведоче о безбедности и ефикасности њихове примене, посебно у области регенеративне медицине (Levy и сар., 2020).

У истраживању биолошких карактеристика МСЋ, најчешће и најдуже коришћене МСЋ су порекла костне сржи. Главни изазов у употреби ових ћелија је њихова релативна малобројност у костној сржи. Оне чине свега 0,001–0,01% од укупних мононуклеара костне сржи па је за њихову клиничку или експерименталну примену неопходна *in vitro* експанзија (Berebichez-Fridman и сар., 2017). Други проблеми везани за њихову употребу су инвазивност процедуре за добијање ових ћелија, хетерогеност добијене популације, велике варијације у приносу, диференцијационом и пролиферативном потенцијалу. Ове разлике у квалитету КС МСЋ се могу објаснити разноврсним методама изолације и гајења ћелија од стране различитих лабораторија, али и индивидуалним карактеристикама донора међу којима је најзначајнија старост донора (Bhat и сар., 2021; Cheng и сар., 2014). У студији изведеној у оквиру ове дисертације МСЋ су добијене из фрагмената кости свих даваоца, иако се радило о старијим болесницима просечне

старости од 75 година. Узорци су добијени у стерилним и асептичним условима, а у лабораторији су обрађивани свега неколико сати од спроведене оперативне процедуре. Ипак за даљу процену успешности изолације потребна је опсежнија анализа на већем броју узорака.

Због наведених карактеристика КС МСЋ, истраживачи су трагали за другим, алтернативним изворима МСЋ. Иако се ове ћелије могу изоловати из готово сваког ткива човековог организма, карактеристике идеалног извора не испуњава ни једно од доступних ткива. Оптималан извор МСЋ је богат прогениторима, лако доступан, уз неинвазивност процедуре добијања ћелија, а сам поступак добијања МСЋ би требао бити без већих постпроцедуралних ризика. Периферна крв се сматра значајним и лако доступним извором МСЋ а методологија њиховог добијања се може сматрати минимално инвазивном. Проблем је што у физиолошком стању организма ове ћелије циркулишу у малом броју (Roufosse и сар., 2004). У нашој лабораторији МСЋ су успешно изоловане из периферне крви 3 даваоца од укупно 20, што је у складу са досадашњим искуствима (Trivanović и сар., 2013). Тешкоће добијања ових ћелија настају из више разлога. Неки истраживачи сматрају да се смањује њихова адхерентност након мобилизације у циркулацију. Поред тога, протоколи за њихову изолацију нису добро дефинисани и стандардизовани. Да би повећали мобилизацију ПК МСЋ из костне сржи неке лабораторије користе G-CSF. Сматра се да овај метод није повољан јер овако добијене ћелије поред стандардне фибробластне морфологије показују повећану експресију хематопоетских маркера, те не испуњавају све прописане критеријуме за МСЋ (Berebichez-Fridman и сар., 2017; Dabiri и сар., 2018).

МСЋ костне сржи и периферне крви, коришћене у овом раду су окарактерисане према својим морфолошким особинама, способности диференцијације и имунофенотипу према критеријумима Комитета за МСЋ Међународног друштва за ћелијску терапију (Dominici M и сар., 2006). Гајене у стандардном медијуму и без додатних фактора, МСЋ су демонстрирале типичну фибробластну морфологију, адхерентност за пластику и раст у колонијама. У процесу пасажирања, ћелије су одлепљиване раствором трипсина и EDTA и примећено је да се у раним пасажама губе ситније полигоналне ћелије које су чврсто адхерирале за подлогу и показале мању осетљивост на трипсин. Такође, непосредно по одлепљивању а након бојења са трипан плавим, показано је да смо располагали са великих бројем живих ћелија (>96%). Ова запажања указују да смо на овај начин добили хомогену популацију МСЋ високе

вијабилности која је коришћена до 15. пасаже, а да су ћелије које су одстрањене током пасажирања моноцити и макрофаги што је у складу са резултатима других лабораторија (Heng и сар., 2009; Sun и сар., 2003). Оба типа МСЋ, порекла костне сржи и периферне крви су показале сличан имунофенотипски профил, у складу са минималним критеријумима Комитета. Више од 95% ћелија је било позитивно на мезенхималне маркере док је минималан број ћелија експримирао хематопоеетске маркере (Friedenstein и сар., 1976; Pittenger и сар., 1999; Dominici и сар., 2006). Способност вишелинијске диференцијације ПК МСЋ и КС МСЋ је потврђена након гајења у диференцијационим медијумима за остеогену и адипогену диференцијацију. Описаним методама је потврђено да смо у оквиру овог истраживања користили хомогену и пречишћену популацију ћелија, мезенхималног фенотипа са високим потенцијалом диференцијације ка мезодермалној линији.

ХУ представља антинеопластични агенс који се користи у терапији мијелопролиферативних неоплазми, анемији српастих ћелија и псоријази. ХУ се користи и као циторедуктивна палијативна терапија код акутне мијелоидне леукемије старијих особа. У складу са пренаменом примене лека, ХУ налази и нове индикације попут спиналне мишићне атрофије, а користи се и као један од агенаса у лечењу инфекције изазване вирусом ХИВ (Ware и сар., 2009; PubChem, 2021). Због својих повољних карактеристика, попут терапијске ефикасности и безбедности, ХУ је од стране Светске здравствене организације сврстана у групу есенцијалних лекова (WHO, 2015). У лечењу хематолошких малигнитета, овај хемиотерапеутик има релативно непознат утицај на микросредину костне сржи. Стога, истраживања у оквиру ове дисертације су спроведена са циљем испитивања ефекта ХУ на морфологију и функционалне карактеристике МСЋ. Под утицајем ХУ, МСЋ су измениле своју фибробластну морфологију, те су након третмана изгледале увећано и заравњено. Такође, ове промене су праћене редукцијом у броју ћелија. Од раније је познат антипролиферативни ефекат ХУ на хематопоеетске матичне ћелије (Muñiz-Rivera-Cambas и сар., 2018) а малобројна истраживања су демонстрирала да терапијске концентрације овог лека смањују и број хуманих МСЋ (Li и сар., 2010). Просечна концентрација лека у крви након оралне администрације износи 100-200 $\mu$ М (Kühn и сар., 2003), те су ове терапијске концентрације лека коришћене у овој студији за *in vitro* третман МСЋ. У складу са добијеним резултатима као и претходним истраживањима у наредним експериментима

је пред ХУ третман засађивано три пута више МСЋ да би након третмана располагали са једнаким бројем третираних и нетретираних ћелија.

Циторедуктивно дејство ХУ заснива се на инхибицији рибонуклеозид-дифосфат редуктазе, ензима значајног за ДНК синтезу (Young и сар., 1967). ХУ као индуктор репликативног стреса доводи до прекида двоструког хеликса ДНК, водећи у застој ћелијског циклуса (Petrova и сар., 2016). Познато је да овај ефекат зависи од дужине третмана, па су у нашим експериментима ПК МСЋ третиране ХУ у трајању од 3 и 6 дана. ДНК оштећење се манифестује као присуство хетерохроматинских жаришта, такозваних ДНК ожиљака, који се могу детектовати  $\gamma$ H2AX бојењем. У складу са претходним истраживањима, третман ПК-МСЋ ХУ у оба наведена временска интервала, резултирао је повећаном експресијом маркера прекида дволанчане ДНК- $\gamma$ H2AX, а примећено је и формирање микронуклеуса што потврђује да као одговор на ХУ долази до ДНК оштећења. На основу претходних истраживања спроведених углавном на ћелијским линијама може се предпоставити да је генотоксични ефекат овог цитостатика реверзибилан (Santos и сар., 2011) а испитивања на болесницима са анемијом српастих ћелија сугеришу да је канцерогени и мутагени потенцијал *in vivo* третмана ХУ низак (Hanft и сар., 2000).

Поред туморских ћелија и друге, нетрансформисане ћелије као део туморске микросредине подложне су утицају хемиотерапије (Eckert и сар., 2021; Maddika и сар., 2006). Према спроведеној МТТ анализи и анализи ћелијског циклуса, ХУ ихибира пролиферацију ПК МСЋ. Овај третман је довео до повећања броја ћелија које су у S фази ћелијског циклуса највећим делом на рачун смањења броја ћелија у  $G_0/G_1$  фази. Познато је да је овај ефекат дозно и временски зависан (Yarbro и сар., 1992), те су МСЋ третиране растућим концентрацијама ХУ током 3 и 6 дана, а максималан ефекат је постигнут терапијским концентрацијама лека. Иако претходно није испитиван ефекат ХУ на ћелијски циклус МСЋ, овај утицај је добро проучен испитивањима на ћелијским линијама. ХУ доводи до застоја пролиферишућих ћелија у S фази због смањења количине расположивих дезоксирибонуклеотида, које надаље успорава кретање ДНК полимеразе дуж репликационе виљушке. Смањено ћелијско снабдевање дезоксирибонуклеотидима након третмана се ХУ одвија преко инхибиције рибонуклеотид-редуктазе, ензима који показује максималну активност у S фази (Singh и сар., 2016; Petrova и сар., 2016). Застој у S фази доводи до активације контролне тачке S фазе, интрацелуларног процеса који се јавља као одговор на ДНК оштећење са циљем

одржавања генетске стабилности у току репликационог стреса. Услед активације контролне тачке *S* фазе под утицајем ХУ долази до споре прогресије ћелија кроз ову фазу и застоја у ћелијском циклусу, не дозвољавајући даљи ток ћелијског циклуса ка митози (Alvino и сар., 2007; Marusyk и сар., 2007). Према нашим резултатима а на основу броја BrdU позитивних ћелија, ХУ доводи до акумулације МСЋ управо у овој, раној *S* фази ћелијског циклуса. Такође, примећен је и смањен број ћелија у *G<sub>2</sub>/M* фази. Иако нема објашњења за овај феномен, могуће је да ћелије које остају у *G<sub>2</sub>/M* фази, независно од акумулираних ћелија у *S* фази, даље прогредирају кроз ћелијски циклус, али када уђу у следећи циклус под утицајем ХУ се акумулирају у *S* фази и не пролазе даље у *G<sub>2</sub>/M* фазу. Резултати добијени на КС МСЋ су у складу са цитостатском природом ХУ (Singh и сар., 2016; Nazha и сар., 2016). ХУ у терапијској концентрацији, доводи до акумулације КС-МСЋ у *S* фази, уз редукцију броја ћелија у *G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>* које није праћено статистички значајним повећањем броја рано и касно апоптотичних ћелија.

Као последица стабилног застоја у ћелијском циклусу настаје ћелијска сенесценција, стање које се карактерише секреторним фенотипом који доприноси старењу и болестима у вези са старењем (Childs и сар., 2015). ХУ, хемиотерапеутик из класе антимераболита, доводи до ДНК оштећења који води у превремену сенесценцију трансформисаних и нетрансформисаних ћелија у процесу познатом као хемотерапијом идукована сенесценција (Bahl и сар., 2009). Настало ДНК оштећење под утицајем индуктора сенесценције представља један од маркера сенесцентног стања и може се детектовати  $\gamma$ H2AX и 53BP1 бојењем (Rodier и сар., 2011). Сенесценција и застој у ћелијском циклусу настаје путем активације два главна протективна сигнална пута p53/p21<sup>CIP1</sup> и p16<sup>INK4</sup>/Rb, значајна у контроли напредовања ћелијског циклуса из *G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>* у *S* фазу (Campisi и сар., 2005). Ниједан маркер није апсолутно специфичан за сенесценцију, па је за детекцију сенесцентних ћелија предложен панел биомаркера који обухватају  $\beta$ -gal, p16<sup>ink4</sup>, p21<sup>CIP1</sup> и SAPS (Dodig и сар., 2019). Према нашим резултатима ХУ доводи до сенесценције ПК МСЋ која се карактерише типичном морфологијом ћелија и повећаном експресијом сенесцентних маркера  $\beta$ -галактозидазе након 3 дана и p16<sup>ink4</sup> након једнодневнег третмана терапијским концентрацијама овог хемиотерапеутика. Примећен је и умерени пораст експресије p21<sup>CIP1</sup> након тродневног третмана ХУ. С обзиром да се типична морфологија и експресија сенесцентних маркера одржала и 3 дана по укидању третмана може се претпоставити да је сенесценција ПК МСЋ стабилан процес. Сматра се да ХУ доводи до сенесценције и застоја у ћелијском

циклусу МСЋ механизмом који је независан од активације p53/p21<sup>CIP1</sup> сигналног пута. Претходна истраживања на ћелијским линијама су показала да антимаболити попут ХУ, који доводе до смањења расположивости деоксирибонуклеотида, омогућавају прогресију из *G0/G1* у *S* фазу и заустављање циклуса у раној *S* фази, механизмом који не закева активацију p53/p21<sup>CIP1</sup> (Magusyk и сар., 2007; Linke и сар., 1996). Са друге стране, постоје контрадикторни подаци који показују да експресија p16<sup>ink4</sup>, може бити повећана или снижена након третмана ХУ, што углавном зависи од типа ћелија (Petrova и сар., 2016; Yeo и сар., 2000). Занимљиво је да код еритролеукемијске p53-дефицијентне K562 ћелијске линије, ХУ доводи до сенесценције путем повећане активације p16<sup>ink4</sup> (Petrova и сар., 2016). Према резултатима наших експеримената главни ефекат ХУ на ПК МСЋ је повећана експресија p16<sup>ink4</sup> док повећање експресије p21<sup>CIP1</sup> није било статистички значајно. У раној фази ДНК оштећења, први механизам који се активира је повећана експресије p16<sup>ink4</sup> чиме се спречава даља акумулација оштећења и пролиферација оваквих ћелија пре пуног развоја репликативне сенесценције (Corré и сар., 2011). Са друге стране, ДНК оштећење које је праћено застојем ћелијског циклуса у *S* фази није праћено повећањем у експресији p21<sup>CIP1</sup> (Borel и сар., 2002).

Слични резултати су добијени и након истог третмана КС МСЋ које су повећано експримиране лизозомални ензим β-галактозидазу и p16<sup>ink4</sup>, а са повећањем β-галактозидазе примећено је и повећање у броју лизозома. Акумулација и повећана продукција лизозома у сенесцентним ћелијама се дешава због покушаја ћелије да компензује нагомилавања дефектних лизозома и повезана је са последичним порастом ROS (Gorgoulis и сар., 2019). Ови резултати сугеришу да су механизми укључени у ХУ индуковану сенесценцију зависни од типа ћелија, као и времена експозиције и концентрације лека.

Ради разумевања механизма укљученог у индукцију сенесценције од стране ХУ, анализирали смо утицај ХУ на промене у редокс хомеостази. Познато је да ROS, као регулатори ћелијске пролиферације, има значајну улогу у настанку превремене сенесценције МСЋ (Brandl и сар., 2011; Burova и сар., 2013). Повећан ниво водоник пероксида, хипохлорне киселине, супероксид анјона, као резултат поремећаја у редокс равнотежи, доводи до оштећења протеина, липида и ДНК доприносећи болестима које су повезане са старењем (Borodkina и сар., 2014). *In vitro* третман МСЋ са ХУ довео је до дозно зависног повећања нивоа ROS. Да је оксидативни стрес значајан механизам у



ХУ-С-МСЋ, показано је након ко-третмана антиоксидансима, апоцинином-инхибитором NADPH оксидазе (NOX) и сакупљачем ROS-NAC, који су заштитили МСЋ од просенесцентног утицаја ХУ. Познато је и да апоцинин, који се може сматрати сенолитиком, штити МСЋ од сенесценције под утицајем H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sun и сар., 2015). Такође, ови антиоксиданси су заштитили пролиферацију МСЋ од инхибиторног утицаја ХУ уз редукцију броја ћелија које су се нашле у S фази ћелијског циклуса, док појединачни третмани са апоцинином и NAC нису имали утицај на ћелијски циклус и пролиферацију. Према истраживањима Yu и сар. (Yu и сар., 2015) ROS убрзавају транзицију из G1 у S фазу па је могуће разматрати улогу ROS у G1-S транзицији и последичној акумулацији ћелија у S фази у ПК МСЋ ћелијама третираним ХУ.

