



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE BIOLOGIJE

Teja RAJAR

**RAZVOJ METODE ZA DOLOČITEV DOVZETNOSTI
MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC NA
SPROŽENO SENESCENCO**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE BIOLOGIJE

Teja RAJAR

**RAZVOJ METODE ZA DOLOČITEV DOVZETNOSTI
MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC NA SPROŽENO
SENESCENCO**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**METHOD DEVELOPMENT FOR DETERMINATION OF
MESENCHYMAL STEM CELLS SUSCEPTIBILITY TO INDUCED
SENESCENCE**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2015

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. stopnje molekulske biologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka Nacionalnega inštituta za biologijo v Ljubljani.

Komisija za študij 1. in 2. stopnje je dne 21. 2. 2014 odobrila temo in naslov magistrskega dela in za mentorico imenovala prof. dr. Tamaro Lah Turnšek, za somentorico asist. dr. Heleno Motaln in za recenzentko prof. dr. Jasno Štrus.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Boris BULOG

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Tamara LAH TURNŠEK

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka

Članica: asist. dr. Helena MOTALN

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za genetsko toksikologijo in biologijo raka

Članica: prof. dr. Jasna ŠTRUS

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 29. 9. 2015

Podpisana izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Teja Rajar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 6:576.3(043.2)=163.6
KG mezenhimske matične celice/maščobno tkivo/ASC/sprožena senescenca
AV RAJAR, Teja, diplomirana biotehnologinja (UN)
SA LAH TURNŠEK, Tamara (mentorica)/MOTALN, Helena (somentorica)/ŠTRUS, Jasna (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske biologije
LI 2015
IN RAZVOJ METODE ZA DOLOČITEV DOVZETNOSTI MEZENHIMSKIH MATIČNIH CELIC NA SPROŽENO SENESCENCO
TD Magistrsko delo (Univerzitetni študij – 2. stopnja Molekulska biologija)
OP XII, 66 str., 9 pregl., 23 sl., 119 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Človeško maščobno tkivo je odličen vir mezenhimskih matičnih celic (MSC), ki jih v nalogi skrajšano imenujemo ASC (ang. *Adipose Stem Cells*). Zaradi svojih regenerativnih lastnosti imajo ASC številne možnosti za uporabo v kliniki za zdravljenje bolezni in regeneracijo tkiv. Za uspešno zdravljenje je treba zagotoviti ustrezno kvaliteto ASC. Cilj naše raziskave je bil razvoj hitre in enostavne metode za opredelitev kvalitete ASC, in sicer glede na oceno dovzetnosti celic na sproženo senescenco. Preizkusili smo dva sprožitelja senescence, in sicer citostatik mitoksantron in inhibitor histonskih deacetilaz trihostatin A (TSA). Primerjali smo dovzetnost ASC za sproženje senescence in vpliv na preostalo proliferacijsko sposobnost ASC treh različnih izvorov glede na anatomsko lokacijo maščobnih blazinic na telesu. Ugotovili smo, da sprožena senescenca sovпада s spontano senescenco v celicah in da so ASC, izolirane iz maščobnega tkiva trebuha, bolj odporne na mitoksantron in TSA, kot ASC, izolirane iz maščobnega tkiva bokov in stegen. Sklepamo, da ASC, izolirane iz maščobnega tkiva trebuha, predstavljajo kvalitetnejše celične linije z večjo sposobnostjo proliferacije in so zato bolj primerne za klinično uporabo v naprednem celičnem zdravljenju oziroma v regeneracijski medicini.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 6:576.3(043.2)=163.6
CX mesenchymal stem cells/adipose tissue/ASC/induced senescence
AU RAJAR, Teja
AA LAH TURNŠEK, Tamara (supervisor)/MOTALN, Helena (co-supervisor)/ŠTRUS, Jasna (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Academic study programme in molecular biology
PY 2015
TY METHOD DEVELOPMENT FOR DETERMINATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS SUSCEPTIBILITY TO INDUCED SENESCENCE
DT M. SC. Thesis (Master Study Programmes – Molecular biology)
NO XII, 66 p., 9 tab., 23 fig., 119 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Human adipose tissue is an excellent source of donor mesenchymal stem cells (MSC), so called adipose tissue stem cells (ASC). Considering their remarkable regenerative characteristics ASC hold a great potential in clinical applications in diseases' treatment and tissue regeneration. In this respect it is very important to ensure appropriate ASC quality, since this would lead to better therapeutic goals and more successful therapy. The aim of our study was the development of a quick and simple method for determination of ASC quality with respect to their susceptibility to induced senescence. We examined two inductors of cellular senescence: cytostatic mitoxantrone and trichostatin A (TSA), a histone deacetylase inhibitor. We compared the susceptibility of ASC to cellular senescence induction and the residual proliferation capability of ASC, originating from three different anatomical sites of adipose tissue pads. Our results showed that the induced senescence correlated with spontaneous senescence in cells and that ASC isolated from abdominal adipose tissue are more resistant to mitoxantrone and TSA, than ASC isolated from hips and thighs adipose pads. We thus conclude that ASC isolated from abdominal adipose tissue represent better quality cell lines with higher proliferation capability and are as such more suitable for clinical application in advanced cell therapies and/or regenerative medicine.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJ MAGISTRSKEGA DELA	2
1.3 DELOVNI HIPOTEZI	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 MATIČNE CELICE	3
2.1.1 Splošne značilnosti matičnih celic	3
2.1.2 Mezenhimske matične celice.....	5
2.2 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE IZ MAŠČEVJA (ASC)	7
2.2.1 Maščobno tkivo	7
2.2.2 Splošne značilnosti ASC	8
2.2.3 Izolacija in diferenciacija ASC	9
2.2.4 Uporaba ASC v regenerativni medicini	12
2.3 SENESCENCA CELIC	13
2.3.1 Značilnosti senescentnih celic	14
2.3.2 Sprožitelja senescence mitoksantron in trihostatin A (TSA)	17
3 MATERIAL IN METODE	19
3.1 KEMIKALIJE IN LABORATORIJSKA OPREMA	19

3.1.1	Kemikalije	19
3.1.2	Laboratorijska oprema	20
3.2	CELIČNE LINIJE	21
3.2.1	Človeške mezenhimske matične celice iz maščevja	21
3.3	PRIPRAVA RAZTOPIN IN GOJIŠČ	22
3.3.1	Priprava raztopin	22
3.3.2	Priprava gojišč za gojenje celičnih kultur	22
3.3.3	Priprava krovnih stekelc, prevlečenih s poli-L-lizinom	24
3.4	POSTOPKI <i>in vitro</i> GOJENJA ASC	25
3.4.1	Odmrzovanje celic	25
3.4.2	Presajevanje celic.....	25
3.4.3	Določanje števila celic na hemocitometru	26
3.5	TESTIRANJE PROLIFERACIJE CELIC	27
3.5.1	Test MTT.....	27
3.6	HISTOKEMIJSKO BARVANJE SENESCENTNIH CELIC	30
3.6.1	Test SA-β-gal.....	30
4	REZULTATI.....	33
4.1	ANALIZA PROLIFERACIJE CELIC	33
4.1.1	Vpliv mitoksantrona na stopnjo proliferacije različnih linij ASC.....	33
4.1.2	Vpliv mitoksantrona na stopnjo proliferacije ASC glede na telesno lokacijo .	34
4.1.3	Vpliv trihostatina A (TSA) na stopnjo proliferacije različnih linij ASC	37
4.1.4	Vpliv trihostatina A (TSA) na stopnjo proliferacije ASC glede na telesno lokacijo.....	38
4.2	ANALIZA SENESCENCE CELIC	41
4.2.1	Vpliv mitoksantrona na stopnjo senescence različnih linij ASC.....	42
4.2.2	Vpliv mitoksantrona na stopnjo senescence ASC glede na telesno lokacijo	43

4.2.3	Vpliv trihostatina A (TSA) na stopnjo senescence različnih linij ASC	45
4.2.4	Vpliv trihostatina A (TSA) na stopnjo senescence ASC glede na telesno lokacijo.....	46
5	RAZPRAVA.....	49
6	SKLEPI	54
7	POVZETEK.....	55
8	VIRI.	57

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Klasifikacija matičnih celic glede na njihov diferenciacijski potencial.....	4
Pregl. 2: Molekularni fenotip ASC.....	8
Pregl. 3: Seznam uporabljenih kemikalij.....	19
Pregl. 4: Seznam uporabljene laboratorijske opreme	20
Pregl. 5: Seznam uporabljenih celičnih linij.....	22
Pregl. 6: Sestava gojišča za ASC z 20 % FBS	23
Pregl. 7: Sestava gojišča za ASC z 10 % FBS	23
Pregl. 8: Sestava gojišča za zamrzovanje ASC	24
Pregl. 9: Količine in imena reagentov/substrata za pripravo raztopine za histokemijsko barvanje	32