Механизми којима ХУ индукује оксидативни стрес нису довољно проучени. Скорашње студије су показале да ХУ повећава ниво унутарћелијских ROS путем инхибиције ензима супероксид-дисмутазе 2 и митохондријалне-деацетилазе Sirt-3 (Zhai и сар., 2017; Dong и сар., 2014). Такође, ХУ доводећи до колапса репликационе виљушке може проузроковати повећан ниво ROS (Singh и сар., 2016). Значајно је и да ХУ преко стимулације продукције ROS, посебно путем повећања нивоа H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> може довести до ДНК оштећења (Sakano и сар., 2001). Ови ефекти су уочени на квасницама и бактеријама, а потребна су даља истраживања да потврде овај ефекат на ћелијама сисара (Ziegler-Slylakakis и сар., 1985). Занимљиво је да се формирање слободног радикала супероксид анјона, одвија уз учешће NADPH оксидазе која има 5 изоформи, од којих су NOX1 и NOX2 зависни од GTPазе-Rac1, док NOX4 и NOX5 функционишу независно од Rac1 (Altenhöfer и сар., 2015). Наша претходна истраживања са укључивањем апоцинина дозвољавају нам да разматрамо улогу NOX у стварању ROS под утицајем ХУ (Stefanska и сар., 2008). У покушају да установимо тачан механизам у генерисању ROS у ХУ-С-МСЋ у наше експерименте смо укључили и Rac1 инхибитор који није имао утицај на индукцију сенесценције МСЋ под утицајем ХУ. Ови резултати упућују на закључак да у ХУ стимулисаној продукцији ROS у МСЋ, као механизму који је одговоран за настанак сенесценције, значајну улогу имају Rac1 независни NOX4 и NOX5. У молекуларном механизму којим ХУ доводи до повећања ROS у скорије време је разматрана улога инхибиције супероксид дисмутазе, која настаје због епигенетских модификација и учешћа сигналних путева попут MAPK, PKG и PKA (Hodge и сар., 2005; Pule и сар., 2015).

Кључну улогу у успостављању сенесценције има серин/треонин протеин киназа, mTOR. Након заустављања ћелијског циклуса уз учешће инхибитора циклин зависних киназа p16<sup>ink4</sup> и p21<sup>CIP1</sup>, за настанак сенесценције у процесу познатом под називом героконверзија, важна је активација mTOR и ERK/MAPK сигналних путева (Vlagosklonny и сар., 2018). Стога, изгледа да је за успостављање ћелијске сенесценције потребна активација mTOR и као таква, геноконверзија вођена mTOR, може бити супримирана mTOR инхибиторима (рапалозима) (Liu и сар., 2020; Saoudaoui и сар., 2021). Супротно од тога, наши резултати показују да је у ХУ-С-МСТћ активација mTOR смањена. ХУ је довела до смањеног степена активације изражене као однос фосфорилисане и укупно експримиране форме mTOR у оба типа ћелија, ПК и КС МСТћ са максималним ефектом након дводневног и тродневног третмана. Додатно, блокада mTOR Еверолимуом није довела до индукције сенесценције КС МСТћ, што упућује на закључак да mTOR инхибиција, иако се може сматрати значајним механизмом није довољна да проузрокује сенесценцију КС МСТћ у нашим експерименталним условима. Заправо, mTOR инхибиција рапалозима попут Еверолимуса има сенолитички ефекат и продужава животни век ћелија (Vlagosklonny и сар., 2017). Ипак, новија истраживања на КС МСТћ показују да нису све ћелије подједнако осетљиве на сенолитички ефекат рапалога, а могуће објашњење лежи у различитој иницијалној експресији p16<sup>ink4</sup> (Antonioli и сар., 2019). Познато је да mTOR инхибиција селективно смањује транслацију mRNA проинфламаторних цитокина и стимулише аутофагију што су два механизма значајна за сенесценцију и могу имати улогу у регулацији SASP (Laberge и сар., 2015; Jung и сар., 2009). Ипак даљи експерименти су неопходни да би се установио тачан механизам инхибиције mTOR и значај овог сигналног пута у пресенесцентним и сенесцентним стањима МСТћ узрокованим ХУ третманом.

Тачан молекуларни механизам укључен у регулацију унутарћелијске сигнализације након третмана ХУ није довољно разјашњен. Досадашња истраживања на еритролеукемијским ћелијама су показала да у одговору на ХУ долази до модификација сигнала MAPK укључујући ERK, p38 и JNK, што су механизми којима се регулише производња феталног хемоглобина (Walker и сар., 2011; Pule и сар., 2015). У даљем току испитана је улога сигналних путева MAPK и JAK/STAT, значајних за ћелијску пролиферацију у ХУ-С-МСТћ. Иако ХУ није имала утицај на ERK1/2 сигнални пут, узроковала је смањену активацију p38 у МСТћ. Активација p38 у одговору на стресоре се повезује са апоптозом ћелија, а у ћелијској сенесценцији активација овог сигналног пута

је значајна за продукцију проинфламаторних цитокина попут IL-6 у оквиру SASP (Debacq-Chainiaux и сар., 2010; Alimbetov и сар., 2016). Још један сигнални пут се доводи у везу са сенесценцијом и проинфламаторним SASP, а то је JAK/STAT (Ху и сар., 2016). Тродневни третман ХУ довео је до смањене активације JAK1 и STAT3 у МСЋ. Додатна истраживања су потребна да би се разумело да ли је инхибиција ових сигналних путева повезана са сенесценцијом и регулацијом профила SASP.

Поред улоге у ћелијској пролиферацији, mTOR, MAPK и JAK/STAT имају значајну улогу и у диференцијацији МСЋ. Активација mTOR у МСЋ је значајна за адипогенезу а рапалозима је могуће инхибирати диференцијацију МСЋ ка адипоцитима (Xiang и сар., 2011; Cho и сар., 2004). Према подацима из литературе mTOR има значајну улогу у пролиферацији и диференцијацији остеобласта, с тим што инхибиција mTOR може довести и до стимулације и инхибиције остеогенезе (Xiang и сар., 2011). Са друге стране, за диференцијацију МСЋ ка остеобластима и процес ремоделовања кости кључна је активација p38 и JAK/STAT (Rodríguez-Carballo и сар., 2016; Sanpaolo и сар., 2020). Стога, могуће је да инхибиција ових сигналних путева у ХУ-С-МСЋ утиче на диференцијациони потенцијал МСЋ.

Због своје способности диференцијације ка више ћелијских типова, МСЋ имају кључну улогу у регенерацији ткива (Visweswaran и сар., 2015). Са друге стране овај процес може бити нарушен старењем па сенесцентне МСЋ, због промена у протеинској експресији и хромозомској структури, могу показати дисфункционалност у диференцијацији. Истраживања показују нарушеност остеогене, хондрогене и миогене диференцијације током старења уз најдужу очуваност адипогеног потенцијала (Zhou и сар., 2020; Yang и сар., 2018). Наши резултати показују да ХУ-С-МСЋ имају смањену способност остеогене и адипогене диференцијације а да се притом експресија мезенхималних површинских маркера не мења. Дакле сенесценција индукована хемиотерапијом ХУ доводи до смањења мултилинијске диференцијације уз очување матичности МСЋ. Ово је у складу са резултатима других истраживача где је ХУ редуковала пролиферацију као и адипогену, хондрогену и остеогену диференцијацију МСЋ денталне пулпе (Zhai и сар., 2017). Са друге стране, третман са антимераболитима, попут 5-флуорурацила и гемцитабина није довео до смањеног диференцијационог потенцијала мада у овој студији није анализирана сенесценција КС-МСЋ (Perez и сар., 2019). С обзиром на од раније познат позитиван ефекат који антиоксиданси имају на реверзију сенесценције и поновно успостављање остеогене диференцијације (Sun и сар.,

2015), могуће је полемисати о улози ROS у смањеној диференцијацији у ХУ индукованој сенесценцији. Даља истраживања су потребни да би се утврдило улога смањене активације mTOR, MAPK и JAK/STAT као и појачане продукције ROS у инхибицији остеогене и адипогене диференцијације ХУ-С-МСТ $\bar{h}$ .

Од раније је позната способност ХУ да индукује сенесценцију више различитих ћелијских типова, укључујући ћелије ћелијских линија неуробластома, хепатоцелуларног карцинома и еритролеукемијских ћелија, али и примарних ћелија попут фибробласти и МСТ $\bar{h}$  денталне пулпе (Park и сар., 2000; Hong и сар., 2004; Yeо и сар., 2000; Zhai и сар., 2017). У овој студији је потврђено да ХУ доводи до сенесценције МСТ $\bar{h}$  порекла костне сржи и периферне крви. До сада није испитан ефекат ових сенесцентних ћелија на циркулишуће туморске ћелије као ни на ћелије у оквиру туморског микроокружења. Иако сенесценција представља стабилни застој у ћелијском циклусу, сенесцентне ћелије остају метаболички активне и комуницирају са осталим ћелијама у микроокружењу путем продукције NO, ROS, инфламаторних фактора, фактора раста као што су TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  и других молекула који су део SASP (Sawal и сар., 2017). SASP може имати протуморску или антитуморску улогу, углавном делујући посредно на активацију или инхибицију ћелија имунског система. Наша хипотеза је била да инфламаторни фактори и фактори оксидативног стреса произведени од стране сенесцентних ћелија имају паракрини утицај на туморске ћелије у окружењу, што би био ефекат сличан класичном *bystander* ефекту индукованим јонизујућим зрачењем (Prise и сар., 2009). Под термином *bystander* ефекат се подразумева одговор неозрачених ћелија на сигнале произведене од стране суседних, озрачених ћелија, а данас се описује и као реакција на ултраљубичасто зрачење, топлоту и хемиотерапијске агенсе (Bagdonas и сар., 1999). ХУ је антипролиферативни агенс који се користи у третману МПН (Singh и сар., 2016) те су за испитивање овог ефекта у експериментима су коришћене HEL и K562 као *bystander* ћелије. HEL представљају репрезентативну МПН ћелијску линију, коју чине ћелије на нивоу мегакариоцитног прогенитора и носиоци су JAK2-V617F мутације (Kobayashi и сар., 2016).

Наши резултати показују да МСТ $\bar{h}$ , претходно третиране ХУ током 3 и 6 дана ради индукције сенесценције, инхибирају пролиферацију HEL ћелија. С обзиром да су МСТ $\bar{h}$  биле претретиране ХУ, а потом гајене са HEL јасно је да овај ефекат није директна последица дејства ХУ. У покушају расветљавања медијатора који посредују у *bystander* ефекту, испитана је осетљивост HEL ћелија на оксидативни стрес и TGF- $\beta$ 1.

Оксидативни агенси примењени у овој студији су  $H_2O_2$  и ААРН-произвођач ROS који се константно разлаже на пероксил радикале ( $ROO^\cdot$ ). Тестови пролиферације су показали дозно зависно смањење пролиферације HEL ћелија након тродневног третмана овим оксидативним средствима. Такође, познато је да је TGF- $\beta$ 1 негативан регулатор мегакариоцитопоезе и има инхибиторни утицај на пролиферацију мегакариоцитних прогенитора (Kobayashi и сар., 2016). У складу да претходним студијама наши резултати су потврдили да третман TGF- $\beta$ 1 смањује пролиферацију HEL ћелија.

Додатни експерименти, према којима су котретмани инхибиторима ROS и TGF- $\beta$ 1 успели да пониште негативан ефекат ХУ-С-МСЋ на пролиферацију HEL, указују на значај улоге оксидативног стреса и TGF- $\beta$ 1 у ХУ-С-МСЋ посредованој инхибицији пролиферације HEL. У досадашњим студијама показано је да ROS имају широк спектар утицаја на пролиферацију ћелија. Иако у неким специфичним ситуацијама ROS могу стимулирати ћелијску пролиферацију (Burdon и сар., 1989), најчешће делују као цитостатични/цитотоксични агенс. Заправо већина антитуморских лекова смањује пролиферацију туморских ћелија узрокујући повећану продукцију ROS унутар ћелија (Sawal и сар., 2017; Laurent и сар., 2005). Међу врстама ROS у инхибицији пролиферације туморских ћелија значајна је улога  $H_2O_2$  и супероксидног аниона ( $O_2^{\cdot-}$ ), а њихов ефекат може бити поништен додавањем каталазе у ћелијску културу. Поред директног ефекта  $H_2O_2$  на ћелијску пролиферацију постоји и индиректни ефекат преко хидроксил радикала ( $OH^\cdot$ ) који настаје од  $H_2O_2$  Фентонијевом реакцијом и такође инхибира туморску пролиферацију (Laurent и сар., 2005). Познато је да је паклитаксел, антинеопластични лек, свој антитуморски ефекат остварује путем стимулације NADPH оксидазе (NOX) и последичног повећања продукције  $H_2O_2$ . Такође, овај лек повећава екстрацелуларну продукцију ROS и тиме инхибира пролиферацију *bystander* туморских ћелија које нису изложене директном утицају паклитаксела (Alexandre и сар., 2007; DeVeaux и сар., 2006). Наши резултати са апоцинином-неспецифичним инхибитором NADPH оксидазе (NOX) иду у прилог претпоставци да  $H_2O_2$  посредује у инхибицији пролиферације HEL ћелија од стране ХУ-С-МСЋ али би свакако додатна испитивања са антиоксидативним ензимима и селективним инхибиторима NOX била корисна ради дефинитивне потврде.

TGF- $\beta$ 1 као значајан модулатор урођеног и стеченог имунитета, према нашим резултатима појачано се продукује од стране ХУ-С-МСЋ и могући је медијатор у

смањеној пролиферације туморских HEL ћелија под утицајем ХУ-С-МСЋ. Иако нисмо детаљно проучавали механизам ове инхибиције, резултати претходних студија упућују на значај активације TGF- $\beta$ 1/SMAD3 сигналног пута у мијелоидним леукемијским ћелијама у последичном застоју ћелијског циклуса у G1 фази и заустављању пролиферације (Tu и сар., 2014; Chen и сар., 2017). Друга студија, у којој су мијелоидне леукемијске ћелије гајене са КС МСЋ у кокултури, показала је да блокада продукције TGF- $\beta$ 1 од стране МСЋ, стимулише пролиферацију леукемијских ћелија (Schelker и сар., 2018). Извесно је и да постоји одређен степен синергизма између TGF- $\beta$ 1 и ROS. Оксидативни стрес повећава генску експресију TGF- $\beta$ 1, док TGF- $\beta$ 1 у *circulus vitiosus* повећава продукцију ROS стимулишући NOX, што је ефекат посредован највећим делом путем SMAD3 (Liu и сар., 2015). У складу са овим истраживањима су и резултати добијени у оквиру ове студије по којима апоцинин смањује генску експресију и продукцију TGF- $\beta$ 1 од стране ХУ-С-МСЋ.

Сенесцентне ћелије у оквиру SASP могу да продукују и NO, као резултат појачане активности азот моноксид-синтетазе (Sato и сар., 1993). Овај фактор има потенцијално стимулативни ефекат на пролиферацију туморских ћелија (Cassetta и сар., 2018). Према нашим резултатима ХУ није у значајној мери модификовала продукцију NO од стране ПК МСЋ. Ипак наше МСЋ су иницијално испољиле висок ниво NO што се може довести у везу са њиховим значајним имunosупресивним потенцијалом (Mabrouk и сар., 2020). Такође, HEL ћелије нису показале сензитивност на растуће концентрације NO, а након третмана са NO донором DEA: Ови резултати указују да инхибиција пролиферације HEL ћелија од стране ХУ-С-МСЋ није посредована NO.

Још једна карактеристика сенесцентних ћелија је промена у структури и експресији мембранских протеина значајних за ћелијску адхезију, попут гликопротеина. Фибробластне сенесцентне ћелије показују повећану експресију глукозамина и ICAM-1, па се промене у варијантама и степену експресије ових површинских молекула могу сматрати и атрактивним маркерима сенесценције, услед могућности њихове детекције без деструкције ћелијског интегритета (Matjusaitis и сар., 2016; Schnabl и сар., 2003). Према нашим резултатима HEL ћелије су демонстрирале повећан степен адхезије за ХУ-С-МСЋ. Мада нисмо испитивали механизам адхезивности, према резултатима претходних студија вероватно је да сенесцентне МСЋ након ХУ третмана појачано еспримирају адхезивне молекуле. Као одговор на стресоре који доводе до повећања H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

повећава се експресија ICAM-1 (Roebuck и сар., 1995). ICAM-1 има значајну улогу у међућелијској адхезији, као и у ћелијској адхезији за екстрацелуларни матрикс путем интеракције са  $\beta 2$  интегринима. Овај молекул је медијатор у адхезији моноцитних ћелија за КС МСЋ (Roebuck и сар., 1999).