KAZALO SLIK

Sl. 1: Shema izolacije in diferenciacije ASC za uporabo v kliniki.....	10
Sl. 2: Struktura mitoksantrona	17
Sl. 3: Struktura trihostatina A	18
Sl. 4: Razporeditev in dimenzije kvadratov v hemocitometru	27
Sl. 5: Struktura MTT in njegova redukcija v formazanski produkt.....	28
Sl. 6: Shema izvedbe testa MTT v gojilni plošči s 96 vdolbinami	30
Sl. 7: Videz mezenhimskih matičnih celic, izoliranih iz maščevja.	31
Sl. 8: Vpliv mitoksantrona na proliferacijo mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja.....	34
Sl. 9: Vpliv mitoksantrona na proliferacijo mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja glede na telesno lokacijo.	35
Sl. 10: Vpliv različnih koncentracij mitoksantrona na proliferacijo ASC izoliranih iz maščevja stegna, bokov in trebuha ter primerjava med telesnimi lokacijami.....	36
Sl. 11: Primer boljše rastočih mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja.	36
Sl. 12: Primer slabše rastočih mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja.	37
Sl. 13: Vpliv trihostatina A na proliferacijo mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja.....	38
Sl. 14: Vpliv trihostatina A na proliferacijo mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja glede na telesno lokacijo.	39
Sl. 15: Vpliv različnih koncentracij trihostatina A na proliferacijo ASC izoliranih iz maščevja stegna, bokov in trebuha ter primerjava med telesnimi lokacijami.....	40
Sl. 16: Primer dobro rastočih mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja.	40
Sl. 17: Primer slabše rastočih mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja.	41
Sl. 18: Vpliv mitoksantrona na stopnjo senescence mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja.....	42
Sl. 19: Vpliv mitoksantrona na stopnjo senescence mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja glede na telesno lokacijo.	44
Sl. 20: Vpliv različnih koncentracij mitoksantrona na stopnjo senescence ASC izoliranih iz maščevja stegna, bokov in trebuha ter primerjava med telesnimi lokacijami.....	45

Sl. 21: Vpliv trihostatina A na stopnjo senescence mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja.....	46
Sl. 22: Vpliv trihostatina A na stopnjo senescence mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja glede na telesno lokacijo.	47
Sl. 23: Vpliv trihostatina A na stopnjo senescence ASC izoliranih iz maščevja stegna, bokov in trebuha ter primerjava med telesnimi lokacijami.....	48

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
$A_{570/690}$	absorbanca pri valovni dolžini 570 nm in referenčni valovni dolžini 690 nm
ASC	mezenhimska matična celica, izolirana iz maščobnega tkiva
ATM	mutirana ataxia-telangiectasia kinaza
ATR	z ATM in Rad 3 povezana kinaza
BMT	belo maščobno tkivo
BRE	protein BRE, podenota kompleksa BRCA1-A
CDC25	družina fosfataz, ki defosforilirajo in deaktivirajo od ciklina odvisne kinaze; interakcija s p53 povzroči zastoj v G1 fazi celičnega cikla
CDKI	inhibitorji od ciklina odvisnih kinaz
CHK1	serin/treonin specifična kinaza, ki regulira G2/M kontrolno točko celičnega cikla
CHK2	serin/treonin specifična kinaza, ki fosforilira CDC25, tudi tumor-supresorski protein
c-FLIP	inhibitorni protein FADD-u podobnega encima, ki pretvarja IL-1 β
c-FOS	protein proto-onkogen c-Fos iz družine transkripcijskih dejavnikov Fos
c-MYC	protein proto-onkogen c-Myc, transkripcijski dejavnik
dH ₂ O	destilirana voda
DMEM	Dulbeccovo modificirano gojišče
DMSO	dimetil sulfoksid
EDTA	etilendiaminotetraetanojska kislina
EGF	epidermalni rastni dejavnik
ESC	embrionalna matična celica
FADD	s Fas povezani protein s smrtno domeno, adaptorski protein pri apoptozi
FAS receptor	receptor, ki ob vezavi Fas liganda vodi v apoptozo
FBS	Serum govejega zarodka
g	enota za relativni centrifugalni pospešek (RCF)

H ₂ O	voda
HDACI	inhibitor histonskih deacetilaz
HGF	hepatocitni rastni dejavnik
HLA-DR	celični površinski receptor MHC razreda II
HLA-I	človeški levkocitni antigen razreda I
HLA-II	človeški levkocitni antigen razreda II
HP1	heterokromatin protein 1
HSC	hematopoetska matična celica
IL-10	interlevkin 10
iPSC	sprožena pluripotenta matična celica
ISCT	Mednarodno združenje za celično zdravljenje (ang. <i>International society for cellular therapy</i>)
K ₄ Fe(CN) ₆	kalijev heksacianoferat(III)
K ₄ (Fe(CN) ₆)x3H ₂ O	kalijev heksacianoferat(II) trihidrat
KLF4	transkripcijski dejavnik družine KLF
L-glu	L-glutamin
MgCl ₂	magnezijev diklorid
MSC	mezenhimska matična celica
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid
NaCl	natrijev klorid
NaHCO ₃	natrijev hidrogen karbonat
NH ₄ Cl	amonijev klorid
NO ₂ HPO ₄	nitritov hidrogenfosfat
OCT-3/4	transkripcijski faktor POU, ki ga kodira gen <i>Pou5f1</i>
P/S	penicilin/streptomycin
p<0,01	meja tveganja za statistično značilnost je 0,01
p<0,05	meja tveganja za statistično značilnost je 0,05
p16/INK4	inhibitor od ciklinov odvisnih kinaz CDK4, CDK6
PBS	Slana fosfatna puferska raztopina
PCNA	proliferajoči celični jedrni antigen
PGE2	prostaglandin E2
poly-L-Lys	poli-L-lizin

RMT	rjavo maščobno tkivo
SAHF _s	s senescenco povezane heterokromatinske skupine lokusov
SA-miRNA	s senescenco povezane mikroRNA molekule
SDF _s	s senescenco povezane skupine lokusov poškodovane DNA
SOX2	transkripcijski dejavnik iz družine Sox
STRO-1	celični površinski receptor
SVF	stromalna vaskularna frakcija
T25	ploščate platenke za gojenje ASC s površino 25 cm ²
TGF- β	transformacijski rastni dejavnik β
TNF α receptor	receptor tumor nekrotizirajočega dejavnika α
TIF _s	s telomerami sprožene disfunkcionalne skupine lokusov
TSA	trihostatin A
VEGF	endotelijski rastni dejavnik
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid
α SMA	specifični alfa aktin za gladke mišične celice
γ -H2AX	fosforiliran histon H2AX

1 UVOD

V današnjem času obstaja izrazita klinična potreba po zdravljenju s celicami, še posebej za regeneracijo tkiv po poškodbah ali odmrtnju, ki so posledica različnih bolezni. Človeške odrasle ali somatske matične celice veliko obetajo, saj izkazujejo velik potencial za uporabo pri regeneraciji različnih vrst tkiv. Trenutni znanstveni interes je usmerjen predvsem v študij biologije in klinične uporabnosti mezenhimskih matičnih celic (MSC). Maščobno tkivo je dober vir mezenhimskih matičnih celic adipoznega tkiva ASC, (ang. *Adipose Stem Cells*). Pomembna biološka značilnost ASC za uporabo v kliniki je njihovo usmerjeno gibanje na mesto poškodbe, izločanje obnovitvenih rastnih dejavnikov, sposobnost diferenciacije v več različnih vrst celic in zaviranje aktivacije imunskih celic (Kokai in sod., 2014). Mezenhimske matične celice, izolirane iz maščevja, imajo podobne lastnosti kot mezenhimske matične celice iz kostnega mozga (BM-MSC), prednost pa je preprostejše pridobivanje ASC z manj rizičnimi kirurškimi postopki (Yarak in Okamoto, 2010). Maščobno tkivo velja tudi za bogat vir matičnih celic, saj ga je na voljo razmeroma veliko (Makridakis in sod., 2013). Zaradi tega so ASC zelo uporabne za celično zdravljenje. Pri tem je pomembno poznati metodo za hitro, natančno in predvsem učinkovito določanje kvalitete ASC za nadaljnjo uporabo v kliničnih celičnih terapijah.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