Супротно нашим резултатима, поједине студије су показале да сенесцентне ћелије могу и да промовишу туморогенезу. Иако се сенесценција традиционално доживљава као тумор протективни механизам, фактори продуковани од стране сенесцентних епителоидних и фиброластних ћелија у оквиру SASP, попут IL-1 и IL-6 могу да индукују туморогенезу суседних *bystander* ћелија (Corré и сар., 2010). Показано је и да су репликативно сенесцентни фибробласти имали стимулативни ефекат на пролиферацију епителоидних туморских ћелија (Krtolica и сар., 2001). Ови хетерогени резултати о ефекту сенесцентних ћелија на туморске ћелије могу се објаснити различитим типовима *bystander* туморских ћелија коришћеним у студијама, потом разноврсним ћелијским типовима у којима је индукована сенесценција, али и разликама у типу сенесценције као што је репликативна или стресом индукована сенесценција. Посматрано на тај начин, ограничавајући фактор наше студије може бити употреба ћелијске линије мијелоидних ћелија носиоца JAK2-V617F мутације за процену *bystander* ефекта. JAK2-V617F мутација представља значајан фактор за прогнозу и процену ризика за леукемијску трансформацију МПН (Jurisic и сар., 2013), а даља истраживања са другим ћелијским типовима које су носиоци ове мутације су потребна да се утврди да ли је JAK2-V617F мутација предиспонирајући фактор за сензитивност ћелија на ХУ-С-МСЋ. Додатно, спроведена је и анализа са К562 ћелијама, еритролеукемијским ћелијама хроничне мијелоидне леукемије позитивним на BCR/ABL фузиони ген. Хронична мијелоидна леукемија спада у групу мијелопролиферативних неоплазми које се карактеришу присуством Филадельфија хромозома (Mughal и сар., 2016). Према нашим резултатима ХУ-С-МСЋ нису имале утицај на пролиферацију К562 ћелија. Ови резултати се могу објаснити ниском експресијом рецептора 2 за TGF- $\beta$  од стране К562 ћелија насупрот HEL ћелијама које имају повећану експресију овог рецептора те показују већу сензитивност на TGF- $\beta 1$  (Wu и сар., 2017; Marone и сар., 2002) што је потврђено и у оквиру ове студије. Ипак, даљим истраживањима потребно је проценити да ли ХУ-С-МСЋ имају потенцијал у терапији JAK2-V617F позитивних мијелопролиферативних неоплазми.

Једна од најзначајнијих карактеристика МСЋ која их чини атрактивним кандидатом за ћелијску терапију је њихова способност имуномодулације. Пре клиничке примене често је потребна дуготрајна *in vitro* експанзија која се одражава на функционалне карактеристике ових ћелија. Стога, поједини научници пре употребе МСЋ, предлажу третман факторима попут супстанце П којима се одржава њихов имуносупресивни потенцијал кроз стимулацију продукције TGF- $\beta$ 1 (Jin и сар., 2015; Najar и сар., 2016). TGF- $\beta$ 1 је главни медијатор у регулацији имунских ћелија од стране МСЋ (Thomas и сар., 2005), а такође је у нашој студији идентификован као основни цитокин који продукују ХУ-С-МСЋ. Треба имати у виду и да имуномодулаторна природа ових ћелија зависи од инфламације и профила инфламаторних цитокина произведених од стране околних ћелија. Различити услови гајења и експанзије МСЋ, као и извори из којих се добијају, утичу на разнолико испољавање ефеката ових ћелија на имунске ћелије, који су резултат промена у SASP (Najar и сар., 2016; Wang и сар., 2014). На секрецију инфламаторних цитокина могу утицати и фактори који доводе до сенесценције попут услова гајења, онкогене активације и стресора који утичу на биолошке карактеристике МСЋ (Carasso и сар., 2015; Gaur и сар., 2017). Тако на пример стресом индукована сенесценција и репликативна сенесценција МСЋ порекла костне сржи и масног ткива, доводи до промена у секреторном профилу ових ћелија које резултирају продукцијом фактора који повећавају миграцију леукоцита ка месту повреде или инфекције (Özcan и сар., 2016).

Једна од карактеристика МСЋ која се може искористити у третману инфламаторних и аутоимунских болести је способност инхибиције пролиферације и активације CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т лимфоцита, као и МСЋ посредована промена равнотеже Th1/Th2 субпопулације у корист антиинфламаторне Th2 субпопулације (Gieseke и сар., 2010; Duffy и сар., 2011). У овој студији, пролиферација CD3/CD28 стимулираних Т лимфоцита је испитана методом CFSE дилуције а након инкубације са нетретираним и ХУ третираним МСЋ. Према резултатима ове студије, ХУ-С-МСЋ имају већи капацитет инхибиције Т лимфоцита у поређењу са нетретираним МСЋ. Једно од могућих објашњења лежи у појачаној продукцији TGF- $\beta$ 1, који је и раније идентификован као SASP фактор који супримира Т ћелијску активацију и функцију (Thomas и сар., 2005; Oh и сар., 2013). Наши резултати по којима ХУ-С-МСЋ повећано експримирају ген за TGF- $\beta$ 1 и повећано продукују овај фактор делимично могу објаснити повећани Т ћелијски инхибиторни капацитет ХУ-С-МСЋ. Мало тога се зна о механизму Т ћелијске супресије



посредством TGF- $\beta$ 1, а студије са SMAD3 дефицијентним мишевима у којима долази до активације Т лимфоцита упркос третману TGF- $\beta$ 1, наговештавају значај овог сигналног пута (McKarns и сар., 2004). Други механизми који се доводе у везу са Т ћелијском инхибицијом од стране МСТћ су појачана продукција ROS и NO (Xu и сар., 2013; Nelson и сар., 2018). Резултати упућују да у ХУ-С-МСТћ не долази до повећане продукције NO, али је повећана производња ROS. Додатна истарживања која укључују инхибиторе ROS су неопходна да би се утврдила улога ROS у ХУ-С-МСТћ посредованој инхибицији Т лимфоцита. Надаље, супримирањем mTOR сигналног пута повећава се инхибиторни утицај КС МСТћ, што су демонстрирале претходне студије са рапамицином (Girdlestone и сар., 2015). ХУ доводи до смањене активације mTOR сигналног пута у МСТћ, па је стога могуће размотрити улогу овог сигналног пута у побољшаној имуномодулацији од стране ХУ-С-МСТћ што је потребно потврдити додатним експериментима који укључују рапалоге.

МСТћ модулирају имунски одговор и преко индукције имунорегулаторних ћелија. Гранулоцитне и моноцитне МСућ су хетерогена популација мијелоидних прекурсорских ћелија са имуносупресорним карактеристикама чија експанзија може бити подржана од стране МСТћ (Cheung и сар., 2018; Lee и сар 2020). Са старењем долази до повећане инфламације и амплификације сенесцентних ћелија које могу бити подршка за стварање МСућ (Xu и сар., 2015). Скорашња истраживања упућују на закључак да мишије стромалне сенесцентне ћелије у оквиру SASP стварају IL-6 који стимулише експанзију МСућ успостављајући имуносупресивно окружење које стимулише туморогенезу (Ruhland и сар., 2016). С обзиром да је ХУ агенс који се користи у терапији мијелопролиферативних неоплазми у којима постоји дисрегулација имунских ћелија које укључују и моноците/макрофаге и МСућ (Barosi и сар., 2014), истраживали смо утицај ХУ-С-МСТћ на индукцију М-МСућ. Наши експерименти нису показали статистички значајну разлику у броју МСућ индукованих од стране ХУ третираних и нетретираних ћелија, сугеришући да њихов капацитет подршке ћелијама мијелоидне лозе није нарушен третманом ХУ. Занимљиво је да способност МСТћ да подрже МСућ доводи до стабилизације анти-инфламаторног окружења, које у зависности од типа болести може смањити ефективност третмана као што је у случају терапије канцера, док у случају аутоимунских болести може имати терапијски бенефит (Consonni и сар., 2019).

По скорашњим сазнањима један од главних фактора који доприноси органској фибрози су миофибробласти порекла периваскуларних МСТћ и МСТћ костне сржи (El

Agha и сар., 2017). Миофибробласти су  $\alpha$ SMA позитивни фибробласти који се акумулирају у префибротичним стањима и путем ексцесивне продукције компоненти екстрацелуларног матрикса, попут ретикулинских и колагених влакана, дају свој допринос фибротичним поремећајима као што су мијелофиброза, плућна фиброза, интерстиционална срчана фиброза или фиброза јетре (El Agha и сар., 2017; Hoyles и сар., 2011; Kanzler и сар., 1999; Kim и сар., 2006). У бројним *in vitro* и *in vivo* студијама као главни регулатор трансформације МСЋ у миофибробласте идентификован је TGF- $\beta$ 1 (Hoyles и сар., 2011; Kanzler и сар., 1999) што је потврђено и истраживањем у оквиру ове дисертације. Након третмана КС МСЋ са TGF- $\beta$ 1, региструје се дозно зависно повећање броја  $\alpha$ SMA позитивних ћелија уз повећање активације SMAD3 сигналног пута у КС МСЋ. Главни медијатор активности TGF- $\beta$ 1 је SMAD3 чијом активацијом долази до повећане експресије гена за колаген и друге протеине екстрацелуларног матрикса (Wynn и сар., 2007). Агенси који циљано делују на блокаду TGF- $\beta$ 1/SMAD3 су предмет истраживања бројних студија који се баве третманом фибротичних болести (Flanders и сар., 2004).

Познато је да број сенесцентних ћелија у организму расте са старењем организма доприносећи настанку хроничних обољења попут фибротичних болести. Проблем настаје у неадекватном уклањању сенесцентних ћелија од стране имунског система, због ослабљеног имунолошког надзора са старењем и такозване имуносенесценције (Blokland и сар., 2020; Ventura и сар., 2017). Један од механизма којим сенесцентне ћелије доприносе фибрози може бити путем продукције TGF- $\beta$ 1 у оквиру SASP којим се индукује миофибробластна трансформација суседних ћелија (Acosta и сар., 2013). Са друге стране скорашње студије су показале да индукција сенесценције миофибробласта ограничава миокардну фиброзу, цирозу јетре и плућну фиброзу (Meng и сар., 2020). Тако на пример након инфаркта миокарда долази до активације миофибробласта, који продукцијом екстрацелуларног матрикса одржавају нормалну архитектуру срца, а њихова пролонгирана активација доводи до настанка ожиљног ткива. Истраживања показују да се индукцијом сенесценције у миофибробластима путем CCN1 активације смањује периваскуларну фиброзу и стварање фиброзног ткива (Haigney и сар., 2004). Такође, код p16<sup>INK4a</sup>-нокаут мишева долази до појачане миофибробластне активације и депозиције матрикса која води ка бубрежној фибрози, што сугерише на значајну улогу p16<sup>INK4a</sup> активације (Wolstein и сар., 2010) која је и значајан фактор у ХУ индукованој сенесценцији МСЋ. Имајући у виду да је фиброза костне сржи једна од главних

карактеристика мијелопролиферативних неоплазми за које се у третману користи ХУ, занимало нас је да ли сенесценција МСЋ узрокована овим агенсом има утицај на испољеност фибротичног фенотипа. Према нашем моделу сенесценције, ХУ-С-МСЋ показују смањену сензитивност на TGF- $\beta$ 1 посредовану трансформацију МСЋ у  $\alpha$ SMA позитивне миофибробласте. Пратећи ове резултате надаље смо испитивали активацију TGF- $\beta$ 1/SMAD3 у ХУ-С-МСЋ. Према нашим резултатима ХУ-С-МСЋ показују смањену осетљивост на TGF- $\beta$ 1 услед смањене експресије рецептора 1 и 2 за TGF- $\beta$ 1 и смањене активације SMAD3 сигналног пута. С обзиром да је од раније познато и да сам TGF- $\beta$ 1 индукује сенесценцију КС МСЋ путем повећане продукције ROS у МСЋ (Wu и сар., 2014) на основу наших резултата може се претпоставити да TGF- $\beta$ 1 није допринео сенесценцији, иако у оквиру ове студије није испитиван адитивни утицај ХУ и TGF- $\beta$ 1 на индукцију сенесценције.

Контроверзни резултати у овој области се могу објаснити различитим моделима сенесценције, првенствено у разликама између сенесценције проузроковане старењем и стресом индуковане сенесценције. С обзиром на резултате по којима сенесценција спречава формирање фибробласта доприносећи антифибрози, у даљем току је кључна активација имунског система ради уклањања ових ћелија пре испољености SASP који има дугорочни потенцијал да испољи проинфламаторно окружење које не иде у прилог фибрози. Један од потенцијалних механизма који је потребно истражити у терапији мијелофиброзе би била употреба сенолитика након третмана ХУ ради уклањања сенесцентних ћелија.

У закључку, за истраживања у оквиру ове дисертације успешно су изоловане и окарактерисане хумане мезенхималне стромалне ћелије из периферне крви и костне сржи. ХУ као индуктор ДНК репликативног стреса доводи до застоја МСЋ у S фази ћелијског циклуса и последичне сенесценције механизмом који укључује повећану унутарћелијску продукцију ROS. Сенесценција МСЋ узрокована хемотерапијом ХУ не мења имунофенотип ових ћелија али је праћена поремећајем у њиховој диференцијацији највероватније путем смањене активације mTOR, MAPK и JAK/STAT3 сигналних путева. Поред директног цитостатског ефекта ХУ на малигне ћелије (Young и сар., 1967), ова дисертација пружа увид у још један индиректни антитуморски механизам а то је инхибиција пролиферације *bystander* HEL ћелија посредована ХУ индукованим сенесцентним МСЋ. Овај *bystander* механизам је посредован TGF- $\beta$ 1 и ROS а даља

истраживања су потребна да би се утврдило да ли је предиспонирајући фактор за осетљивост на ХУ-С-МСЋ, мутација у V617F егзону JAK2 гена коју носе HEL ћелије. Поред антитуморског, ХУ-С-МСЋ су демонстрирале и повећан имуносупресивни капацитет смањујући пролиферацију Т лимфоцита, што се може објаснити продукцијом TGF- $\beta$ 1 и инхибицијом mTOR. Додатно, ХУ-С-МСЋ представљају и потенцијалну стратегију у смањењу испољености профибротичног фенотипа путем инхибиције TGF- $\beta$ 1/SMAD3 посредоване трансформације МСЋ у  $\alpha$ SMA позитивне фибробласти. Добијени подаци пружају увид у хемиотерапијом индуковане измене у функционалности МСЋ и последичном ефекту на ћелије у њиховој околини, које би требало имати на уму за разумевање споредних ефеката терапије ХУ. С обзиром да се МПН карактеришу присуством JAK2 мутације и различитим степеном фиброзе костне сржи, ХУ-С-МСЋ би могле имати потенцијалну примену у терапији ових малигнитета. Третман ХУ потенцира имуносупресивне способности МСЋ што је особина која би могла бити од користи у терапији обољења која су у вези са хроничном инфламацијом, попут бројних малигних болести. Увид у клиничку релевантност ових резултата би био могућ тек након додатних испитивања којима би се детаљније утврдио утицај ХУ-С-МСЋ на поједине компартменте имунског система и потврдила њихова антифибротична улога уз потпуно разумевање и нежењених ефеката оваквог третмана.

Поред увида у детаљни механизам деловања ХУ на МСЋ првенствено на индукцију сенесценције, ова истраживања отварају и потенцијални пут за примену ових ћелија у терапији хематолошких малигнитета, аутоимунских и профибротичних стања али тек након потпуног разумевања механизма њихове функције у различитим окружењима.

## 6. ЗАКЉУЧЦИ

У складу са постављеним циљевима, а према добијеним резултатима ове докторске дисертације изведени су следећи закључци:

1. МСЋ су успешно изоловане из периферне крви и костне сржи здравих даваоца, а њихова мезенхимална природа је доказана на основу типичне морфологије и адхерентности за пластику, способности диференцијације у остеобласти и адипоците и експресије CD44, CD90 и CD73 мезенхималних маркера.
2. Испитивањем ефекта ХУ на генерисање прекида дволанчане ДНК показано је да је ефекат ХУ на МСЋ генотоксичан, док је испитивањем вијабилност МСЋ закључено да је ХУ имала цитостатски ефекат на МСЋ.
3. ХУ је инхибирала пролиферацију МСЋ путем застоја у *S* фази ћелијског циклуса а да при том није узроковала статистички значајно повећање броја апоптотичних ћелија.
4. На основу испољености карактеристичне морфологије, појачане активности  $\beta$ -галактозидазе и експресије сенесцентних маркера, показано је да је ХУ довела до сенесценције МСЋ доминантно путем активације протективног сигналног пута p16<sup>INK4</sup>/Rb.
5. Сенесценција МСЋ узоквана ХУ је праћена смањењем диференцијационог потенцијала ка остеобластима и адипоцитима, уз очуваност експресије маркера мезенхималних стромалних ћелија.
6. Застој МСЋ у ћелијском циклусу и последична сенесценција МСЋ под утицајем ХУ се одвија путем повећања унутарћелијске продукције ROS.
7. Сенесцентне МСЋ повећано продукују ROS и TGF- $\beta$ 1 у односу на нетретиране МСЋ. Ови фактори смањују пролиферацију малигних HEL ћелија доводећи до застоја у G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> фази ћелијског циклуса. Истовремено сенесцентне МСЋ нису имале утицај на пролиферацију малигних K562 ћелија, што се може објаснити недостатком рецептора за TGF- $\beta$ 1 код ових ћелија у поређењу са HEL ћелијама које експримирају овај рецептор. Ниво продукције NO није промењен након третмана МСЋ ХУ те се NO не може

сматрати одговорним фактором за смањену пролиферацију малигнух ћелија под утицајем ХУ-С-МСЋ

8. Имуномодулаторни ефекат ХУ на МСЋ се огледа у потенцирању инхибиције пролиферације Т ћелија под утицајем МСЋ, док овај третман није утицао на потенцијал МСЋ да експандирају укупне и моноцитне МСуЋ.
9. ХУ-С-МСЋ показују и смањену активацију mTOR, MAPK и JAK/STAT сигналних путева којима се може објаснити смањење диференцијационог потенцијала и повећање имуномодулаторног капацитета третираних МСЋ
10. ХУ третиране МСЋ су испољиле смањену осетљивост на профибротични ефекат TGF- $\beta$ 1 који се огледа у индукцији  $\alpha$ SMA позитивних миофибробласта, услед смањене експресије рецептора за TGF $\beta$ 1 и смањене активације TGF $\beta$ /SMAD сигналног пута у поређењу са нетретираним ћелијама

## 7. ЛІТЕРАТУРА

Acosta JC, Banito A, Wuestefeld T, Georgilis A, Janich P, Morton JP, Athineos D, Kang TW, Lasitschka F, Andrulis M, Pascual G. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nature cell biology*. 2013 Aug;15(8):978-90.