MSC so multipotentne matične celice, ki se nahajajo v različnih tkivih odraslega človeka, tj. v maščobnem tkivu, popkovnični krvi, možganih, jetrih, pljučih, priželjcu, vranici in placenti. Težavnost njihove izolacije se razlikuje glede na vir tkiva, za maščobno tkivo pa velja, da je ASC moč izolirati na razmeroma enostaven način. Zaradi njihove sposobnosti regeneracije poškodovanega tkiva, protivnetnega in imunomodulacijskega delovanja, enostavne genske modifikacije in uporabe pri alogenskih transplantacijah so MSC potencialno uporabne za zdravljenje različnih bolezni. Razumljivo je, da je za to zelo pomembno zagotoviti MSC ustrezne kvalitete, saj bo le na ta način cilj terapije dosežen in zdravljenje uspešno. Lastnosti, ki jih morajo imeti MSC, so: i) izražanje značilnih površinskih označevalcev, ii) sposobnost diferenciacije v celice mezodermalnega zarodnega sloja in iii) sposobnost samoobnove. V *in vitro* razmerah imajo namreč MSC

tako kot druge normalne somatske celice omejeno življenjsko dobo, kar pomeni, da delitvena sposobnost celic ugasne po določenem številu celičnih delitev in celice preidejo v stanje senescence. Eden izmed pokazateljev kvalitete MSC je njihova sposobnost proliferacije in samoobnove. Zato se pojavlja izrazita potreba po hitri in enostavni metodi za določanje kvalitete MSC.

1.2 CILJ MAGISTRSKEGA DELA

Naš prvi cilj je razvoj hitre in enostavne metode za opredelitev kvalitete MSC, izoliranih iz maščobnega tkiva, in sicer glede na oceno dovzetnosti ASC na inducirano senescenco. Drugi cilj je določanje morebitnih razlik v odzivu ASC na indukcijo senescence glede na anatomsko lokacijo maščevja oziroma izvora celic. V magistrskem delu bomo preizkusili dva sprožitelja senescence: citostatik mitoksantron in inhibitor histonskih deacetilaz trihostatin A (TSA). Cilj dela je določiti njuno sposobnost sproženja senescence in vpliv na stopnjo proliferacije ASC.

1.3 DELOVNI HIPOTEZI

H1: Mitoksantron in TSA znižujeta proliferacijsko sposobnost ASC in povzročita senescenco, ki sovpada s spontano senescenco.

H2: Med linijami ASC različnega anatomskega izvora obstajajo razlike v preostali proliferacijski sposobnosti ASC po sproženi senescenci ter v dovzetnosti ali odpornosti na sproženo senescenco.

Ob potrditvi obeh hipotez lahko sklepamo na večjo ali manjšo uporabnost ASC v kliniki, in sicer glede na njihov izvor ter priporočamo individualiziran odvzem za namene celičnih terapij.

2 PREGLED OBJAV

2.1 MATIČNE CELICE

2.1.1 Splošne značilnosti matičnih celic

Matične celice so nespecializirane celice zarodka ali odraslega človeka, ki imajo dve ključni lastnosti. Prva je velika sposobnost samoobnavljanja, druga pa zmožnost diferenciacije v eno ali več različnih fenotipskih vrst celičnih linij, kar vodi v nastanek funkcionalnih celic v odraslih tkivih (Choumerianou in sod., 2008; Rožman in Jež, 2010).

Po izvoru ločimo tri vrste matičnih celic: embrionalne, odrasle in inducirane pluripotentne matične celice. Embrionalne matične celice (ang. *Embryonal Stem Cells*, ESCs) pri ljudeh izoliramo iz notranje celične mase zarodkov, ki so stari od 5 do 8 dni in so na razvojni stopnji blastociste. Take ESCs imajo pluripotenten diferenciacijski potencial (Cahan in Daley, 2013). Odrasle matične celice najdemo v majhnih količinah v večini tkiv odraslega človeka. Med drugim so to hematopoetske matične celice (ang. *Hematopoietic Stem Cells*, HSCs), endotelijske progenitorske (predniške) celice, mezenhimske matične celice (ang. *Mesenchymal Stem Cells*, MSCs), živčne matične celice, matične celice iz kostnega mozga, placente in popkovnične krvi. Za odrasle matične celice velja, da imajo omejeno proliferativno kapaciteto (Mazzoccoli in sod., 2014). Yamanaka s sodelavci (Takahashi in Yamanaka, 2006) so identificirali okoljske pogoje, ki omogočajo, da se mišje ali humane odrasle celice reprogramirajo *in vitro* v celice, ki so podobne pluripotentnim embrionalnim matičnim celicam. Tako so pridobili inducirane pluripotentne matične celice (ang. *Induced Pluripotent Stem Cells*, iPSCs). To so dosegli z vsiljenim izražanjem ključnih specifičnih genov za pluripotenco (OCT-3/4, SOX2, c-MYC in KLF4) (Takahashi in Yamanaka, 2006).

Matične celice imajo neverjetne sposobnosti razvoja v številne različne celične tipe v človeškem telesu. Glede na diferenciacijski potencial matične celice klasificiramo v štiri kategorije (Yarak in Okamoto, 2010; Choumerianou in sod., 2008):

Preglednica 1: Klasifikacija matičnih celic glede na njihov diferenciacijski potencial (Yarak in Okamoto, 2010; Choumerianou in sod., 2008)

TIP MATIČNE CELICE	OPIS	PRIMER
Totipotentne	Vsaka celica se je sposobna diferencirati v celico katerega koli tkiva, ki tvori človeško telo, vključno s placento in embrionalnimi membranami (ekstraembrionalno tkivo).	Celice iz zgodnjih embrijev (stari 1-3 dni). V naravi so to samo zigota in blastomere, ki nastanejo v zgodnjih celičnih delitvah zarodka do stadija morule (Rožman in Jež, 2010).
Pluripotentne	Celica, sposobna tvoriti vse telesne celice, vključno z germinalnimi zarodnimi celicami. Sposobna se je diferencirati v celice vseh treh embrionalnih plasti (endoderm, ektoderm in mezoderm) (Rožman in Jež, 2010). Celice lahko tvorijo več kot 200 različnih celičnih tipov.	Nekatere celice, ki so prisotne v notranji celični masi blastociste (stare 5-14 dni). Sem spadajo embrionalne matične celice.
Multipotentne	Celice, ki se lahko diferencirajo v različne celične linije iz posamezne embrionalne plasti.	Večina tkivno specifičnih matičnih celic iz odraslih tkiv. Zarodna tkiva, popkovnična in periferna kri, kostni mozeg, maščobno tkivo. Primer: hematopoetske matične celice.
Unipotentne	Celice se lahko diferencirajo v zgolj en tip celic znotraj posamezne embrionalne plasti. Imenujemo jih tudi celice prednice (progenitorji).	Progenitorske epitelne matične celice.

Matična celica se samoobnavlja z nesimetrično delitvijo, pri čemer nastaneta ena njej enaka (identična kopija matične celice) in druga, bolj diferencirana hčerinska celica. Samoobnavljanje torej omogoča vzdrževanje populacije matičnih celic v konstantnem številu (Rožman in Jež, 2010). Pri nesimetrični delitvi pred nastankom bolj diferencirane potomke najprej nastane celica prednica specializiranih tkivnih celic in šele nato iz nje popolnoma funkcionalna celica. Matične celice služijo kot regenerativni sistem v tkivih, saj se lahko »neomejeno« delijo in nato specializirajo ter na ta način nadomestijo druge poškodovane ali okvarjene celice v različnih tkivih in organih (Bongso in Lee, 2005).

Pomembna lastnost matičnih celic je plastičnost. To je sposobnost matičnih celic, da razširijo svoj diferenciacijski potencial ter tako tvorijo tudi celice tkiva drugačnega od tkiva iz katerega izhajajo (Yarak in Okamoto, 2010). Ta celični fenotip je lahko celo drugačnega germinalnega izvora, kar pomeni, da je celica sposobna preskočiti iz ene somatske linije v drugo (npr. iz mezoderma v endoderm) (Rožman in sod., 2007; Horwitz, 2003). Med procese plastičnosti matičnih celic sodijo transdiferenciacija (pretvorba diferencirane celice določene celične linije v diferencirano celico druge celične linije), dediferenciacija (pretvorba odrasle celice v manj diferencirano matični podobno celico) in rediferenciacija (pretvorba dediferencirane celice v odraslo celice iste ali druge celične linije) (Estrov, 2009).

Zaradi teh značilnosti so matične celice idealne za uporabo v regenerativni medicini, za tkivno inženirstvo ter celične transplantacije. Pravilo, ki pri tem velja, se glasi: bolj sorodno kot je izvorno tkivo matičnih celic tkivu, ki ga zdravimo, bolj učinkovita je diferenciacija matičnih celic v tarčno tkivo (Centeno, 2014). Na tej osnovi se razvijajo zdravljenja določenih degenerativnih, presnovnih, prirojenih in rakastih bolezni ter mehanskih poškodb tkiv in organov (Rožman in sod., 2007).

2.1.2 Mezenhimske matične celice

MSC ali multipotentne odrasle celice so bile prvič izolirane iz kostnega mozga pred skoraj 40 leti. Friedenstein je s sodelavci (1968) ugotovil, da so MSC v kostnem mozgu komponenta populacije stromalnih celic, ki podpirajo obstoj in diferenciacijo hematopoetskih matičnih celic. Danes pa je znano, da se MSC v majhnem številu nahajajo v skoraj vseh odraslih tkivih, med drugim v maščobnem tkivu, popkovnični krvi, možganih, jetrih, pljučih, timusu, vranici in placenti (Kang in sod., 2010; Najimi in sod., 2007; Lama in sod., 2007; Wang in sod., 2004; Zuk in sod., 2002). V tkivih imajo aktivno vlogo pri ohranjanju tkivne homeostaze.

Z namenom, da bi definirali značilnosti MSC neodvisno od tipa tkiva in razmer gojenja, kar bi omogočilo primerjavo rezultatov med raziskovalnimi skupinami, je Mednarodno

združenje za celično zdravljenje (ang. *International society for cellular therapy*, ISCT) predlagalo seznam minimalnih kriterijev za definicijo MSC (Dominici in sod., 2006):

- celice so adherentne in se pritrde na plastično podlago pri standardnih razmerah gojenja;
- celice izražajo označevalce CD105, CD73 in CD90 ($\geq 95\%$ pozitivno) in ne izražajo CD45, CD34, CD14 ali CD11b, CD79a ali CD19 ter površinskih označevalcev HLA-DR ($\leq 2\%$ pozitivno);
- celice so se v razmerah *in vitro* sposobne diferencirati v adipogene (tvorijo maščevje), hondrogene (tvorijo hrustanec) in osteogene (tvorijo kost) celice.

Glede na dejstvo, da je možno MSC izolirati iz vrste odraslih tkiv in jih diferencirati v razna tkiva (Stewart M. in Stewart A., 2011), se študije MSC osredotočajo na kontrolo njihovega diferenciacijskega potenciala. MSC so sposobne diferenciacije v tkiva, ki vsebujejo celice iz vseh treh zarodnih plasti, vključno z adipociti, osteociti, miociti (mezoderm), hepatociti (endoderm) in živčnimi celicami ali nevroni (ektoderm) (Najimi in sod., 2007; Furno in sod., 2013; Li in Ikehara, 2013).

Poleg izjemnih diferenciacijskih lastnosti MSC izločajo tudi številne bioaktivne molekule, ki delujejo imunomodulacijsko, antiapoptotsko, antifibrotsko, angiogeno in mitotsko (Motaln in sod., 2012; West in sod., 2014). Posledično MSC izjemno veliko obetajo pri vrstah zdravljenja različnih obolenj, kot so kardiovaskularne, nevrodegenerativne in avtoimunske bolezni. Tri glavne značilnosti MSC so tako povezane prav z njihovimi terapevtskimi učinki: (a) nadomeščanje poškodovanega tkiva s pomočjo multipotentne diferenciacije, (b) imunomodulacijski in protivnetni učinki ter (c) izločanje molekul, ki sprožijo ali pomagajo pri procesu obnove poškodovanega tkiva (t.i. parakrina aktivnost). Prav tako imajo izjemno lastnost pomnoževanja v kulturi *in vitro*, s čimer lahko zagotovimo zadostno število MSC za klinično uporabo. Poleg tega so MSC nizko imunogene, kar lahko najverjetneje pripišemo odsotnosti izražanja površinskega označevalca HLA-DR in zmanjšanemu izražanju površinskega označevalca HLA-I. Posledica tega je, da ni potrebe po HLA ujemanju, kar še povečuje njihovo uporabnost pri transplantacijah (povzeto po Lavoie in Rosu-Myles, 2013).

2.2 MEZENHIMSKE MATIČNE CELICE IZ MAŠČEVJA (ASC)

2.2.1 Maščobno tkivo

Maščobno tkivo oziroma maščevje količinsko prevladuje med tkivi v človeškem telesu. V splošnem ga najdemo v podkožnem rahlem vezivnem tkivu, obdaja pa tudi notranje organe. Odrasle maščobne celice (adipociti) predstavljajo večino celic v maščobnem tkivu. Poleg teh maščevje vsebuje tudi nekatere druge vrste celic, vključno s stromalno-vaskularnimi celicami kot so fibroblasti, gladko-mišične celice, periciti, endotelijske celice, monociti, limfociti, adipogene predniške (progenitorske) celice in mezenhimske matične celice (ASC) (Niemelä in sod., 2008).

Pri sesalcih maščobno tkivo tipično razdelimo po morfološkem videzu na belo maščobno tkivo (BMT) in rjavo maščobno tkivo (RMT). BMT je primarno tkivo za shranjevanje energije, ki ga povečini sestavljajo adipociti, ki vsebujejo unilokularno¹ maščobno kapljico in jedro na obrobju celice. BMT energijo skladišči v obliki trigliceridov (estri maščobnih kislin in glicerola), nahaja pa se visceralno (v trebušni votlini) in subkutano (pod kožo) (Sanchez-Gurmanches in Guertin, 2013). Poleg shranjevanja energije je pomembna tudi endokrina funkcija BMT, saj izloča hormone in citokine (na primer leptin in adiponektin), ki uravnavajo prehranjevanje, metabolizem in imunski odgovor (Cristancho in sod., 2011). BMT je maščobno tkivo, ki vsebuje ASC in jih lahko iz njega izoliramo. Celice RMT na drugi strani porabljajo skladiščeno energijo in v primeru padca temperature telesa pod vrednostjo, ki je uravnavana v hipotalamusu, generirajo toploto v procesu t.i. prilagoditvene termogeneze (Sanchez-Gurmanches in Guertin, 2013).

Maščevje je mezodermalnega izvora in je pomemben vir odraslih matičnih celic. ASC imajo podobne lastnosti kot MSC, ki so izolirane iz kostnega mozga. Njihova prednost za uporabo v kliniki pa je dosti bolj preprosta izolacija ASC z manj rizičnimi kirurškimi postopki (Yarak in Okamoto, 2010). Maščobno tkivo je tudi lahko dostopno in ga je za

¹ Unilokularno pomeni, da se maščobna kapljica nahaja v enem samem in obenem edinem takem predelu celice.

namene izolacije ASC ponavadi dovolj pri vseh posameznikih z zdravo telesno težo (West in sod., 2014).

2.2.2 Splošne značilnosti ASC

Za fenotip ASC velja, da izražajo naslednje označevalce mezenhimskih matičnih celic (CD90+, CD73+, CD105+, CD44+, CD45-, CD31-). Po izražanju označevalcev CD36+ in CD106- se razlikujejo od MSC, izoliranih iz kostnega mozga (Bourin in sod., 2013) (Pregl. 2).

Preglednica 2: Molekularni fenotip ASC (povzeto po Cheng in sod., 2011 ter Han-Tsung in Chien-Tzung, 2014)

Prisotnost (+) označevalca in genov pri ASC	Odsotnost (-) označevalca in genov pri ASC
CD13	CD31
CD29	CD34
CD36	CD45
CD44	CD106
CD49	CD117
CD73	CD133
CD90	HLA-DR
CD105	STRO-1
CD166	Lin
Fibronektin	HLA II
α SMA	
Vimentin	
Kolagen-I	

α SMA = specifični alfa aktin za gladke mišične celice; HLA = človeški levkocitni antigen.