Afify SM, Calle AS, Hassan G, Kumon K, Nawara HM, Zahra MH, Mansour HM, Khayrani AC, Alam MJ, Du J, Seno A. A novel model of liver cancer stem cells developed from induced pluripotent stem cells. *British Journal of Cancer*. 2020 Mar 17:1-3.

Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005 Feb 15;105(4):1815-22.

Ahmed, A. S. I., Sheng, M. H., Wasnik, S., Baylink, D. J., i Lau, K.-H. W. (2017). Effect of aging on stem cells. *World Journal of Experimental Medicine*, 7(1), 1–10

Alexandre J, Hu Y, Lu W, Pelicano H, Huang P. Novel action of paclitaxel against cancer cells: bystander effect mediated by reactive oxygen species. *Cancer research*. 2007 Apr 15;67(8):3512-7.

Alfarano C, Roubex C, Chaaya R, Ceccaldi C, Calise D, Mias C, Cussac D, Bascands JL, Parini A. Intraparenchymal injection of bone marrow mesenchymal stem cells reduces kidney fibrosis after ischemia-reperfusion in cyclosporine-immunosuppressed rats. *Cell transplantation*. 2012 Sep;21(9):2009-19.

Alimbetov D, Davis T, Brook AJ, Cox LS, Faragher RG, Nurgozhin T, Zhumadilov Z, Kipling D. Suppression of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in human fibroblasts using small molecule inhibitors of p38 MAP kinase and MK2. *Biogerontology*. 2016 Apr 1;17(2):305-15.

Altenhöfer S, Radermacher KA, Kleikers PW, Wingler K, Schmidt HH. Evolution of NADPH oxidase inhibitors: selectivity and mechanisms for target engagement. *Antioxidants & redox signaling*. 2015 Aug 10;23(5):406-27.

Alvino GM, Collingwood D, Murphy JM, Delrow J, Brewer BJ, Raghuraman MK. Replication in hydroxyurea: it's a matter of time. *Molecular and cellular biology*. 2007 Sep 15;27(18):6396-406.

Anerillas C, Abdelmohsen K, Gorospe M. Regulation of senescence traits by MAPKs. *Geroscience*. 2020 Apr;42(2):397-408.

Antonioli E, Torres N, Ferretti M, Piccinato CD, Sertie AL. Individual response to mTOR inhibition in delaying replicative senescence of mesenchymal stromal cells. *PLoS One*. 2019 Jan 31;14(1):e0204784.

Asur RS, Thomas RA, Tucker JD. Chemical induction of the bystander effect in normal human lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 2009;676(1-2):11-6.

Atala A, Lanza R, Mikos T, Nerem R, editors. *Principles of regenerative medicine*. Academic press; 2018 Aug 9.

Bagdonas S, Dahle J, Kaalhus O, Moan J. Cooperative inactivation of cells in microcolonies treated with UVA radiation. *Radiation research*. 1999 Aug 1;152(2):174-9.

Bahl A, Kumar M, Sharma DN, Basu KJ, Jaura MS, Rath GK, Julka PK. Reirradiation for progressive brain metastases. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2009 Jul 1;5(3):161.

Bai L, Lennon DP, Eaton V, Maier K, Caplan AI, Miller SD, Miller RH. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce Th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia*. 2009 Aug 15;57(11):1192-203.

Bandi S, Tchaikovskaya T, Gupta S. Hepatic differentiation of human pluripotent stem cells by developmental stage-related metabolomics products. *Differentiation*. 2019 Jan 1;105:54-70.

Barcellos-Hoff MH, Dix TA. Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta1. *Molecular endocrinology*. 1996 Sep 1;10(9):1077-83.

Barosi G. An immune dysregulation in MPN. *Current hematologic malignancy reports*. 2014 Dec 1;9(4):331-9.

Berebichez-Fridman R, Gómez-García R, Granados-Montiel J, Berebichez-Fastlicht E, Olivos-Meza A, Granados J, Velasquillo C, Ibarra C. The holy grail of orthopedic surgery: mesenchymal stem cells—their current uses and potential applications. *Stem Cells International*. 2017 Jun 18;2017.



Bhat S, Viswanathan P, Chandanala S, Prasanna SJ, Seetharam RN. Expansion and characterization of bone marrow derived human mesenchymal stromal cells in serum-free conditions. *Scientific Reports*. 2021 Feb 9;11(1):1-8.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem cells*. 2001 May;19(3):180-92.

Blagosklonny MV. From rapalogs to anti-aging formula. *Oncotarget*. 2017 May 30;8(22):35492.

Blagosklonny MV. Rapamycin, proliferation and geroconversion to senescence. *Cell Cycle*. 2018 Dec 17;17(24):2655-65.

Blokland KE, Pouwels SD, Schuliga M, Knight DA, Burgess JK. Regulation of cellular senescence by extracellular matrix during chronic fibrotic diseases. *Clinical Science*. 2020 Oct;134(20):2681-706.

Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology*. 2001 Oct;2(10):907-16.

Bogdanović G, Jurišić V, Kraguljac N, Mrdjanović J, Jakimov D, Krtolica K, Krajnović M, Magić Z, Stojiljković B, Andrijević L, Srdić T. Characteristics of novel myeloid precursor cell line, PC-MDS, established from a bone marrow of the patient with therapy-related myelodysplastic syndrome. *Leukemia research*. 2007 Aug 1;31(8):1097-105.

Bogdanović G, Jakimov D, Stojiljkovic B, Jurišić V. The cell growth, morphology and immunocytochemistry of novel cell line established from a bone marrow of the patient with therapy-related myelodysplastic syndrome, entitled PC-MDS. *Medical Oncology*. 2007 Dec;24(4):419-24.

Borel F, Lacroix FB, Margolis RL. Prolonged arrest of mammalian cells at the G1/S boundary results in permanent S phase stasis. *Journal of Cell Science*. 2002 Jul 15;115(14):2829-38.

Borodkina A, Shatrova A, Abushik P, Nikolsky N, Burova E. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. *Aging (Albany NY)*. 2014 Jun;6(6):481.

Brandl A, Meyer M, Bechmann V, Nerlich M, Angele P. Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells. *Experimental cell research*. 2011 Jul 1;317(11):1541-7.

Bremer S, Hartung T. The use of embryonic stem cells for regulatory developmental toxicity testing *in vitro*—the current status of test development. *Curr Pharm Des.* 2004;10:2733–2747.

Burdon RH, Gill V, Rice-Evans C. Cell proliferation and oxidative stress. *Free radical research communications.* 1989 Jan 1;7(3-6):149-59.

Burdon T, Smith A, Savatier P. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *Trends Cell Biol.* 2002.12: 432–38.

Burova E, Borodkina A, Shatrova A, Nikolsky N. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. *Oxidative medicine and cellular longevity.* 2013 Aug 25;2013.

Caglayan S, Ahrens TD, Cieślak-Pobuda A, Staerk J. Modern Ways of Obtaining Stem Cells. *InStem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine* 2019 Jan 1 (pp. 17-36). Academic Press.

Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell.* 2005 Feb 25;120(4):513-22.

Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell.* 2005 Feb 25;120(4):513-22.

Cao Y, Ji C, Lu L. Mesenchymal stem cell therapy for liver fibrosis/cirrhosis. *Annals of translational medicine.* 2020 Apr;8(8).

Capasso, S., Alessio, N., Squillaro, T., Di Bernardo, G., Melone, M.A., Cipollaro, M., Peluso, G. and Galderisi, U., 2015. Changes in autophagy, proteasome activity and metabolism to determine a specific signature for acute and chronic senescent mesenchymal stromal cells. *Oncotarget*, 6(37), p.39457.

Capella P, Moll J. Assessment of cell cycle inhibitors by flow cytometry. *Drug Discovery and Development—Present and Future.* 2011 Dec 16;13:323-38.

Cassetta L, Pollard JW. Targeting macrophages: therapeutic approaches in cancer. *Nature reviews Drug discovery.* 2018 Dec;17(12):887-904.

Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic acids research.* 2002 May 15;30(10):e47-.

Chapel A, Francois S, Douay L, Benderitter M, Voswinkel J. New insights for pelvic radiation disease treatment: multipotent stromal cell is a promise mainstay treatment for the restoration of abdominopelvic severe chronic damages induced by radiotherapy. *World journal of stem cells*. 2013 Oct 26;5(4):106.

Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Molecular cell*. 2012 Aug 24;47(4):497-510.

Chapman T, Kinsella TJ. Ribonucleotide reductase inhibitors: a new look at an old target for radiosensitization. *Frontiers in oncology*. 2012 Jan 4;1:56.

Chapman T, Kinsella TJ. Ribonucleotide reductase inhibitors: a new look at an old target for radiosensitization. *Frontiers in oncology*. 2012 Jan 4;1:56.

Chapman T, Kinsella TJ. Ribonucleotide reductase inhibitors: a new look at an old target for radiosensitization. *Frontiers in oncology*. 2012 Jan 4;1:56.

Chen J, Mu Q, Li X, Yin X, Yu M, Jin J, Li C, Zhou Y, Zhou J, Suo S, Lu D. Homoharringtonine targets Smad3 and TGF- $\beta$  pathway to inhibit the proliferation of acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*. 2017 Jun 20;8(25):40318.

Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PloS one*. 2008 Apr 2;3(4):e1886.

Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, Zhang JJ, Chunhua RZ, Liao LM, Lin S, Sun JP. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology*. 2004 Jul 1;94(1):92-5.

Cheng HY, Ghetu N, Wallace CG, Wei FC, Liao SK. The impact of mesenchymal stem cell source on proliferation, differentiation, immunomodulation and therapeutic efficacy. *J Stem Cell Res Ther*. 2014;4(10):1-8.

Cheung TS, Dazzi F. Mesenchymal-myeloid interaction in the regulation of immunity. *In Seminars in immunology* 2018 Feb 1 (Vol. 35, pp. 59-68). Academic Press.

Chien Y, Scuoppo C, Wang X, Fang X, Balgley B, Bolden JE, Premssirut P, Luo W, Chicas A, Lee CS, Kogan SC. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- $\kappa$ B

promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes & development*. 2011 Oct 15;25(20):2125-36.

Childs BG, Durik M, Baker DJ, Van Deursen JM. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature medicine*. 2015 Dec;21(12):1424-35.

Cho HJ, Park J, Lee HW, Lee YS, Kim JB. Regulation of adipocyte differentiation and insulin action with rapamycin. *Biochemical and biophysical research communications*. 2004 Sep 3;321(4):942-8.

Choi CW, Bang SM, Jang S, Jung CW, Kim HJ, Kim HY, Kim SJ, Kim YK, Park J, Won JH. Guidelines for the management of myeloproliferative neoplasms. *The Korean journal of internal medicine*. 2015 Nov;30(6):771.

Choi CW, Bang SM, Jang S, Jung CW, Kim HJ, Kim HY, Kim SJ, Kim YK, Park J, Won JH. Guidelines for the management of myeloproliferative neoplasms. *The Korean journal of internal medicine*. 2015 Nov;30(6):771.

Chondrogianni N, Gonos ES. Proteasome inhibition induces a senescence-like phenotype in primary human fibroblasts cultures. *Biogerontology*.2004; 5, 55–61.

Cochrane AL, Kett MM, Samuel CS, Campanale NV, Anderson WP, Hume DA, Little MH, Bertram JF, Ricardo SD. Renal structural and functional repair in a mouse model of reversal of ureteral obstruction. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2005 Dec 1;16(12):3623-30.

Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Njoroge JM, Miller JL, Gladwin MT, Schechter AN. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide–dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Jan 15;111(2):231-9.

Cokic VP, Smith RD, Beleslin-Cokic BB, Njoroge JM, Miller JL, Gladwin MT, Schechter AN. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide–dependent activation of soluble guanylyl cyclase. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Jan 15;111(2):231-9.

Condic ML. Totipotency: what it is and what it is not. *Stem Cells Dev* 2014; 23:796–812.

Consonni FM, Porta C, Marino A, Pandolfo C, Mola S, Bleva A, Sica A. Myeloid-derived suppressor cells: ductile targets in disease. *Frontiers in immunology*. 2019 May 3;10:949.

Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2010 Feb 28;5:99-118.

Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun YU, Muñoz DP, Goldstein J, Nelson PS, Desprez PY, Campisi J. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol*. 2008 Dec 2;6(12):e301.

Coppé JP, Rodier F, Patil CK, Freund A, Desprez PY, Campisi J. Tumor suppressor and aging biomarker p16INK4a induces cellular senescence without the associated inflammatory secretory phenotype. *Journal of Biological Chemistry*. 2011 Oct 21;286(42):36396-403.

Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):367-72.

Cousin B, Ravet E, Poglio S, De Toni F, Bertuzzi M, Lulka H, Touil I, André M, Grolleau JL, Péron JM, Chavoïn JP. Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *PloS one*. 2009 Jul 17;4(7):e6278.

da Silva PF, Schumacher B. DNA damage responses in ageing. *Open biology*. 2019 Nov 29;9(11):190168.

Dabiri S, Derakhshani A, Vahidi R, Farsinejad A. Peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: Growth factor-free isolation, molecular characterization and differentiation. *Iranian journal of pathology*. 2018;13(4):461.

Damdimopoulou, P., Rodin, S., Stenfelt, S., Antonsson, L., Tryggvason, K., & Hovatta, O. (2016). Human embryonic stem cells. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 31, 2–12. doi:10.1016/j.bpobgyn.2015.08.010

Debacq-Chainiaux F, Boilan E, Le Moutier JD, Weemaels G, Toussaint O. P38 MAPK in the senescence of human and murine fibroblasts. *Protein Metabolism and Homeostasis in Aging*. 2010:126-37.

DeVeaux LC, Durtschi LS, Case JG, Wells DP. Bystander effects in unicellular organisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2006 May 11;597(1-2):78-86.

Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3838-43.

Dodig S, Čepelak I, Pavić I. Hallmarks of senescence and aging. *Biochemia medica*. 2019 Oct 15;29(3):483-97.

Dodig S, Čepelak I, Pavić I. Hallmarks of senescence and aging. *Biochemia medica*. 2019 Oct 15;29(3):483-97.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular. Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315–7.

Dong CM, Wang XL, Wang GM, Zhang WJ, Zhu L, Gao S, Yang DJ, Qin Y, Liang QJ, Chen YL, Deng HT. A stress-induced cellular aging model with postnatal neural stem cells. *Cell death & disease*. 2014 Mar;5(3):e11116-e1116.

Dong LH, Jiang YY, Liu YJ, Cui S, Xia CC, Qu C, Jiang X, Qu YQ, Chang PY, Liu F. The anti-fibrotic effects of mesenchymal stem cells on irradiated lungs via stimulating endogenous secretion of HGF and PGE2. *Scientific reports*. 2015 Mar 4;5(1):1-0.

Dresler WF, Stein R. Ueber den hydroxylharnstoff. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. 1869;150(2):242-52.

Dresler WF, Stein R. Ueber den hydroxylharnstoff. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. 1869;150(2):242-52.

DrugBank online [Internet]. Hydroxyurea; [cited 2021 Mar. 3]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01005>

DrugBank online [Internet]. Hydroxyurea; [cited 2021 Mar. 3]. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01005>

Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem cell research & therapy*. 2011 Aug;2(4):1-9.

Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem cell research & therapy*. 2011 Aug;2(4):1-9.

Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. *New England Journal of Medicine*. 1986 Dec 25;315(26):1650-9.

Eckert MA, Orozco C, Xiao J, Javellana M, Lengyel E. The effects of chemotherapeutics on the ovarian cancer microenvironment. *Cancers*. 2021 Jan;13(13):3136.

Effros RB. Replicative senescence of CD8 T cells: effect on human ageing. *Experimental gerontology*. 2004 Apr 1;39(4):517-24.

Ehrhart EJ, Segarini P, Tsang ML, Carroll AG, Barcellos-Hoff MH. Latent transforming growth factor  $\beta$ 1 activation in situ: quantitative and functional evidence after low-dose  $\gamma$ -irradiation 1. *The FASEB Journal*. 1997 Oct;11(12):991-1002.