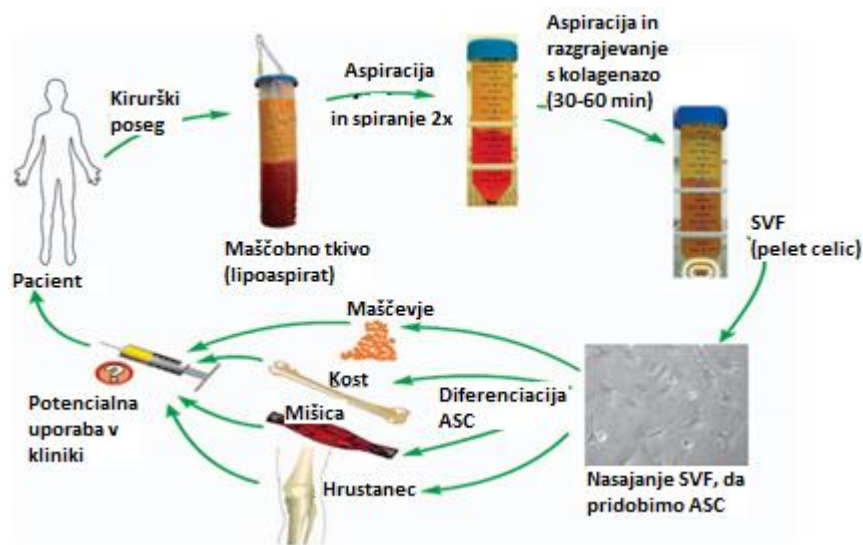
ASC ohranjajo značilnosti matičnih celic tudi v dalj časa trajajoči rasti v kulturi *in vitro* (Rodriguez in sod., 2004). *In vitro* so ASC po prenosu v rastno gojišče morfološko podobne mezenhimskim matičnim celicam, ki so pridobljene iz kostnega mozga ali drugih tkiv. V primerjavi z MSC iz kostnega mozga je izolacija ASC lažja. ASC lahko gojimo dlje časa, preden se po določenem številu celičnih delitev proliferacijske sposobnosti celic spremenijo in ASC preidejo v senescenco (Lavoie in Rosu-Myles, 2013).

2.2.3 Izolacija in diferenciacija ASC

Maščobno tkivo je sestavljeno iz različnih celičnih populacij. Z uporabo standardne metode razgrajevanja maščobnega tkiva s kolagenazo tipa I, čemur sledi centrifugiranje celične suspenzije, pridobimo oborino, ki jo imenujemo stromalna vaskularna frakcija (SVF). Pri raziskavah matičnih celic iz maščevja tej frakciji pripisujejo velik pomen, kajti prav ta predel poleg krvnih celic, fibroblastov, pericitov in endotelijskih celic vsebuje tudi multipotentne MSC (Cheng in sod., 2011).

ASC je možno izolirati iz katere koli vrste BMT. Liposukcija velja za varen in v veliki meri sprejemljiv poseg za izolacijo ASC. Čeprav je lipoaspirat² izpostavljen določenim mehanskim silam med aspiracijo, raziskave kažejo, da ostane 98-100 % celic v lipoaspiratu viabilnih. Postopek izolacije ASC iz lipoaspirata se prične z obilnim spiranjem lipoaspirata in lizo rdečih celic (Sl. 1). Plavajoče oziroma lebdeče maščobno tkivo nato izpostavimo kolagenazi, ki razgradi izvencelični matriks. Tako dobljeno suspenzijo celic nato filtriramo in centrifugiramo. Tako pridobimo SVF, ki vsebuje mešano populacijo stromalnih celic (endotelijske celice, celice gladkih mičic, pericite, fibroblaste, levkocite, hematopoetske matične celice), med katerimi so tudi ASC. Številni avtorji za poskuse uporabljajo celotno neočiščeno stromalno vaskularno frakcijo na podlagi dejstva, da so ASC adherentne celice in se zato prilepijo na plastično podlago ter posledično same izločijo iz SVF med *in vitro* gojenjem. Kljub temu so danes na voljo številne tehnike prečiščevanja SVF in selekcije ASC, ki jih raziskovalci s pridom izkoriščajo (Locke in sod., 2009).

² Lipoaspirat ali liposukcijski aspirat. Z aspiracijo oziroma izsesavanjem pridobljeno tkivo.



Slika 1: Shema izolacije in diferenciacije ASC za uporabo v kliniki (povzeto po Locke in sod., 2009: 237)

Kirurški izrez je metoda pridobivanja maščobnega tkiva, ki se pogosto uporablja pri raziskavah ASC. Vzorce podkožnega maščobnega tkiva kirurg pridobi tekom operacije. Za izolacijo ASC se koščkom maščobnega tkiva (mehansko) izreže fibrozno tkivo in krvne žile. Pridobljene koščke maščobnega tkiva se nato zmelje na koščke premera 1-4 mm. Temu sledi razgrajevanje z encimom kolagenazo in spiranje v slani fosfatni puferski raztopini (ang. *Phosphate Buffer Saline*, PBS) (Schreml in sod., 2009). Z dodatkom seruma govejega zarodka (ang. *Fetal Bovine Serum*, FBS) se inaktivira delovanje kolagenaze, čemur sledi centrifugiranje. Oborino celic se nato spere s pufrom za odstranjevanje eritrocitov in celice ponovno centrifugira. Tako pridobimo celični izolat ASC, ki ga nasadimo v gojilne posode (Mahmoudifar in Doran, 2010).

Razvijajo pa se tudi vedno nove metode izolacije ASC. Eno takih je opisal Ghorbani s sodelavci (2014), ki je razvil ne-encimatsko metodo izolacije ASC, ker so slabosti konvencionalne encimatske metode visoki stroški, zamudnost in izolacija heterogenega SVF. Encimsko oziroma proteolizno razgrajevanje izvenceličnega matriksa naj bi namreč povzročalo poškodbe celic in negativno vplivalo na njihovo proliferacijo ter diferenciacijo. Z ne-encimatsko metodo izolacije ASC se majhne koščke maščobnega tkiva, pridobljenih z liposukcijo, prenese v gojilne posode, kjer se jim doda FBS ter se jih inkubira preko noči. V gojilno posodo se nato doda gojišče DMEM (Dulbeccovo modificirano gojišče) s FBS. Po nekaj dneh fibroblastom podobne celice migrirajo iz preostalega tkiva in se prično hitro

deliti. Preden postanejo konfluentne, jih je treba presaditi. Po treh pasažah je možno opraviti imunofenotipizacijo ter testirati njihov diferenciacijski potencial. Tudi ASC, izolirane z ne-encimatsko metodo, so pluripotentne ter zmožne diferenciacije v adipocite in osteoblaste. Prednost te metode je velik izkoristek, homogenost izoliranih celic, hitrost postopka in nizki stroški (Ghorbani in sod., 2014).

In vitro so se ASC zmožne diferencirati v zelo različne vrste celic. Znano je, da se diferencirajo v celice mezenhimskega izvora, kot so adipociti, hondrociti, osteociti in celice skeletnih mišic. Predhodne študije optimizacije rastnih gojišč, ki jih uporabljamo za gojenje ASC, so pokazale, da večina uspešnih gojišč vsebuje visoke koncentracije Ca^{2+} ionov, ki vzpodbudijo ali povečajo diferenciacijo ASC. Poleg zgoraj naštetega se lahko ASC diferencirajo tudi v endotelijske celice in makrofage (Yarak in Okamoto, 2010) ter v celice, ki ne izhajajo iz mezodermalne linije, temveč iz ostalih dveh zarodnih slojev, tj. endodermalnega in ektodermalnega (hepatociti, endokrine celice trebušne slinavke, živčne celice, kardiomiociti in vaskularne endotelijske celice) (Zuk in sod., 2002; Kim in sod., 2009; Cao in sod., 2005; Gomillion in Burg, 2006; Seo in sod., 2005). Temu dogodku rečemo tudi navzkrižna diferenciacija (ang. *cross-differentiation*) (Ning in sod., 2006). V kliniki so zato ASC uporabne za številna regenerativna zdravljenja (Yarak in Okamoto, 2010; Kološa in sod., 2015).

2.2.4 Uporaba ASC v regenerativni medicini

V kliniki narašča potreba po razvoju celičnih terapij za zdravljenje in regeneracijo tkiv po poškodbi ali odmrtnosti kot posledica različnih bolezni ali poškodb. Zaradi svojih lastnosti imajo ASC številne možnosti za uporabo pri regenerativnih zdravljenjih mehanskih poškodb, v bolezenskih stanjih kot so nevrodegenerativne bolezni, npr. Parkinsonova in Alzheimerjeva bolezen, pri poškodbah hrbtenjače, boleznih srca in pri revmatoidnem artritisu. Prav tako so zelo uporabne za nadomeščanje izgubljenega tkiva kot posledice poškodb ali odstranitve tumorja (Kokai in sod., 2014; Motaln in sod., 2010, Tajnšek in sod., 2013).