El Agha E, Kramann R, Schneider RK, Li X, Seeger W, Humphreys BD, Bellusci S. Mesenchymal stem cells in fibrotic disease. *Cell stem cell*. 2017 Aug 3;21(2):166-77.

Engela AU, Hoogduijn MJ, Boer K, Litjens NH, Betjes MG, Weimar W, Baan CC. Human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells induce functional de-novo regulatory T cells with methylated FOXP3 gene DNA. *Clinical & Experimental Immunology*. 2013 Aug;173(2):343-54.

Ewald JA, Desotelle JA, Wilding G, Jarrard DF. Therapy-induced senescence in cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2010 Oct 20;102(20):1536-46.

Finn RS, Crown JP, Lang I, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet Oncol* 2015;16: 25–35.

Flanagan JM, Howard TA, Mortier N, Avlasevich SL, Smeltzer MP, Wu S, Dertinger SD, Ware RE. Assessment of genotoxicity associated with hydroxyurea therapy in children with sickle cell anemia. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2010 Apr 30;698(1-2):38-42.

Flanders K, Sato M, Ooshima A, Russo A, Roberts A. Smad-3 as a mediator of the fibrotic response. *International journal of experimental pathology*. 2004 Feb;85(1):A13.

Fleck C, Appenroth D, Jonas P, Koch M, Kundt G, Nizze H, Stein G. Suitability of 5/6 nephrectomy (5/6NX) for the induction of interstitial renal fibrosis in rats—influence of sex,

strain, and surgical procedure. *Experimental and Toxicologic pathology*. 2006 Jan 20;57(3):195-205.

Franckhauser S, Elias I, Sopasakis VR, Ferre T, Nagaev I, Andersson CX, Agudo J, Ruberte J, Bosch F, Smith U. Overexpression of Il6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. *Diabetologia*. 2008 Jul;51(7):1306-16.

Francois S, Mouiseddine M, Allenet-Lepage B, Voswinkel J, Douay L, Benderitter M, Chapel A. Human mesenchymal stem cells provide protection against radiation-induced liver injury by antioxidative process, vasculature protection, hepatocyte differentiation, and trophic effects. *BioMed research international*. 2013 Jan 1;2013.

Franquesa M, Mensah FK, Huizinga R, Strini T, Boon L, Lombardo E, DelaRosa O, Laman JD, Grinyó JM, Weimar W, Betjes MG. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. *Stem cells*. 2015 Mar;33(3):880-91.

Fredriksson Å, Nyström T. Conditional and replicative senescence in *Escherichia coli*. *Current opinion in microbiology*. 2006 Dec 1;9(6):612-8.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*. 1976 Sep;4(5):267-74.

Friedman SL, Sheppard D, Duffield JS, Violette S. Therapy for fibrotic diseases: nearing the starting line. *Science translational medicine*. 2013 Jan 9;5(167):167sr1.

Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*. 2004 Mar 19;116(6):769-78.

Fuchsa E, Chen T. A matter of life and death: self-renewal in stem cells 2013; 14(1): 39–48.

Galland S, Stamenkovic I. Mesenchymal stromal cells in cancer: a review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *The Journal of pathology*. 2020 Apr;250(5):555-72.

Gao F, Chiu SM, Motan DA, Zhang Z, Chen L, Ji HL, Tse HF, Fu QL, Lian Q. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell death & disease*. 2016 Jan;7(1):e2062- e2062.



Gaur M, Wang L, Amaro-Ortiz A, Dobke M, King Jordan I, Lunyak VV. Acute genotoxic stress-induced senescence in human mesenchymal cells drives a unique composition of senescence messaging secretome (SMS). *J. Stem Cell Res. Ther.* 2017;7(396):10-4172.

Gieseke F, Böhringer J, Bussolari R, Dominici M, Handgretinger R, Müller I. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology.* 2010 Nov 11;116(19):3770-9.

Girdlestone J, Pido-Lopez J, Srivastava S, Chai J, Leaver N, Galleu A, Lombardi G, Navarrete CV. Enhancement of the immunoregulatory potency of mesenchymal stromal cells by treatment with immunosuppressive drugs. *Cytotherapy.* 2015 Sep 1;17(9):1188-99.

Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* 2005 Apr 1;105(7):2821-7.

Golchin A, Chatziparasidou A, Ranjbarvan P, Niknam Z, Ardeshirylajimi A. Embryonic Stem Cells in Clinical Trials: Current Overview of Developments and Challenges. 2020; pp 1-19

Golpanian S, Wolf A, Hatzistergos KE, Hare JM. Rebuilding the damaged heart: mesenchymal stem cells, cell-based therapy, and engineered heart tissue. *Physiological reviews.* 2016 Jul;96(3):1127-68.

Gorgoulis V, Adams PD, Alimonti A, Bennett DC, Bischof O, Bishop C, Campisi J, Collado M, Evangelou K, Ferbeyre G, Gil J. Cellular senescence: defining a path forward. *Cell.* 2019 Oct 31;179(4):813-27.

Griffin M, Iqbal SA, Bayat A. Exploring the application of mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration. *The Journal of bone and joint surgery. British volume.* 2011 Apr;93(4):427-34.

Gronthos S, Fitter S, Diamond P, Simmons PJ, Itescu S, Zannettino AC. A novel monoclonal antibody (STRO-3) identifies an isoform of tissue nonspecific alkaline phosphatase expressed by multipotent bone marrow stromal stem cells. *Stem cells and development.* 2007 Dec 1;16(6):953-64.

Gutierrez-Aranda, I., Ramos-Mejia, V., Bueno, C., Munoz-Lopez, M., Real, P. J., Mácia, A., Sanchez, L. Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster

than human embryonic stem cells regardless the site of injection. *Stem Cells* 2010; 28(9), 1568–1570.

Haigney MC, Zareba W, Gentlesk PJ, Goldstein RE, Illovsky M, McNitt S, Andrews ML, Moss AJ, MADIT II Investigators. QT interval variability and spontaneous ventricular tachycardia or fibrillation in the Multicenter Automatic Defibrillator Implantation Trial (MADIT) II patients. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004 Oct 6;44(7):1481-7.

Hanft VN, Fruchtman SR, Pickens CV, Rosse WF, Howard TA, Ware RE. Acquired DNA mutations associated with in vivo hydroxyurea exposure. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2000 Jun 1;95(11):3589-93.

Haspel RL, Miller KB. Hematopoietic stem cells: source matters. *Current stem cell research & therapy*. 2008 Dec 1;3(4):229-36.

Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*. 2011 Dec 1;9(1):12.

Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacology & therapeutics*. 2004 Aug 1;103(2):147-66.

Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 1992 Jan 1;13(1):81-8.

He N, Zhang L, Cui J, Li Z. Bone marrow vascular niche: home for hematopoietic stem cells. *Bone marrow research*. 2014;2014.

Heng BC, Cowan CM, Basu S. Comparison of enzymatic and non-enzymatic means of dissociating adherent monolayers of mesenchymal stem cells. *Biological procedures online*. 2009 Dec;11(1):161-9.

Heo SH, Cha Y, Park KS. Hydroxyurea induces a hypersensitive apoptotic response in mouse embryonic stem cells through p38-dependent acetylation of p53. *Stem cells and development*. 2014 Oct 15;23(20):2435-42.

Hernández R, Jiménez-Luna C, Perales-Adán J, Perazzoli G, Melguizo C, Prados J. Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells towards Neuronal Lineage: Clinical Trials in Nervous System Disorders. *Biomolecules & therapeutics*. 2020 Jan;28(1):34.

Hernandez-Segura A, Brandenburg S, Demaria M. Induction and Validation of Cellular Senescence in Primary Human Cells. *J Vis Exp* 2018; 20;(136).

Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*. 2003 Nov 15;102(10):3483-93.

Hildebrand D, Lehle S, Borst A, Haferkamp S, Essmann F, Schulze-Osthoff K.  $\alpha$ -Fucosidase as a novel convenient biomarker for cellular senescence. *Cell Cycle*. 2013 Jun 15;12(12):1922-7.

Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Prunotto M, Desmoulière A, Varga J, De Wever O, Mareel M, Gabbiani G. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *The American journal of pathology*. 2012 Apr 1;180(4):1340-55.

Ho JH, Tseng TC, Ma WH, Ong WK, Chen YF, Chen MH, Lin MW, Hong CY, Lee OK. Multiple intravenous transplantations of mesenchymal stem cells effectively restore long-term blood glucose homeostasis by hepatic engraftment and  $\beta$ -cell differentiation in streptozocin-induced diabetic mice. *Cell transplantation*. 2012 May;21(5):997-1009.

Hodes RJ, Sierra F, Austad SN, Epel E, Neigh GN, Erlandson KM, Schafer MJ, LeBrasseur NK, Wiley C, Campisi J, Sehl ME. Disease drivers of aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2016 Dec;1386(1):45.

Hodge DR, Peng B, Pompeia C, Thomas SB, Cho E, Clausen PA, Marquez VE, Farrar WL. Epigenetic silencing of manganese superoxide dismutase (SOD-2) in KAS 6/1 human multiple myeloma cells increases cell proliferation. *Cancer biology & therapy*. 2005 May 1;4(5):585-92.

Hong SH, Hong BS, Kim DC, Rho MS, Park JI, Rha SH, Jun HS, Jeong JS. Involvement of mitogen-activated protein kinases and p21Waf1 in hydroxyurea-induced G1 arrest and senescence of McA-RH7777 rat hepatoma cell line. *Experimental & molecular medicine*. 2004 Oct;36(5):493-8.

Hong SH, Hong BS, Kim DC, Rho MS, Park JI, Rha SH, Jun HS, Jeong JS. Involvement of mitogen-activated protein kinases and p21Waf1 in hydroxyurea-induced G1 arrest and senescence of McA-RH7777 rat hepatoma cell line. *Experimental & molecular medicine*. 2004 Oct;36(5):493-8.

Hooten NN, Evans MK. Techniques to induce and quantify cellular senescence. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2017 May 1(123):e55533.

Hoyles RK, Derrett-Smith EC, Khan K, Shiwen X, Howat SL, Wells AU, Abraham DJ, Denton CP. An essential role for resident fibroblasts in experimental lung fibrosis is defined by lineage-specific deletion of high-affinity type II transforming growth factor  $\beta$  receptor. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2011 Jan 15;183(2):249-61.

Humphreys BD, Bonventre JV. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Annu. Rev. Med.*. 2008 Feb 18;59:311-25.

Hwang S, Hong HN, Kim HS, Park SR, Won YJ, Choi ST, Choi D, Lee SG. Hepatogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a rat model of thioacetamide-induced liver cirrhosis. *Cell biology international*. 2012 Mar;36(3):279-88.

Hydroxyurea - National Toxicology Program - NIH [Internet]. [cited 2021 Mar. 3]. Available from: [https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem\\_background/exsumpdf/hydroxyurea\\_508.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/hydroxyurea_508.pdf)

Iannello A, Thompson TW, Ardolino M, Lowe SW, Raulet DH. p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine*. 2013 Sep 23;210(10):2057-69.

Ishaq A, Schröder J, Edwards N, von Zglinicki T, Saretzki G. Dietary Restriction Ameliorates Age-Related Increase in DNA Damage, Senescence and Inflammation in Mouse Adipose Tissue. *J Nutr Health Aging* 2018;22(4):555-561.

Ito Y, Hoare M, Narita M. Spatial and temporal control of senescence. *Trends in cell biology*. 2017 Nov 1;27(11):820-32.

Ivanova NB, Dimos JT, Schaniel C, Hackney JA, Moore KA, Lemischka IR. A stem cell molecular signature. *Science*. 2002 Oct 18;298(5593):601-4.

Jagannathan-Bogdan M, Zon LI. Hematopoiesis. *Development*. 2013 Jun 15;140(12):2463-7.

Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 2000 Mar 31;275(13):9645-52.

Jia XH, Feng GW, Wang ZL, Du Y, Shen C, Hui H, Peng D, Li ZJ, Kong DL, Tian J. Activation of mesenchymal stem cells by macrophages promotes tumor progression through immune suppressive effects. *Oncotarget*. 2016 Apr 12;7(15):20934.

Jiang XX, Zhang YI, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005 May 15;105(10):4120-6.

Jin Y, Hong HS, Son Y. Substance P enhances mesenchymal stem cells-mediated immune modulation. *Cytokine*. 2015 Feb 1;71(2):145-53.

Jurišić V, Bogdanovic G, Srdic T, Jakimov D, Mrdjanovic J, Baltic M, Baltic VV. Modulation of TNF- $\alpha$  activity in tumor PC cells using anti-CD45 and anti-CD95 monoclonal antibodies. *Cancer Letters*. 2004 Oct 8;214(1):55-61.

Juriscic V, Pavlovic S, Colovic N, Colovic M. Possibility of transformation of primary myelofibrosis to ALL without JAK2V617F mutation. *Medical Oncology*. 2013 Mar;30(1):1-2.

Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular biology of the cell*. 2009 Apr 1;20(7):1992-2003.

Kandhaya-Pillai R, Miro-Mur F, Alijotas-Reig J, et al. TNF $\alpha$ -senescence initiates a STAT-dependent positive feedback loop, leading to a sustained interferon signature, DNA damage, and cytokine secretion. *Aging (Albany NY)* 2017; v.9(11).

Kanzler S, Lohse AW, Keil A, Henninger J, Dienes HP, Schirmacher P, Rose-John S, Meyer Zum Büschenfelde KH, Blessing M. TGF- $\beta$ 1 in liver fibrosis: an inducible transgenic mouse model to study liver fibrogenesis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 1999 Apr 1;276(4):G1059-68.

Kearney ER, Pape KA, Loh DY, Jenkins MK. Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity*. 1994 Jul 1;1(4):327-39.

Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, Rovira II, Nguyen AT, Malide D, Combs CA, Hall G, Zhang J. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *The Journal of experimental medicine*. 2006 May 15;203(5):1235-47.

Khalil N. TGF- $\beta$ : from latent to active. *Microbes and infection*. 1999 Dec 1;1(15):1255-63.

Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006 Aug 29;103(35):13180-5.

Kirkwood TB, Rose MR. Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 1991 Apr 29;332(1262):15-24.

Kirkwood TB. Evolution of ageing. *Nature*. 1977 Nov;270(5635):301-4.

Klopp AH, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M, Marini III F. Concise review: dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth?. *Stem cells*. 2011 Jan;29(1):11-9.

Kobayashi SS, Vali S, Kumar A, Singh N, Abbasi T, Sayeski PP. Identification of myeloproliferative neoplasm drug agents via predictive simulation modeling: assessing responsiveness with micro-environment derived cytokines. *Oncotarget*. 2016 Jun 14;7(24):35989.

Kobbe G, Schneider P, Aivado M, Zohren F, Schubert D, Fenk R, Neumann F, Kronenwett R, Pape H, Rong A, Royer-Pokora B. Reliable engraftment, low toxicity, and durable remissions following allogeneic blood stem cell transplantation with minimal conditioning. *Experimental hematology*. 2002 Nov 1;30(11):1346-53.

Korbling M, Dorken B, Ho AD, Pezzutto A, Hunstein W, Flidner TM. Autologous transplantation of blood-derived hemopoietic stem cells after myeloablative therapy in a patient with Burkitt's lymphoma. *Blood* 1986; 67, 529–532.

Korovila I, Hugo M, Castro JP, Weber D, Hohn A, Grune T & Jung T. Proteostasis, oxidative stress and aging. *Redox Biol* 2017; 13, 550–567.

Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 2001 May 4;105(3):369-77.

Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *The Journal of clinical investigation*. 2004 Nov 1;114(9):1299-307.

Krstić J, Obradović H, Jauković A, Okić-Đorđević I, Trivanović D, Kukulj T, Mojsilović S, Ilić V, Santibañez JF, Bugarski D. Urokinase type plasminogen activator mediates Interleukin-17-induced peripheral blood mesenchymal stem cell motility and transendothelial migration. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853:431-44.

Krtolica A, Parrinello S, Lockett S, Desprez PY, Campisi J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: a link between cancer and aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001 Oct 9;98(21):12072-7.

Kuhbier JW, Weyand B, Radtke C, Vogt PM, Kasper C, Reimers K. Isolation, characterization, differentiation, and application of adipose-derived stem cells. In *Bioreactor Systems for Tissue Engineering II 2010* (pp. 55-105). Springer, Berlin, Heidelberg.

Kühr T, Burgstaller S, Apfelbeck U, Linkesch W, Seewann H, Fridrik M, Michlmayr G, Krieger O, Lutz D, Lin W, Pont J. A randomized study comparing interferon (IFN $\alpha$ ) plus low-dose cytarabine and interferon plus hydroxyurea (HU) in early chronic-phase chronic myeloid leukemia (CML). *Leukemia research*. 2003 May 1;27(5):405-11.

Kuo ML, Kunugi KA, Lindstrom MJ, Kinsella TJ. The interaction of hydroxyurea and ionizing radiation in human cervical carcinoma cells. *The cancer journal from Scientific American*. 1997 May 1;3(3):163-73.

Kuo ML, Kunugi KA, Lindstrom MJ, Kinsella TJ. The interaction of hydroxyurea and iododeoxyuridine on the radiosensitivity of human bladder cancer cells. *Cancer research*. 1995 Jul 1;55(13):2800-5.

Kuo ML, Kunugi KA, Lindstrom MJ, Kinsella TJ. The interaction of hydroxyurea and ionizing radiation in human cervical carcinoma cells. *The cancer journal from Scientific American*. 1997 May 1;3(3):163-73.

Kuo ML, Kunugi KA, Lindstrom MJ, Kinsella TJ. The interaction of hydroxyurea and iododeoxyuridine on the radiosensitivity of human bladder cancer cells. *Cancer research*. 1995 Jul 1;55(13):2800-5.

Kurz DJ, Decary S, Hong Y, Erusalimsky JD. Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci*. 2000;113 ( Pt 20):3613-22.

Laberge RM, Sun YU, Orjalo AV, Patil CK, Freund A, Zhou L, Curran SC, Davalos AR, Wilson-Edell KA, Liu S, Limbad C. MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nature cell biology*. 2015 Aug;17(8):1049-61.

Laurent A, Nicco C, Chéreau C, Goulvestre C, Alexandre J, Alves A, Lévy E, Goldwasser F, Panis Y, Soubrane O, Weill B. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species. *Cancer research*. 2005 Feb 1;65(3):948-56.

Lawrence BE, Horton PM. *Progenitor Cells: Biology, Characterization and Potential Clinical Applications*. Nova Science Publishers 2013; Inc. p. 26.

Lazarus H, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone marrow transplantation*. 1995 Oct;16(4):557-64.

Lee D, Kim DW, Cho JY. Role of growth factors in hematopoietic stem cell niche. *Cell Biol Toxicol*. 2020; doi:10.1007/s10565-019-09510-7.

Lee HJ, Ko JH, Kim HJ, Jeong HJ, Oh JY. Mesenchymal stromal cells induce distinct myeloid-derived suppressor cells in inflammation. *JCI insight*. 2020 Jun 18;5(12).

Leng L, Wang Y, He N, Wang D, Zhao Q, Feng G, Su W, Xu Y, Han Z, Kong D, Cheng Z. Molecular imaging for assessment of mesenchymal stem cells mediated breast cancer therapy. *Biomaterials*. 2014 Jun 1;35(19):5162-70.



Levy O, Kuai R, Siren EM, Bhare D, Milton Y, Nissar N, De Biasio M, Heinelt M, Reeve B, Abdi R, Alturki M. Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies. *Science Advances*. 2020 Jul 1;6(30):eaba6884.

Li J, Law HK, Liu YL, Chan GC. Effect of cisplatin, topotecan, daunorubicin and hydroxyurea on human mesenchymal stem cells. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi*. 2010 Aug 1;18(4):991-6.

Liao N, Shi Y, Zhang C, Zheng Y, Wang Y, Zhao B, Zeng Y, Liu X, Liu J. Antioxidants inhibit cell senescence and preserve stemness of adipose tissue-derived stem cells by reducing ROS generation during long-term in vitro expansion. *Stem cell research & therapy*. 2019 Dec;10(1):1-1.

Linke SP, Clarkin KC, Di Leonardo A, Tsou A, Wahl GM. A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes & development*. 1996 Apr 15;10(8):934-47.

Liochev SI. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 2013 Jul 1;60:1-4.

Liozon E, Brigaudeau C, Trimoreau F, Desangles F, Fermeaux V, Praloran V, Bordessoule D. Is treatment with hydroxyurea leukemogenic in patients with essential thrombocythemia? An analysis of three new cases of leukaemic transformation and review of the literature. *Hematol Cell Ther*. 1997 Feb;39(1):11-8.

Liozon E, Brigaudeau C, Trimoreau F, Desangles F, Fermeaux V, Praloran V, Bordessoule D. Is treatment with hydroxyurea leukemogenic in patients with essential thrombocythemia? An analysis of three new cases of leukaemic transformation and review of the literature. *Hematol Cell Ther*. 1997 Feb;39(1):11-8.

Liu H, Huang B, Xue S, Tsang LL, Zhang X, Li G, Jiang X. Functional crosstalk between mTORC1/p70S6K pathway and heterochromatin organization in stress-induced senescence of MSCs. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020 Dec;11(1):1-7.

Liu RM, Desai LP. Reciprocal regulation of TGF- $\beta$  and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis. *Redox biology*. 2015 Dec 1;6:565-77.

Liu S, Ginestier C, Ou SJ, Clouthier SG, Patel SH, Monville F, Korkaya H, Heath A, Dutcher J, Kleer CG, Jung Y. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer research*. 2011 Jan 15;71(2):614-24.

Liu X, Wan M. A tale of the good and bad: Cell senescence in bone homeostasis and disease. *International review of cell and molecular biology*. 2019 Jan 1;346:97-128.

Łos MJ, Skubis A, Ghavami S, editors. *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*. Academic Press 2019; (pp. 2–16).

Lunyak VV, Amaro-Ortiz A, Gaur M. Mesenchymal stem cells secretory responses: senescence messaging secretome and immunomodulation perspective. *Frontiers in Genetics*. 2017 Dec 19;8:220.

Mabrouk N, Ghione S, Laurens V, Plenchette S, Bettaieb A, Paul C. Senescence and Cancer: Role of Nitric Oxide (NO) in SASP. *Cancers*. 2020 May;12(5):1145.

Mackinnon A, Forbes S. Bone marrow contributions to fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2013 Jul 1;1832(7):955-61.

Madaan K, Kaushik D, Verma T. Hydroxyurea: a key player in cancer chemotherapy. *Expert review of anticancer therapy*. 2012 Jan 1;12(1):19-29.

Madaan K, Kaushik D, Verma T. Hydroxyurea: a key player in cancer chemotherapy. *Expert review of anticancer therapy*. 2012 Jan 1;12(1):19-29.

Maddika S, Mendoza FJ, Hauff K, Zamzow CR, Paranjothy T, Los M. Cancer-selective therapy of the future: apoptin and its mechanism of action. *Cancer biology & therapy*. 2006 Jan 16;5(1):10-9.

Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *The FASEB Journal*. 1988 Jul;2(10):2557-68.

Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *Journal of biomedical science*. 2003;10(2):228-41.

Manaph NP, Sivanathan KN, Nitschke J, Zhou XF, Coates PT, Drogemuller CJ. An overview on small molecule-induced differentiation of mesenchymal stem cells into beta cells for diabetic therapy. *Stem cell research & therapy*. 2019 Dec 1;10(1):293.

Maria A, Bony C, Toupet K, Jorgensen C, Guilpain P, Noël D. A3. 7 Anti-fibrotic and anti-inflammatory effect of mesenchymal stem cells in murine hypochlorite-induced systemic sclerosis. 2015:A33-A34.

Marone M, Scambia G, Bonanno G, Rutella S, De Ritis D, Guidi F, Leone G, Pierelli L. Transforming growth factor- $\beta$ 1 transcriptionally activates CD34 and prevents induced differentiation of TF-1 cells in the absence of any cell-cycle effects. *Leukemia*. 2002 Jan;16(1):94-105.

Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, MacIsaac KD, Levine SS, Fraenkel E, von Boehmer H, Young RA. Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature*. 2007 Feb;445(7130):931-5.

Marusyk A, Wheeler LJ, Mathews CK, DeGregori J. p53 mediates senescence-like arrest induced by chronic replicational stress. *Molecular and cellular biology*. 2007 Aug 1;27(15):5336-51.

Marusyk A, Wheeler LJ, Mathews CK, DeGregori J. p53 mediates senescence-like arrest induced by chronic replicational stress. *Molecular and cellular biology*. 2007 Aug 1;27(15):5336-51.

Marusyk A, Wheeler LJ, Mathews CK, DeGregori J. p53 mediates senescence-like arrest induced by chronic replicational stress. *Molecular and cellular biology*. 2007 Aug 1;27(15):5336-51.

Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, et al. 2007. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* 9: 625–35.

Matjusaitis M, Chin G, Sarnoski EA, Stolzing A. Biomarkers to identify and isolate senescent cells. *Ageing research reviews*. 2016 Aug 1;29:1-2.

Matsuda M, Salazar F, Petersson M, Masucci G, Hansson J, Pisa P, Zhang QJ, Masucci MG, Kiessling R. Interleukin 10 pretreatment protects target cells from tumor-and allo-specific

cytotoxic T cells and downregulates HLA class I expression. *The Journal of experimental medicine*. 1994 Dec 1;180(6):2371-6.

McKarns SC, Schwartz RH, Kaminski NE. Smad3 is essential for TGF- $\beta$ 1 to suppress IL-2 production and TCR-induced proliferation, but not IL-2-induced proliferation. *The Journal of Immunology*. 2004 Apr 1;172(7):4275-84.

Meng X, Wang H, Song X, Clifton AC, Xiao J. The potential role of senescence in limiting fibrosis caused by aging. *Journal of cellular physiology*. 2020 May;235(5):4046-59.

Meng X, Wang H, Song X, Clifton AC, Xiao J. The potential role of senescence in limiting fibrosis caused by aging. *Journal of cellular physiology*. 2020 May;235(5):4046-59.

Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- $\beta$ : the master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*. 2016 Jun;12(6):325.

Minamino T, Yoshida T, Tateno K, Miyauchi H, Zou Y, Toko H, Komuro I. Ras induces vascular smooth muscle cell senescence and inflammation in human atherosclerosis. *Circulation*. 2003 Nov 4;108(18):2264-9.

Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Engineering of Stem Cells* 2009; 185–199.

Molofsky AV, Pardal R., Morrison S. J. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Current Opinion in Cell Biology* 2004; 16(6), 700–707.

Moore AG, Brown DA, Fairlie WD, Bauskin AR, Brown PK, Munier ML, Russell PK, Salamonsen LA, Wallace EM, Breit SN. The transforming growth factor- $\beta$  superfamily cytokine macrophage inhibitory cytokine-1 is present in high concentrations in the serum of pregnant women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2000 Dec 1;85(12):4781-8.

Moore MA. Hematopoietic stem cells. In *Principles of Tissue Engineering* 2014 Jan 1 (pp. 989-1040). Academic Press.

Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *nature*. 2006 Jun;441(7097):1068-74.

Mughal TI, Abdel-Wahab O, Rampal R, Mesa R, Koschmieder S, Levine R, Hehlmann R, Saglio G, Barbui T, Van Etten RA. Contemporary insights into the pathogenesis and treatment of chronic myeloproliferative neoplasms. *Leukemia & lymphoma*. 2016 Jul 2;57(7):1517-26.

Müller FJ, Loring JF. A compass for stem-cell differentiation. *Nature* 2014;513(7519), 498–499.

Muñiz-Rivera-Cambas A, Flores-Guzmán P, Mayani H. The in vitro growth of a cord blood–derived cell population enriched for CD34+ cells is influenced by its cell cycle status and treatment with hydroxyurea. *Cytotherapy*. 2018 Nov 1;20(11):1345-54.

Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: a gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy*. 2016 Feb 1;18(2):160-71.

Nazha A, Gerds AT. Where to Turn for Second-Line Cytoreduction After Hydroxyurea in Polycythemia Vera?. *The oncologist*. 2016 Apr;21(4):475.

Nečas E, Hauser F. Analysis of the effect of hydroxyurea on stem cell (CFU-s) kinetics. *Cell Proliferation*. 1982 Jan;15(1):39-47.

Nelson G, Kucheryavenko O, Wordsworth J, von Zglinicki T. The senescent bystander effect is caused by ROS-activated NF- $\kappa$ B signalling. *Mechanisms of ageing and development*. 2018 Mar 1;170:30-6.

Nishikimi TO, Uchino KA, Frohlich ED. Effects of alpha 1-adrenergic blockade on intrarenal hemodynamics in heart failure rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1992 Feb 1;262(2):R198-203.

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet*. 2000. 24: 372–76.

Novershtern N, Subramanian A, Lawton LN, Mak RH, Haining WN, McConkey ME, Habib N, Yosef N, Chang CY, Shay T, Frampton GM. Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. *Cell*. 2011 Jan 21;144(2):296-309.

O’Sullivan JN, Finley JC, Risques RA., Shen WT, Gollahon KA, Rabinovitch PS. Quantitative fluorescence in situ hybridization (QFISH) of telomere lengths in tissue and cells. *Curr. Protoc. Cytom*. 2005. Chapter 12, Unit 12.6.

Obradović N, Hristina. Funkcionalna karakterizacija primarnih mezenhimskih matičnih ćelija u proinformativnim i uslovima izmenjene oksigenacije. Doktorska disertacija 2019. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

Oh J, Lee YD, Wagers AJ. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nature medicine*. 2014 Aug;20(8):870.

Oh SA, Li MO. TGF- $\beta$ : guardian of T cell function. *The Journal of Immunology*. 2013 Oct 15;191(8):3973-9.

Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey VJ, Richardson AL, Weinberg RA. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005 May 6;121(3):335-48.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001 Apr;410(6829):701-5.

Östman A, Augsten M. Cancer-associated fibroblasts and tumor growth—bystanders turning into key players. *Current opinion in genetics & development*. 2009 Feb 1;19(1):67-73.

Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B, Feldmann S, Ehninger G, Bornhäuser M, Werner C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem cells*. 2004 May;22(3):377-84.

Özcan S, Alessio N, Acar MB, Mert E, Omerli F, Peluso G, Galderisi U. Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses. *Aging (Albany NY)*. 2016 Jul;8(7):1316.

Park JI, Jeong JS, Han JY, Kim DI, Gao YH, Park SC, Rodgers GP, Kim IH. Hydroxyurea induces a senescence-like change of K562 human erythroleukemia cell. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2000 Jul;126(8):455-60.

Parker KH, Beury DW, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. *Adv Cancer Res* 2015;128: 95–139

Passos JF. Stress, cell senescence and organismal ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2018.

Pennycook BR, Barr AR. Restriction point regulation at the crossroads between quiescence and cell proliferation. *FEBS letters*. 2020 Jul;594(13):2046-60.

Perez RL, Münz F, Vidoni D, Rühle A, Trinh T, Sisombath S, Zou B, Wuchter P, Debus J, Grosu AL, Saffrich R. Mesenchymal stem cells preserve their stem cell traits after exposure to antimetabolite chemotherapy. *Stem cell research*. 2019 Oct 1;40:101536.

Petrova NV, Velichko AK, Razin SV, et al. Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell* 2016; pp1–19.

Petrova NV, Velichko AK, Razin SV, Kantidze OL. Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell* 2016; 15, 999–1017.

Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regenerative medicine*. 2019 Dec 2;4(1):1-5.

Pittenger MF, Discher DE, Péault BM, Phinney DG, Hare JM, Caplan AI. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regenerative medicine*. 2019 Dec 2;4(1):1-5.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.

Pole A, Dimri M, Dimri GP. Oxidative stress, cellular senescence and ageing. *AIMS Molecular Science*. 2016;3(3).

Prise KM, O'sullivan JM. Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2009 May;9(5):351-60.

Prockop DJ. Inflammation, fibrosis, and modulation of the process by mesenchymal stem/stromal cells. *Matrix Biology*. 2016 Apr 1;51:7-13.

PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 3657, Hydroxyurea; [cited 2021 Mar. 3]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydroxyurea>

PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound Summary for CID 3657, Hydroxyurea; [cited 2021 Mar. 3]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Hydroxyurea>

Pule GD, Mowla S, Novitzky N, Wiysonge CS, Wonkam A. A systematic review of known mechanisms of hydroxyurea-induced fetal hemoglobin for treatment of sickle cell disease. *Expert review of hematology*. 2015 Sep 3;8(5):669-79.

Pule GD, Mowla S, Novitzky N, Wiysonge CS, Wonkam A. A systematic review of known mechanisms of hydroxyurea-induced fetal hemoglobin for treatment of sickle cell disease. *Expert review of hematology*. 2015 Sep 3;8(5):669-79.

Ralston A, Shaw K. Gene Expression Regulates Cell Differentiation. *Nature Education* 2008;1(1):127.

Randi ML, Ruzzon E, Luzzatto G, Tezza F, Girolami A, Fabris F. Safety profile of hydroxyurea in the treatment of patients with Philadelphia-negative chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2005 Jan 1;90(2):261-2.

Randi ML, Ruzzon E, Luzzatto G, Tezza F, Girolami A, Fabris F. Safety profile of hydroxyurea in the treatment of patients with Philadelphia-negative chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica*. 2005 Jan 1;90(2):261-2.

Ratajczak M, editor. *Stem Cell Therapeutic Applications*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing 2019; 1201, (pp 2-3).

Rattigan Y, Hsu JM, Mishra PJ, Glod J, Banerjee D. Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu. *Experimental cell research*. 2010 Dec 10;316(20):3417-24.