Sekretom ASC obsega številne rastne dejavnike, citokine, molekule izvenceličnega matriksa in proteaze ter hormone (Motaln in Lah Turnšek, 2015; Motaln in sod., 2012). Mnogi izmed proteinov, ki jih izločajo ASC, imajo sposobnost regeneracije tkiva. Primeri so vaskularni endotelijski rastni dejavnik (VEGF), hepatocitni rastni dejavnik (HGF) in transformacijski rastni dejavnik β (TGF- β), ki spodbujajo angiogenezo in celjenje ran ter tako morebiti pripomorejo k rasti ali razvoju novega tkiva. Citokina prostaglandin E2 (PGE2) in interleukin 10 (IL-10) zavirata imunski odziv, zmanjšujeta vnetje in posledično nastanek granuliranega tkiva (Kapur in Katz, 2013; Salgado in sod., 2010; Hampel in sod., 2013; De Vasconcellos Machado in sod., 2013). Pomembna značilnost ASC je tudi njihova sposobnost migracije na mesto poškodbe (Stienstra in sod., 2011; Barry in Murphy, 2004). Natančen mehanizem, ki nadzoruje ter usmerja proces migracije ASC in kolonizacije poškodovanega tkiva, še ni v celoti raziskan. Znano je, da imajo ASC površinske receptorje za rastne dejavnike, kot je epidermalni rastni dejavnik (EGF), ki ga izloča poškodovano tkivo ter deluje kot kemoatraktant (Baer in sod., 2009). Zaradi teh značilnosti so ASC zelo uporabne za zdravljenje, zato je pomembno, da bi lahko hitro, natančno in učinkovito določili njihovo kvaliteto za nadaljnjo uporabo.

2.3 SENESCENCA CELIC

Senescenca je stanje, v katerem se celice ne delijo več oziroma ne proliferirajo, ostanejo pa metabolno aktivne in pričnejo izražati drugačen fenotip. Proces senescence se deli na i) replikativno (tj. spontano) senescenco in ii) s stresom sproženo prezgodnjo senescenco.

i) Pred dobrimi petdesetimi leti je Leonhard Hayflick odkril, da je število celičnih delitev za celice v kulturi omejeno (Hayflick in Moorhead, 1961) – po približno 40-ih do 60-ih delitvah stopnja proliferacije prične upadati, vse dokler v celicah ne nastopi senescenca. Krajšanje telomer je bil prvi predlagan mehanizem, ki naj bi bil odgovoren za replikativno senescenco celic. Ta fenomen je prisoten v vseh somatskih celicah v kulturi, ki niso imortalizirane (Schellenberg in sod., 2011). Hayflickovo limito tako definiramo kot število delitev v populaciji celic do trenutka, ko se celične delitve ustavijo.

ii) S stresom sprožena prezgodnja senescenca v celicah je rezultat različnih mehanizmov. Med drugim jo povzročajo poškodbe genomske in mitohondrijske DNA, aktivirani onkogeni, nukleolarna disfunkcija, spremembe pri prevajanju RNA, epigenetske spremembe, nepravilnosti v avtofagiji in spremembe v izražanju miRNA (Beltrami in sod., 2011).

Pojav replikativne senescence pogosto povezujejo s kopičenjem številnih celičnih okvar. Pomemben sprožitelj replikativne senescence je progresivno krajšanje telomer ali spremenjenih telomernih struktur (Schellenberg in sod., 2011). Telomere so sestavljene iz tandemskih ponovitev zaporedij TAG, ki so povezane s proteinskim kompleksom šelterinom oz. telosomom (Blasco, 2007). Poleg telomer se nahajajo subtelomerne regije, ki so prav tako bogate s ponavljajočimi se zaporedji DNA. Za telomere sesalcev je značilna prisotnost nukleosomov s histonskimi modifikacijami na heterokromatinskih domenah. Poleg tega je subtelomerna DNA visoko metilirana. Prav te modifikacije kromatina onemogočajo pravilno delovanje DNA polimeraze in rekombinacijov telomer, kar vodi v krajšanje telomer (Bennetti in sod., 2007). Ko telomere ne zmorejo več opravljati svoje funkcije, tj. zaščita koncev kromatid na kromosomih, to izzove popravljalne mehanizme za poškodbe DNA. Posledično celica zazna dvoverižne prelome

DNA, zaustavi napredovanje celičnega cikla in jih (v primeru, da je to mogoče) popravi. Kadar celica poškodb DNA ne zmore popraviti, celice preide v apoptozo ali senescenco. Dejavniki, ki določajo različen izid, ostajajo v veliki meri nepojasneni, znani pomembni dejavniki pa so vrsta celice, intenzivnost, trajanje ter narava poškodbe. V primeru skrajšanih telomer celica ostane v G1 fazi, se preneha podvojevati in nato preide v senescentno stanje (Deng in sod., 2008; Martinez in sod., 2009; d'Adda di Fagagna in sod., 2003; Takai in sod., 2003; Herbig in sod., 2004).

2.3.1 Značilnosti senescentnih celic

Procesi, ki definirajo senescentne celice, so trajna prekinitev podvojevanja, odpornost na apoptozo, spremenjen vzorec izražanje genov in izražanje označevalcev, ki so značilni (vendar ne izključno) za celice v senescentnem stanju (Sharpless in Dephino, 2007; Lawless in sod., 2010). Glavna značilnost senescentnih celic je nesposobnost nadaljevanja celičnega cikla (Beltrami in sod., 2011).

V fazi, ko se senescentne celice prenehajo podvojevati, vsebujejo DNA v obliki, ki je značilna za fazo G₁, pri čemer so celice še vedno metabolno aktivne (Di Leonardo in sod., 1994; Herbig in sod., 2004). V nasprotju s kviescenco³ je vzrok za zaustavitev podvojevanja pri senescentnih celicah prisotnost inhibitorjev celičnega cikla ter dejstvo, da je ta zaustavitev trajna, tj. ireverzibilna (Itahana in sod., 2004).

Za senescentne celice je značilna tudi spremenjena morfologija. Senescentne celice ne tvorijo goste kulture, so povečane, imajo sploščen videz in pogosto jedro nepravilne oblike ter zrnato citoplazmo. Večja velikost celice sovpada s povečanjem velikosti jedra. V citoplazmi se nahajajo številne vakuole, povečano je število citoplazemskih mikrofilamentov, prisotni so veliki lizosomi in izrazit Golgijev aparat (Zhao in sod., 2010).

³ Kviescenca je stanje celic v celičnem ciklu, v katerem so le-te neaktivne in počivajo. V tem obdobju, ki ga imenujemo tudi G₀ faza celičnega cikla, se celice ne delijo, niti se ne pripravljajo na delitev. Za razliko od senescence je kviescenca reverzibilna. Celice, ki so v stanju replikativne oziroma spontane senescence, so kviescentne.

Za določanje senescentnih celic lahko uporabimo številne označevalce, čeprav noben ni izključno značilen le za senescentno stanje celic. Prvi odkriti označevalec za senescenco je bilo povečano izražanje s senescenco povezane β -galaktozidaze (SA- β -gal). Povišana aktivnost tega encima je posledica povečanega lizosomskega predelka, ki se pogosto pojavlja v celicah v senescentnem stanju (Dimri in sod., 1995).

Apoptoza predstavlja tako odziv na celični stres kot tudi pomemben tumor-supresorski mehanizem, s pomočjo katerega lahko organizem hitro odstrani poškodovane celice. Številne vrste celic v senescenci pridobijo sposobnost odpornosti na apoptotske signale, kar upravičuje njihovo veliko stabilnost v kulturi ter akumulacijo med staranjem kulture in organizma (Chen in sod., 2000; Hampel in sod., 2004). Mehanizmi, ki omogočajo odpornost senescentnih celic na apoptozo, so žal slabo poznani (Campisi, 2007; d'Adda di Fagagna in sod., 2007). Vrsta celic, narava in razpon poškodb ali stresa so dejavniki, ki bi lahko bili vpleteni v uravnavanje senescence na eni ali apoptoze na drugi strani. Z manipulacijo pro- ali anti-apoptotskih signalov je možno spodbuditi celice, ki težijo k apoptozi, da vstopijo v senescenco in obratno (Seluanov in sod., 2001; Rebba in sod., 2003). Dejstvo je, da signalne poti senescence in apoptoze vsebujejo skupen regulacijski protein, tj. tumor-supresorski protein p53. Slednji lahko v različnih celicah ali v različnih razmerah prednostno aktivira gene, ki zaustavijo proliferacijo in vodijo v senescenco ali gene, ki spodbujajo apoptozo (Jackson in Pereira-Smith, 2006).

Za senescentne celice so značilne spremembe v izražanju nekaterih molekul mikroRNA, ki jih imenujemo s senescenco povezane miRNA (SA-miRNA). Te med drugim uravnavajo prepisovanje genov, ki so vključeni pri procesih preživetja in apoptoze (Lafferty-Whyte in sod., 2009). Specifično lahko molekule SA-miRNA utišajo tudi signalne poti apoptoze z regulacijo proteina BRE, ki se veže in inhibira FAS- ter TNF α -receptorje (Gu in sod., 1998; Li in sod., 2004), kot tudi proteina c-FLIP, ki inhibira adaptorski protein FADD (Irmeler in sod., 1997).