Rawat S, Gupta S, Mohanty S. Mesenchymal stem cells modulate the immune system in developing therapeutic interventions. In *Immune Response Activation and Immunomodulation* 2019 Jan 21. IntechOpen.

Ritter E, Perry A, Yu J, Wang T, Tang L, Bieberich E. Breast cancer cell-derived fibroblast growth factor 2 and vascular endothelial growth factor are chemoattractants for bone marrow stromal stem cells. *Annals of surgery*. 2008 Feb 1;247(2):310-4.

Rodier F, Munoz DP, Teachenor R, et al. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J Cell Sci*. 2011;124:68–81

Rodríguez-Carballo E, Gámez B, Ventura F. p38 MAPK signaling in osteoblast differentiation. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2016 May 6;4:40.

Roebuck KA, Finnegan A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *Journal of leukocyte biology*. 1999 Dec;66(6):876-88.

Roebuck KA, Rahman A, Lakshminarayanan V, Janakidevi K, Malik AB. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and tumor necrosis factor- $\alpha$  activate intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene transcription through distinct cis-regulatory elements within the ICAM-1 promoter. *Journal of Biological Chemistry*. 1995 Aug 11;270(32):18966-74.

Roederer M. Interpretation of cellular proliferation data: avoid the panglossian. *Cytometry A*. 2011;79(2):95-101.

Roufosse CA, Direkze NC, Otto WR, Wright NA. Circulating mesenchymal stem cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004 Apr 1;36(4):585-97.

Ruhland MK, Loza AJ, Capietto AH, Luo X, Knolhoff BL, Flanagan KC, Belt BA, Alspach E, Leahy K, Luo J, Schaffer A. Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis. *Nature communications*. 2016 Jun 8;7(1):1-8.

Ruhland MK, Loza AJ, Capietto AH, Luo X, Knolhoff BL, Flanagan KC, Belt BA, Alspach E, Leahy K, Luo J, Schaffer A, Edwards JR, Longmore G, Faccio R, DeNardo DG, Stewart SA. Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis. *Nature Communications* 2016; 11762.

Ruscetti M, Leibold J, Bott MJ, Fennell M, Kulick A, Salgado NR, Chen CC, Ho YJ, Sanchez-Rivera FJ, Feucht J, Baslan T. NK cell-mediated cytotoxicity contributes to tumor control by a cytostatic drug combination. *Science*. 2018 Dec 21;362(6421):1416-22.

Ruscetti M, Morris IV JP, Mezzadra R, Russell J, Leibold J, Romesser PB, Simon J, Kulick A, Ho YJ, Fennell M, Li J. Senescence-induced vascular remodeling creates therapeutic vulnerabilities in pancreas cancer. *Cell*. 2020 Apr 16;181(2):424-41.

Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Müller S, Seifried E, Gille J, Henschler R. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*. 2006 Dec 1;108(12):3938-44.

Sada A, Tumber T. New Insights into Mechanisms of Stem Cell Daughter Fate Determination in Regenerative Tissues. *International Review of Cell and Molecular Biology* 2013; 1–50.

Sakano K, Oikawa S, Hasegawa K, Kawanishi S. Hydroxyurea induces site-specific DNA damage via formation of hydrogen peroxide and nitric oxide. *Japanese Journal of Cancer Research*. 2001 Nov;92(11):1166-74.

Sanpaolo ER, Rotondo C, Cici D, Corrado A, Cantatore FP. JAK/STAT pathway and molecular mechanism in bone remodeling. *Molecular Biology Reports*. 2020 Oct 24;1-0.

Santibanez JF, Bjelica S. Transforming Growth Factor-Beta1 and Myeloid-Derived Suppressor Cells Interplay in Cancer. *The Open Cancer Immunology Journal* 2017; 06, 1-14.

Santos JL, Bosquesi PL, Almeida AE, Chin CM, Varanda EA. Mutagenic and genotoxic effect of hydroxyurea. *International journal of biomedical science: IJBS*. 2011 Dec;7(4):263.

Saoudaoui S, Bernard M, Cardin GB, Malaquin N, Christopoulos A, Rodier F. mTOR as a senescence manipulation target: A forked road. *Advances in Cancer Research*. 2021 Mar 18;150:335-63.

Sato I, Morita I, Kaji KA, Ikeda M, Nagao M, Murota S. Reduction of nitric oxide producing activity associated with in vitro aging in cultured human umbilical vein endothelial cell. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993 Sep 15;195(2):1070-6.

Savatier P, Lapillonne H, van Grunsven LA, Rudkin BB, Samarut J. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and

cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene* 1996.; 12: 309–22.

Sawal HA, Asghar K, Bureik M, Jalal N. Bystander signaling via oxidative metabolism. *OncoTargets and therapy*. 2017;10:3925.

Schelker RC, Iberl S, Müller G, Hart C, Herr W, Grassinger J. TGF- $\beta$ 1 and CXCL12 modulate proliferation and chemotherapy sensitivity of acute myeloid leukemia cells co-cultured with multipotent mesenchymal stromal cells. *Hematology*. 2018 Jul 3;23(6):337-45.

Schnabl B, Purbeck CA, Choi YH, Hagedorn CH, Brenner D. Replicative senescence of activated human hepatic stellate cells is accompanied by a pronounced inflammatory but less fibrogenic phenotype. *Hepatology*. 2003 Mar 1;37(3):653-64.

Schraufstatter IU, DiScipio RG, Zhao M, Khaldoyanidi SK. C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation. *The Journal of Immunology*. 2009 Mar 15;182(6):3827-36.

Schultz MB, Sinclair DA. When stem cells grow old: phenotypes and mechanisms of stem cell aging. *Development*. 2016 Jan 1;143(1):3-14.

Schwarz SC, Schwarz J. Translation of stem cell therapy for neurological diseases. *Translational Research*. 2010 Sep 1;156(3):155-60.

Segers VF, Van Riet I, Andries LJ, Lemmens K, Demolder MJ, De Becker AJ, Kockx MM, De Keulenaer GW. Mesenchymal stem cell adhesion to cardiac microvascular endothelium: activators and mechanisms. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2006 Apr;290(4):H1370-7.

Shelby MD. Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction Expert Panel. National Toxicology Program Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: guidelines for CERHR expert panel members. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2005;74:9–16.

Shelby MD. Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction Expert Panel. National Toxicology Program Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: guidelines for CERHR expert panel members. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2005;74:9–16.

Si Y, Zhao Y, Hao H, Liu J, Guo Y, Mu Y, Shen J, Cheng Y, Fu X, Han W. Infusion of mesenchymal stem cells ameliorates hyperglycemia in type 2 diabetic rats: identification of a novel role in improving insulin sensitivity. *Diabetes*. 2012 Jun 1;61(6):1616-25.

Siderakis M, Tarsounas M. Telomere regulation and function during meiosis. *Chromosome Research*. 2007 Jul;15(5):667-79.

Silva-Pinto AC, Dias-Carlos C, Saldanha-Araujo F, Ferreira FI, Palma PV, Araujo AG, Queiroz RH, Elion J, Covas DT, Zago MA, Panepucci RA. Hydroxycarbamide modulates components involved in the regulation of adenosine levels in blood cells from sickle-cell anemia patients. *Annals of hematology*. 2014 Sep;93(9):1457-65.

Silva-Pinto AC, Dias-Carlos C, Saldanha-Araujo F, Ferreira FI, Palma PV, Araujo AG, Queiroz RH, Elion J, Covas DT, Zago MA, Panepucci RA. Hydroxycarbamide modulates components involved in the regulation of adenosine levels in blood cells from sickle-cell anemia patients. *Annals of hematology*. 2014 Sep;93(9):1457-65.

Singh A, Xu Y-J. The Cell Killing Mechanisms of Hydroxyurea. *Genes (Basel)* 2016; 7(11): 99.

Singh A, Xu YJ. The cell killing mechanisms of hydroxyurea. *Genes*. 2016 Nov;7(11):99.

Singh A, Xu YJ. The cell killing mechanisms of hydroxyurea. *Genes*. 2016 Nov;7(11):99.

Skonieczna M, Hejmo T, Poterala-Hejmo A, CieslarPobuda A, Buldak RJ. NADPH oxidases:insights into selected functions and mechanisms of action in cancer and stem cells. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 1–15.

Song LI, Tuan RS. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *The FASEB Journal*. 2004 Jun;18(9):980-2.

Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes. *Mediators of inflammation*. 2008 Oct;2008.

Steidel U, Kronenwett R, Martin S, Haas R. Molecular biology of hematopoietic stem cells. *Vitamins and hormones*. 2003 Jan 1;66:2-9.

Stephens C. Senescence: even bacteria get old. *Current Biology*. 2005 Apr 26;15(8):R308-10.

Stock P, Brückner S, Ebensing S, Hempel M, Dollinger MM, Christ B. The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into murine liver. *Nature protocols*. 2010 Apr;5(4):617.

Strehler BL. Understanding aging. In *Aging methods and protocols 2000* (pp. 1-19). Humana Press.

Strehler BL. Understanding aging. In *Aging methods and protocols 2000* (pp. 1-19). Humana Press.

Studený M, Marini FC, Champlin RE, Zompetta C, Fidler IJ, Andreeff M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon- $\beta$  delivery into tumors. *Cancer research*. 2002 Jul 1;62(13):3603-8.

Studený M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, Champlin RE, Andreeff M. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004 Nov 3;96(21):1593-603.

Studený M, Marini FC, Dembinski JL, Zompetta C, Cabreira-Hansen M, Bekele BN, Champlin RE, Andreeff M. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004 Nov 3;96(21):1593-603.

Sun J, Ming L, Shang F, Shen L, Chen J, Jin Y. Apocynin suppression of NADPH oxidase reverses the aging process in mesenchymal stem cells to promote osteogenesis and increase bone mass. *Scientific reports*. 2015 Dec 21;5(1):1-1.

Sun S, Guo Z, Xiao X, Liu B, Liu X, Tang PH, Mao N. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem cells*. 2003 Sep;21(5):527-35.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126:663–676.

Takikawa O, Kuroiwa T, Yamazaki F, Kido R. Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2, 3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1988 Feb 5;263(4):2041-8.

Thomas DA, Massagué J. TGF- $\beta$  directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer cell*. 2005 Nov 1;8(5):369-80.

Trivanović D, Jauković A, Krstić J, Nikolić S, Okić-Đorđević I, Kukolj T, Obradović H, Mojsilović S, Ilić V, Santibañez JF, Bugarski D. Inflammatory cytokines prime adipose tissue mesenchymal stem cells to enhance malignancy of MCF-7 breast cancer cells via transforming growth factor- $\beta$ 1. *IUKCB Life*. 2016; 68(3):190-200.

Trivanović D, Kocić J, Mojsilović S, Đorđević IO, Ilić V, Santibañez JF, Bugarski D. Mesenchymal stem cells isolated from peripheral blood and umbilical cord Wharton's jelly. *Srp Arh Celok Lek*. 2013; 141(3-4): 178-86.

Tsai KS, Yang SH, Lei YP, Tsai CC, Chen HW, Hsu CY, Chen LL, Wang HW, Miller SA, Chiou SH, Hung MC. Mesenchymal stem cells promote formation of colorectal tumors in mice. *Gastroenterology*. 2011 Sep 1;141(3):1046-56.

Tu E, Chia PZ, Chen W. TGF $\beta$  in T cell biology and tumor immunity: Angel or devil?. *Cytokine & growth factor reviews*. 2014 Aug 1;25(4):423-35.

Turinetto V, Vitale E, Giachino C. Senescence in human mesenchymal stem cells: functional changes and implications in stem cell-based therapy. *International journal of molecular sciences*. 2016 Jul;17(7):1164.

Uchibori R, Okada T, Ito T, Urabe M, Mizukami H, Kume A, Ozawa K. Retroviral vector-producing mesenchymal stem cells for targeted suicide cancer gene therapy. *The Journal of Gene Medicine: A cross-disciplinary journal for research on the science of gene transfer and its clinical applications*. 2009 May;11(5):373-81.

Usunier B, Benderitter M, Tamarat R, Chapel A. Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough. *Stem cells international*. 2014 Oct;2014.

van Megen KM, van't Wout EJ, Lages Motta J, Dekker B, Nikolic T, Roep BO. Activated mesenchymal stromal cells process and present antigens regulating adaptive immunity. *Frontiers in Immunology*. 2019 Apr 3;10:694.

Varagić VM., Milošević MP. (2009). *Farmakologija* (pp. 677). Beograd: Elitmedica.

Varagić, V. M., Milošević, M. P. (2009). *Farmakologija* (pp. 677). Beograd: Elitmedica.

Ventura MT, Casciaro M, Gangemi S, Buquicchio R. Immunosenescence in aging: between immune cells depletion and cytokines up-regulation. *Clinical and Molecular Allergy*. 2017 Dec;15(1):1-8.

Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, Tasmir E, Morselli E, Younes AB, Maiuri MC, Lavandro S, Kroemer G. Senescence, apoptosis or autophagy?. *Gerontology*. 2008;54(2):92-9. Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes & development*. 2014 Jan 15;28(2):99-114.

Victorelli S, Passos JF. Telomeres and cell senescence-size matters not. *EBioMedicine*. 2017 Jul 1;21:14-20.

Visweswaran M, Pohl S, Arfuso F, Newsholme P, Dilley R, Pervaiz S, Dharmarajan A. Multi-lineage differentiation of mesenchymal stem cells—To Wnt, or not Wnt. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2015 Nov 1;68:139-47.

Vladimirovna IL, Sosunova E, Nikolaev A, Nenasheva T. Mesenchymal stem cells and myeloid derived suppressor cells: common traits in immune regulation. *Journal of immunology research*. 2016 Jan 1;2016.

Volkman R, Offen D. Concise review: mesenchymal stem cells in neurodegenerative diseases. *Stem cells*. 2017 Aug;35(8):1867-80.

Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental hematology*. 2005 Nov 1;33(11):1402-16.

Walker AL, Steward S, Howard TA, Mortier N, Smeltzer M, Wang YD, Ware RE. Epigenetic and molecular profiles of erythroid cells after hydroxyurea treatment in sickle cell anemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2011 Nov 17;118(20):5664-70.

Wang B, Lin Y, Hu Y, Shan W, Liu S, Xu Y, Zhang H, Cai S, Yu X, Cai Z, Huang H. mTOR inhibition improves the immunomodulatory properties of human bone marrow mesenchymal stem cells by inducing COX-2 and PGE 2. *Stem cell research & therapy*. 2017 Dec;8(1):1-3.

Wang Y, Chen X, Cao W, et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol* 2014;15:1009-16.

Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nature immunology*. 2014 Nov;15(11):1009-16.

Ware RE, Aygun B. Advances in the use of hydroxyurea. *ASH Education Program Book*. 2009;2009(1):62-9.

Ware RE, Aygun B. Advances in the use of hydroxyurea. *ASH Education Program Book*. 2009;2009(1):62-9.

Watanabe S, Kawamoto S, Ohtani N, Hara E. Impact of senescence-associated secretory phenotype and its potential as a therapeutic target for senescence-associated diseases. *Cancer science*. 2017 Apr;108(4):563-9.

White IA, Sanina C, Balkan W, Hare JM. Mesenchymal stem cells in cardiology. In *Mesenchymal Stem Cells 2016* (pp. 55-87). Humana Press, New York, NY.

Whitney MJ, Lee A, Ylostalo J, Zeitouni S, Tucker A, Gregory CA. Leukemia inhibitory factor secretion is a predictor and indicator of early progenitor status in adult bone marrow stromal cells. *Tissue Engineering Part A*. 2009 Jan 1;15(1):33-44.

Wise AF, Ricardo SD. Mesenchymal stem cells in kidney inflammation and repair. *Nephrology*. 2012 Jan;17(1):1-0.

Wolstein JM, Lee DH, Michaud J, Buot V, Stefanchik B, Plotkin MD. INK4a knockout mice exhibit increased fibrosis under normal conditions and in response to unilateral ureteral obstruction. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2010 Dec;299(6):F1486-95.

World Health Organization. The selection and use of essential medicines: report of the WHO Expert Committee, 2015 (including the 19th WHO Model List of Essential Medicines and the 5th WHO Model List of Essential Medicines for Children). World Health Organization; 2015.

Wu J, Niu J, Li X, Wang X, Guo Z, Zhang F. TGF- $\beta$ 1 induces senescence of bone marrow mesenchymal stem cells via increase of mitochondrial ROS production. *BMC developmental biology*. 2014 Dec;14(1):1-9.

Wu X, Jiang J, Gu Z, Zhang J, Chen Y, Liu X. Mesenchymal stromal cell therapies: immunomodulatory properties and clinical progress. *Stem Cell Research & Therapy*. 2020 Dec;11(1):1-6.



Wu Y, Su M, Zhang S, Cheng Y, Liao XY, Lin BY, Chen YZ. Abnormal expression of TGF-beta type II receptor isoforms contributes to acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2017 Feb 7;8(6):10037.