Molekularne označevalce, ki so značilni za celice v senescenci, predstavljajo geni celičnega cikla kot tudi geni za različne sekrecijske proteine (Gonos in sod., 1998; Shelton in sod., 1999; Semov in sod., 2002; Pascal in sod., 2005). Senescentne celice imajo

povečano izražanje inhibitorjev od ciklina odvisnih kinaz (CDKIs) p21^{WAF1}, p16^{INK4A} (Rogan in sod., 1995) in/ali p27^{KIP1} (Zhao in sod. 2010). Njihovo prekomerno izražanje povzroči zmanjšano proliferacijo senescentnih celic. Na te inhibitorje lahko vpliva tumor supresorski protein p53 ter protein retinoblastoma (pRB) (Rogan in sod., 1995; Dumont in sod., 2000). Senescentne celice imajo tudi zmanjšano izražanje genov za proteine, ki pospešujejo napredovanje celičnega cikla, tj. c-FOS, ciklin A, ciklin B in PCNA (Seshadri in Campisi, 1990; Stein in sod., 1991; Pang in Chen, 1994; Narita in sod., 2003). Proteini, ki se izločajo, se v senescentnih celicah lahko povečano izražajo, kot je to v primeru encimov, ki razkrajajo izvencelični matriks, vnetnih citokinov in rastnih dejavnikov. Ti lahko vplivajo na vedenje sosednjih celic ali celo oddaljenih celic znotraj tkiv in tako spodbujajo kronično preoblikovanje tkiva in/ali lokalna vnetja. To značilnost senescentnih celic imenujemo tudi s senescenco povezan sekrecijski fenotip (Shelton in sod., 1999; Coppe in sod., 2008).

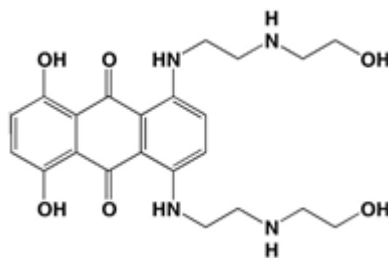
Senescentne celice izražajo tudi citološke označevalce, ki so značilni za odgovor na poškodbe DNA, še posebej fosforiliran histon H2AX (γ -H2AX). Druge značilne spremembe jedrnega kromatina so izstopajoča prisotnost s senescenco povezane heterokromatinske skupine lokusov (SAHFs). Ti so v velikem številu prisotni na histonu H3, ki je modificiran na lizinu 9 (K9M H3) in na njegovem vezavnem partnerju heterokromatin proteinu 1 (HP1) (Zhao in sod., 2010). Drugi citološki označevalec je prisotnost s senescenco povezane skupine lokusov poškodovane DNA (SDFs). Kadar so SDFs posledica disfunkcionalnih telomer, jih imenujemo tudi s telomerami inducirane disfunkcionalne skupine lokusov (TIFs) (Narita in sod., 2003; Di Micco in sod., 2008; Herbig in sod., 2004).

Kljub vsem naštetim lastnostim senescentnih celic je pomembno poudariti, da je izmed vseh biooznačevalcev za celice v senescenci najbolj značilna spremenjena celična morfologija in indukcija aktivnosti s senescenco povezane β -galaktozidaze. Slednjo obravnavamo tudi kot prelomnico v preučevanju celične senescence (Zhao in sod., 2010).

2.3.2 Sprožitelja senescence mitoksantron in trihostatin A (TSA)

Za sprožanje stanja senescence v mezenhimskih matičnih celicah, izoliranih iz maščevja, lahko uporabimo različne pristope. Zhao in sod. (2010) so senescenco v celicah sprožili tako, da so jih izpostavili nizkim koncentracijam mitoksantrona in trihostatina A (TSA) (Zhao in sod., 2010).

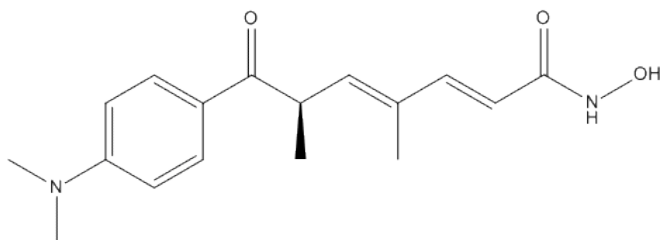
Mitoksantron (5,8-bis[2-(2-hidroksietilamino)etil-amino] antracen-1,4,9,10-tetrol) (Sl. 2) je učinkovina iz razreda antracenedionov, ki ima protitumorsko, citostatsko in citotoksično aktivnost. Deluje tako, da se veže na dvoverižno DNA z interkalacijo ter inhibira DNA topoisomerozo II. S tem onemogoči ligacijo DNA, kar vodi v nastanek eno- in dvoverižnih prelomov DNA (kar dokazuje prisotnost γ -H2AX). Mitoksantron povzroča zastoj cikla v fazah G₁ (Kapuscinski in Darzynkiewicz, 1986) in G₂ (Khan in sod., 2010). V kliniki se uporablja za zdravljenje raka jajčnikov in jeter, raka dojke, limfoma in levkemije. Protitumorska aktivnost mitoksantrona izhaja iz oblikovanja močnih kompleksov z nukleinskimi kislinami, sproženja poškodb DNA, inhibicije topoisomeroze in podvojevanja ter prepisovanja DNA (Bhattacharyya in sod., 2014).



Slika 2: Struktura mitoksantrona (Bhattacharyya, 2014: 2)

Trihostatin A (TSA, 7-[4-(dimetilamino)fenil]-N-hidroksi-4,6-dimetil-7-oksohepta-2,4-dienamid) (Sl. 3) je inhibitor histonskih deacetilaz (HDACI) razreda I in II, ki v celicah sproža senescenco preko aktivacije inhibitorjev celičnega cikla, kot je p16/INK4 (Rebbaa in sod., 2006). TSA spreminja izražanje genov z inhibicijo odstranjevanja acetilnih skupin s histonov, kar otežuje DNA molekulam zvižanje v nativno strukturo kromatina. Posledično onemogoči vezavo transkripcijskih faktorjev na DNA zaporedje v kromatinu. Ker TSA deluje le na deacetilacijo histonov, ob njegovem delovanju za razliko od

mitoksantrona ne pride do nastanka dvoverižnih prelomov DNA. Dandanes je o mehanizmih epigenetskih modifikatorjev, kot je TSA, ki privedejo do zaustavitve celičnega cikla, še vedno zelo malo znanega (Saini in sod., 2014).



Slika 3: Struktura trihostatina A (Hutt in sod., 2010: 17)

3 MATERIAL IN METODE

3.1 KEMIKALIJE IN LABORATORIJSKA OPREMA

3.1.1 Kemikalije

Preglednica 3: Seznam uporabljenih kemikalij

Okrajšava	Celo ime	Proizvajalec	Kataloška številka
DMEM gojišče	Dulbeccovo modificirano gojišče (ang. <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>), 1x	Sigma-Aldrich, ZDA	D5921
L-glu	L-glutamin, 200 mM	PAA Laboratories, Avstrija	M11-006
P/S	Penicilin/Streptomycin 100x	PAA Laboratories, Avstrija	P11-010
FBS	Serum govejega zarodka (ang. <i>Fetal bovine serum</i>)	Sigma-Aldrich, ZDA	F7524
Trypsin	Trypsin-EDTA, 0,25 %, 1x	Gibco Invitrogen	25200-056
PBS 10x	Slana fosfatna puferska raztopina (ang. <i>Phosphate Buffered Saline</i>), 10x	PAA Laboratories, Avstrija	H15-011
Tripansko modrilo	Tripansko modrilo (ang. <i>Trypan Blue Solution</i>)	Sigma-Aldrich, Nemčija	T8154
DMSO	Dimetil sulfoksid, $\geq 99,9$ %, (ang. <i>Dimethyl Sulfoxide</i>)	Sigma-Aldrich, ZDA	D2438
Glutaraldehyd	Glutaraldehyd (ang. <i>Glutareldehyde solution</i>)	Sigma-Aldrich, ZDA	G5882
X-gal	5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid	Sigma-Aldrich, ZDA	B4252
Citronska kislina/ NO_2HPO_4	Citronska kislina/Natrijev fosfat	Sigma-Aldrich, ZDA	
$\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6) \times 3\text{H}_2\text{O}$	Kalijev heksacianoferat(II) trihidrat, 100 mM	Sigma-Aldrich, ZDA	455989
$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$	Kalijev heksacianoferat(III), 100 mM	Sigma-Aldrich, ZDA	P8131
NaCl	Natrijev klorid, 5 M, (ang. <i>Sodium chloride</i>)	Emsure, Merck KgaA, Nemčija	K43390104218
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Magnezijev klorid heksahidrat, 1 M, (ang. <i>Magnesium chloride hexahydrate</i>)	Sigma-Aldrich, ZDA	63068