Wynn TA. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *The Journal of clinical investigation*. 2007 Mar 1;117(3):524-9.

Xiang X, Zhao J, Xu G, Li Y, Zhang W. mTOR and the differentiation of mesenchymal stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2011 Jul 1;43(7):501-10.

Xu C, Ren G, Cao G, Chen Q, Shou P, Zheng C, Du L, Han X, Jiang M, Yang Q, Lin L. miR-155 regulates immune modulatory properties of mesenchymal stem cells by targeting TAK1-binding protein 2. *Journal of Biological Chemistry*. 2013 Apr 19;288(16):11074-9.

Xu M, Tchkonja T, Ding H, Ogrodnik M, Lubbers ER, Pirtskhalava T, White TA, Johnson KO, Stout MB, Mezera V, Giorgadze N. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015 Nov 17;112(46):E6301-10.

Xu M, Tchkonja T, Kirkland JL. Perspective: Targeting the JAK/STAT pathway to fight age-related dysfunction. *Pharmacological research*. 2016 Sep 1;111:152-4.

Yan Z, Zhuansun Y, Chen R, Li J, Ran P. Immunomodulation of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells and its possible mechanism. *Experimental cell research*. 2014 May 15;324(1):65-74.

Yanagi S, Tsubouchi H, Miura A, Matsuo A, Matsumoto N, Nakazato M. The impacts of cellular senescence in elderly pneumonia and in age-related lung diseases that increase the risk of respiratory infections. *International journal of molecular sciences*. 2017 Mar;18(3):503.

Yang FC, Watanabe S, Tsuji K, Xu MJ, Kaneko A, Ebihara Y, Nakahata T. Human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) stimulates the in vitro and in vivo development but not commitment of primitive multipotential progenitors from transgenic mice expressing the human G-CSF receptor. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 1998 Dec 15;92(12):4632-40.

Yang YH, Ogando CR, See CW, Chang TY, Barabino GA. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem cell research & therapy*. 2018 Dec;9(1):1-4.

Yarbro JW. Mechanism of action of hydroxyurea. In *Seminars in oncology* 1992 Jun 1 (Vol. 19, No. 3 Suppl 9, pp. 1-10).

Ye J, Wu D, Wu P, Chen Z, Huang J. The cancer stem cell niche: cross talk between cancer stem cells and their microenvironment. *Tumor Biology*. 2014 May 1;35(5):3945-51.

Yen BL, Chang CJ, Liu KJ, Chen YC, Hu HI, Bai CH, Yen ML. Brief Report—Human Embryonic Stem Cell-Derived Mesenchymal Progenitors Possess Strong Immunosuppressive Effects Toward Natural Killer Cells as Well as T Lymphocytes. *Stem cells*. 2009 Feb;27(2):451-6.

Yeo EJ, Hwang YC, Kang CM, Kim IH, Kim DI, Parka JS, Choy HE, Park WY, Park SC. Senescence-like changes induced by hydroxyurea in human diploid fibroblasts. *Experimental gerontology*. 2000 Aug 1;35(5):553-71.

Yeo EJ, Hwang YC, Kang CM, Kim IH, Kim DI, Parka JS, Choy HE, Park WY, Park SC. Senescence-like changes induced by hydroxyurea in human diploid fibroblasts. *Experimental gerontology*. 2000 Aug 1;35(5):553-71.

Young CW, Schochetman G, Karnofsky DA. Hydroxyurea-induced inhibition of deoxyribonucleotide synthesis: studies in intact cells. *Cancer Research*. 1967 Mar 1;27(3):526-34.

Young CW, Schochetman G, Karnofsky DA. Hydroxyurea-induced inhibition of deoxyribonucleotide synthesis: studies in intact cells. *Cancer Research*. 1967 Mar 1;27(3):526-34.

Yu S, Li C, Hou XG, Hou WK, Dong JJ, Lei SU, Tang KX, Bin WA, Jun SO, Hui LI, Wang KX. Differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from diabetic patients into insulin-producing cells in vitro. *Chinese medical journal*. 2007 May 1;120(9):771-6.

Yu X, Wang P, Shi Z, Dong K, Feng P, Wang H, Wang X. Urotensin-II-mediated reactive oxygen species generation via NADPH oxidase pathway contributes to hepatic oval cell proliferation. *PLoS One*. 2015 Dec 11;10(12):e0144433.

Zhai Y, Wei R, Liu J, Wang H, Cai W, Zhao M, Hu Y, Wang S, Yang T, Liu X, Yang J. Drug-induced premature senescence model in human dental follicle stem cells. *Oncotarget*. 2017 Jan 31;8(5):7276.

Zhai Y, Wei R, Liu J, Wang H, Cai W, Zhao M, Hu Y, Wang S, Yang T, Liu X, Yang J. Drug-induced premature senescence model in human dental follicle stem cells. *Oncotarget*. 2017 Jan 31;8(5):7276.

Zhou X, Hong Y, Zhang H, Li X. Mesenchymal stem cell senescence and rejuvenation: current status and challenges. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020 Jun 3;8:364.

Zhu Y, Sun Z, Han Q et al. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia* 2009;23:925–933.

Ziegler DV, Wiley CD, Velarde MC. Mitochondrial effectors of cellular senescence: beyond the free radical theory of aging. *Aging cell*. 2015 Feb;14(1):1-7.

Ziegler-Sylakakis K, Schwarz LR, Andrae U. Microsome- and hepatocyte-mediated mutagenicity of hydroxyurea and related aliphatic hydroxamic acids in V79 Chinese hamster cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 1985 Nov 1;152(2-3):225-31.

## Прилог-Списак скраћеница

**α-MEM**- Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification

**AAPH** (енг. *2,2'-azobis 2 amidinopropane dihydrochloride*)-генератор ROS

**AVO** (енг. *acidic vesicular organelle*)-киселе везикуле

**BCA** (енг. *Bicinchoninic acid*)-бицинхонична киселина

**BrdU** (енг. *bromo-deoxyuridine*) бром деоксиуридин

**CFSE** (енг. *carboxyfluorescein succinimidyl ester*)- карбоксифлуоросцеин сукцинимидил естар

**CFU-F** (енг. *Colony forming unit fibroblast*)-матичне ћелије прекурсори фибробласта

**CV** (енг. *cristal violet*)- кристал виолет

**DAF** (енг. *diacetate 4-amin-5-methylamino-2', 7'-difluoroscein diacetate*)-диацетат 4-амино-5метиламино-2',7' дифлуоросцеин диацетат

**DAPI** (енг. *Diamidine-20 -phenylindole dihydrochloride*)-диамидин 20 фенилиндол дихлорид

**DCF** (енг. *2',7' -dichlorofluorescein*)- 2',7'-дихлорофлуоресцеин

**DCFDA** (енг. *2',7' -dichlorofluorescein diacetate*)- 2',7'-дихлорофлуоресцеин диацетата

**ECL** (енг. *enhanced chemiluminescence reagent system*)-хемилумисцентни реагенси за појачавање сигнала

**EGF** (енгл. *endothelial growth factor*)- ендотелни фактор раста

**ELISA** (енг. *enzyme-linked immunosorbent assay*)-ензимски имуноесеј

**ERK** (енгл. *extracellular-signal-regulated kinase*)-екстрацелуларним сигналом регулисана киназа

**FBS** (енг. *Fetal Bovine Serum*)- фетални говеђи серум

**FGF** (енгл. *fibroblast growth factor*)- фибробластни фактор раста

**FISH** (енгл. *fluorescence in situ hybridization*)- флуоресцентна *in situ* хибридизација

**GAPDH** (енг. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)-глицералдехид 3 фосфат дехидрогеназа

**G-CSF** (енгл. *granulocyte colony-stimulating factor*)-фактор стимулације гранулоцитних колонија

**GVDH** (енг. *graft versus host disease*)- болести графт против домаћина

**GM-CSF** (енгл. *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)-фактор стимулације гранулоцитних/макрофагних колонија

**HEL 92.1.7**- хумана еритролеукемијска ћелијска линија 92.1.7

**HGF** (енгл. *hepatocyte growth factor*)-фактор раста хепатоцита

**HO-1** (енгл. *heme oxygenase 1*)- хем-оксигеназа 1

**HRP** (енг. *horse radish peroxidase*)-пероксидаза рена

**IDO** (енгл. *indoleamine 2 3-dioxygenase*)-индоламин -2,3-диоксигеназа

**IFN $\gamma$**  (енгл. *interferon gamma*)-интерферон гама

**IGF-1** (енгл. *insulin like growth factor 1*)- инсулину сличан фактор раста 1

**IGF-1** (енгл. *insulin-like growth factor 1*)-инсулину сличан фактор раста 1

**IKCX** (енг. *isobutyl-methylxanthine*)- изобутил-метилксантин

**JNK** (енгл. *Jun N-terminus kinase*)- Jun N терминусна киназа

**LAP** (енгл. *latency associated peptide*) – протеин асоциран са латентношћу

**LIF-1** (енгл. *leukemia inhibitory factor*) - леукемија инхибиторни фактор 1

**LTBP** (енгл. *latent TGF-beta binding protein*)- латентни протеин који везује TGF- $\beta$

**МАРК** (енгл. *mitogen-activated protein kinases*)- митогеном активирана протеин киназа

**MCV** (енгл. *mean corpuscular volume*)- просечан волумен еритроцита

**MLR**- (енгл. *mixed lymphocyte reaction*) реакцији помешаних лимфоцита

**mTOR** (енг. *mammalian target of rapamycin*)-таргет молекула рапамицина

**МТТ-3**-(4,5-Диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид тест

**НАС** (енгл. *N-acetyl cysteine*)- N ацетил цистеин

**НК**- (енгл. *natural killer*) урођеноубилачке ћелије

**NO** (енг. *nitric oxide*)- азот моноксид

**NOX**- NADPH оксидазе

**NQO1** (енгл. *NADPH quinone oxidoreductase 1*)- NADPH квинон оксиредуктаза 1

**PBS** (енг. *Phosphate buffered saline*)- слани фосфатни пуфер

**PCR** (енг. *Polymerase Chain Reaction*)-реакција ланчане полимеризације

**PI**-пропидијум јодид

**Rb** (енгл. *retinoblastoma*) – ретинобластом

**ROS** (енгл. *reactive oxygen species*)-реактивне кисеоничне врсте

**RT- PCR** (енг. *real time polymerase chain reaction*)- реакција ланчане полимеризације у реалном времену

**SASP** (енгл. *Senescence associated secretory phenotype*)- са сенесценцијом асоцирани секреторни фенотип

**SA-β-gal** (енгл. *senescence-associated β-galactosidase*)- сенесцентна бета галактозидаза

**SCF** (енгл. *stem cell factor*)-фактор стем ћелија

**SDS-PAGE** (енгл. *Sodium Dodecyl Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis*)- натријум додецил сулфат полиакриламид гел електрофореза

**SMAD** (енгл. *small mothers against decapentaplegic homolog*) – сигнални пут

**TBRi** (енг. *inhibitor of transforming growth factor-b type I receptor*)- селективни инхибитор TGF-β1 рецептора тип 1

**TGF-β** (енг. *transforming growth factor beta*)-трансформишући фактор бета

**TMB** (енг. *3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine*)-тетра метилбензидин

**TNFα** (енгл. *tumor necrosis factor-alpha*)-тумор некрозис фактор алфа

**US FDA** (енгл. *US Food and Drug Administration*)-Америчка агенција за храну и лекове

**VEGF** (енгл. *vascular endothelial growth factor*)- васкуларни ендотелни фактор раста

**X-gal** -5-бромо-4-хлоро-3-индолил-β-D-галактопиранозид

**α-SMA** (енгл. *α-smooth muscle actin*)- глаткомишићни актин алфа

**γH2A.X** (енг. *γ-histone family member X*)- γ хистон члан фамилије X

**АПО**-апоцинин

**ДОКСО**- доксорубицин

**ЕВЕ**-еверолимус

**ЈАК/СТАТ** (енг. *janus kinasis/signal transducer and activator of transcription*)-јанус киназа/сигнални трансдјусер и активатор транскрипције

**КС МСћ**- мезенхималне стромалне ћелије костне сржи

**МНћ**- моноклеарне ћелије

**МПН**- мијелопролиферативне неоплазме

**МСћ**- мезенхималне стромалне ћелије

**МСућ** -мијелоидне супресорне ћелије

**ПК МСћ**- мезенхималне стромалне ћелије периферне крви

**ТАФ**- тумор-асоцирани фибробласти

**ХИВ**- вирус хумане имунодефицијенције

**ХМЋ**- хематопоеетске матичне ћелије

**ХУ** -хидроксиуреа

**ХУ-С-МСЋ**- хидроксиуреом индукована сенесценција МСЋ

## Биографија аутора

Сунчица М. Бјелица (Капор) је рођена 1988. године у Сарајеву, Босна и Херцеговина. Основну и средњу Зуботехничку школу завршила је у Београду. Јануара 2015. године дипломирала је на Медицинском факултету, Универзитета у Београду са просечном оценом 9.11/10.0, а септембра 2015. положила је стручни испит за доктора медицине. Докторске студије уписала је школске 2015. године на Медицинском факултету, студијски програм Молекуларна медицина и при том положила програмом предвиђене испите. Од марта 2016. ради на изради докторске дисертације у оквиру истраживачке групе Молекуларна Онкологија, Института за медицинска истраживања, Института од националног значаја, Универзитета у Београду. Од септембра 2016. године до марта 2020. године, Сунчица Бјелица је била ангажована на научноистраживачком пројекту ОИ175053 (руководилац др Владан Чокић) „Испитивање патогенезе хематолошких малигнитета“, који финансира Министарство просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије. Октобра 2019. изабарана је у научно звање истраживач сарадник. Специјализацију из интерне медицине на Медицинском факултету, уписала је маја 2019. године. Од марта 2020. године запослена је као клинички лекар на Одељењу хематологије у КБЦ „Др Драгиша Мишовић-Дедиње“, Универзитета у Београду.

Са циљем усавршавања и стандардизације протокола за изолацију мијелоидних супресорних ћелија и утврђивања оксидативног стреса у овим ћелијама, боравила је на Универзитетској клиници у Есену, Немачка, током јануара 2017. године, на Хематолошком одељењу, Универзитетске болнице у Криту, Грчка, током јуна 2018. године и на Одељењу за ћелијску биологију и радиологију, Института за Биофизику Чешке академија наука у Брну током септембра 2018. год. Током јула и августа 2018. и 2019. године у улози предавача из области медицинских наука боравила је на Медицинским факултетима у Оксфорду, Кембриџу и Сент Ендрјезу, Енглеска, на позив доктора Ричарда Мајклса, директора Оксбриџ академског програма. У циљу проучавања интернализације нанопартикула у ћелије канцера боравила је на Одељењу за неурологију, Медицинског факултета, Кастиља Ла Манча Универзитета у Албасетеу, Шпанија током марта 2019. године. Августа 2021. године са циљем стандардизације протокола дијагностике неутропеничних пацијената боравила у Универзитетској дечијој



болници Ђијанина Гаслини, Ђенова, Италија у склопу иницијативе COST-EuNet Innochron чији је активни члан.

У току досадашњег научноистраживачког рада, Сунчица Бјелица је објавила 17 публикација у међународним часописима и то два рада у категорији M21a, пет радова у категорији M21, три рада у категорији M22, седам радова у категорији M23. Објавила је и 5 радова саопштених на скуповима међународног значаја штампаних у изводу (M34). У четири рада категорије M21 Сунчица Бјелица је први аутор. Добитница је награде за научно истраживачки рад „Др Јован Вучо“ за 2019. годину за публикацију објављену у часопису *FEBS Journal*.

## Прилог 1.

### Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Сунчица М. Бјелица**

Број индекса **ММ 18/15**

#### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Испитивање модулације сенесценције индуковане хидроксиуреом на модел  
систему хуманих мезенхималних стромалних ћелија**

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

У Београду, \_\_\_\_\_

**Потпис аутора**

\_\_\_\_\_

## Прилог 2.

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

Име и презиме аутора **Сунчица М. Бјелица**

Број индекса **ММ 18/15**

Студијски програм **Молекуларна медицина**

Наслов рада **Испитивање модулације сенесценције индуковане  
хидроксиуреом на модел систему хуманих мезенхималних стромалних  
ћелија**

Ментори **Проф.др Милица Радојковић, ванредни професор  
Медицинског факултета, Универзитет у Београду**

**Др сци. Хуан Ф Сантибањез, научни сарадник, Институт за  
медицинска истраживања, Универзитет у Београду**

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

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

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

**Потпис аутора**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## Прилог 3.

### Изјава о коришћењу

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

**Испитивање модулације сенесценције индуковане хидроксиуреом на модел систему хуманих мезенхималних стромалних ћелија**

која је моје ауторско дело.

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

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

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

У Београду, \_\_\_\_\_

Потпис аутора

\_\_\_\_\_