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 3. Seznam uporabljenih kemikalij

Okrajšava	Celo ime	Proizvajalec	Kataloška številka
dH ₂ O	Destilirana voda	NIB	
Barvilo Hoechst	Raztopina Hoechst 33342	Gibco, UK	62249
poly-L-Lys	poli-L-Lizin (ang. <i>poly-L-lysine</i>), 5 mg/mL oz. 400 µg/mL	Sigma-Aldrich, ZDA	P4707
TSA	Trihostatin A (ang. <i>Trichostatin A</i>), 5 mM	Sigma-Aldrich, ZDA	T1952200UL Lot: 070M4004
Mitoksantron	Mitoksantron dihidroklorid (ang. <i>Mitoxantrone dihydrochloride</i>)	Sigma-Aldrich, ZDA	M6545-10MG Lot: 011M1240V
EtOH	70 % alkohol - etanol	NIB	
Kolagenaza I	Kolagenaza I	Gibco, UK	17100-017
NH ₄ Cl	Amonijev klorid (ang. <i>Ammonium chloride</i>)	Sigma-Aldrich, ZDA	A9434
EDTA	Etilendiaminotetraoetna kislina (ang. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)	Sigma-Aldrich, ZDA	E5134-250G
NaHCO ₃	Natrijev hidrogen karbonat (ang. <i>Sodium hydrogen carbonate</i>)	Riedel-de Haen, ZDA	S5791

3.1.2 Laboratorijska oprema

Preglednica 4: Seznam uporabljene laboratorijske opreme

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Inkubator s 5 % CO ₂ , 37 °C	Sanyo Electric, Japonska
Brezprašna celična komora	Iskra Pio, Slovenija
Centrifuga PLC-322	Tehtnica Železniki, Slovenija
Centrifugirke (15 mL)	Corning, ZDA
Centrifugirke (50 mL)	Corning, ZDA
Digestorij	Kötterman, Nemčija
Zamrzovalnik (-20 °C)	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-80 °C)	Angelantoni Scientifica, Belgija
Svetlobni mikroskop BF-DSSS	Reichert, ZDA
Fluorescentni mikroskop ECLIPSE E800	Nikon, Japonska
Avtomatske pipete (0,5-10 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 1000-5000 µL)	Biohit, Finska
Nastavki za pipete	Costar, ZDA
Epruvete za zamrzovanje celic (2 mL)	Corning Incorporated, ZDA
Ploščate platenke (25 cm ²)	Corning Incorporated, ZDA
Gojilne posode s 96 vdolbinami	Corning Incorporated, ZDA
Gojilne posode s 24 vdolbinami	Corning Incorporated, ZDA
Objektna stekelca	Surgipath, UK

Se nadaljuje

Nadaljevanje preglednice 4. Seznam uporabljene laboratorijske opreme

Laboratorijska oprema	Proizvajalec
Hemocitometer	Blau Brand, Nemčija
Krovna stekelca	Glasswarenfabrik Karl Hecht KG, Nemčija
Stresalnik MS 3 digital	IKA, ZDA
Čitalec posod s 96 vdolbinami	Synergy MX, BioTek, ZDA
Vodna kopel (37°C)	The Precision Scientific, Indija
Vacuboy	IBS Integra Bioscience, Švica
Stripete	GENios, Švica

3.2 CELIČNE LINIJE

3.2.1 Človeške mezenhimske matične celice iz maščevja

Vse vzorce maščevja smo prejeli od Simed zdravstva (Zdravstveni center Simed, Ljubljana, dr. Aleš Leskovšek). Študijo je potrdila etična komisija s številko dovoljenja 134/01/11. Vzorci so bili pridobljeni s kirurškim izrezom na različnih anatomskih lokacijah od anonimnih donorjev z njihovo privolitvijo. Izolacija ASC je potekala po predpisanih standardnih postopkih (Mahmoudifar in Doran, 2010) z manjšimi prilagoditvami. Vzorce maščobnega tkiva smo sprali s PBS, razrezali na manjše koščke in jih nato izpostavili 0,1 % kolagenazi I (Gibco, UK). Razgrajevanje je potekalo 1 uro pri temperaturi 37 °C ob močnem tresenju. Po 1 uri smo zaustavili delovanje kolagenaze I z dodatkom FBS ter vzorce centrifugirali 10 minut pri 300 g. Zbrane celice smo sprali s pufrom (0,15 M NH₄Cl; 0,1 mM EDTA; 0,01 M NaHCO₃; pH 7,2-7,4), da smo odstranili eritrocite ter vsebino ponovno centrifugirali 10 min pri 300 g. Izolirane celice smo nasadili z gostoto 3-10x 10⁴/cm² na gojišče za ASC z 20 % FBS z dodatkom penicilin/streptomicina 100x, 2 mM L-glutamin. Tako smo vzpostavili kulturo ASC na začetni pasaži (pasaža 0). Celicam smo dvakrat tedensko menjavali gojišče in jih presajali po dosegu 80-90 % konfluence.

V poskusih smo uporabili 8 različnih linij ASC, izolirane iz maščevja treh anatomskih lokacij – stegno, boki in trebuh. Celične linije, ki so bile predstavnice ASC iz maščobnega tkiva posamezne telesne lokacije, so predstavljene v Pregl. 5.

Preglednica 5: Seznam uporabljenih celičnih linij

STEGNO	BOKI	TREBUH
ASC-T1	ASC-H1	ASC-A1
ASC-T2	ASC-H2	ASC-A2
ASC-T3	ASC-H3	

3.3 PRIPRAVA RAZTOPIN IN GOJIŠČ

3.3.1 Priprava raztopin

Za izvedbo poskusov smo pripravili ustrezne redčitvene vrste obeh sprožiteljev senescence. Delovne raztopine trihostatina A (TSA) smo pripravili iz založne raztopine s koncentracijo 5 mM. Založno raztopino mitoksantrona s koncentracijo 1 mM, iz katere smo nato pripravili testne koncentracije mitoksantrona, smo pripravili z raztapljanjem praška mitoksantrona z molekulska masa 517,4 g/mol v DMSO. Končne koncentracije sprožiteljev, ki smo jih uporabili pri poskusih, smo pripravili z redčenjem v gojišču za ASC z 10 % FBS. Na osnovi podatkov iz literature (Zhao in sod., 2010) in na podlagi naših predhodnih testiranj smo ugotovili, da so za izvedbo raziskave najprimernejše naslednje koncentracije sprožiteljev:

- Mitoksantron: 0,02 μM , 0,2 μM , 0,4 μM in 0,6 μM
- Trihostatin A (TSA): 0,05 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM in 3 μM

Pri delu smo uporabljali tudi raztopino 1x PBS, ki smo jo pripravili iz 10x PBS-a in sterilne dH_2O . Za 100 mL raztopine 1x PBS potrebujemo 10 mL sterilnega 10x PBS in 90 mL sterilne dH_2O .

3.3.2 Priprava gojišč za gojenje celičnih kultur

Za gojenje celičnih kultur smo uporabljali gojišče za ASC z 20 % FBS (Pregl. 6). Te smo v sterilnih razmerah pripravljali v sterilnih 250 mL steklenicah. Gojišče smo shranjevali v hladilniku pri 4 °C in vsakih 14 dni pripravili sveže gojišče za gojenje ASC celic. Pred uporabo smo gojišče ogreli na temperaturo 37 °C. DMEM je Dulbeccovo modificirano

gojišče, ki se standardno uporablja za gojenje MSC. FBS (serum govejega zarodka) vsebuje zahtevane rastne faktorje in druge potrebne sestavine za spodbujanje trajne rasti celic. Aminokislina L-glutamin v mediju zagotavlja glavni vir energije za celice. Penicilin in streptomycin sta antibiotika, ki ju dodamo v gojišče, da se izognemo morebitnim bakterijskim okužbam med postopki presajevanja ASC in med delom z ASC nasploh.

Preglednica 6: Sestava gojišča za ASC z 20 % FBS

Gojišče za ASC z 20 % FBS	
Sestavina	Količina za 100 mL
DMEM (1000 mg/L)	78 mL
FBS (10 %)	20 mL
L-glutamin (2 mM)	1 mL
Penicilin/streptomycin (1x)	1 mL

Pri izvedbi poskusov za testiranje vpliva sprožiteljv senescence smo uporabljali gojišče za ASC z 10 % FBS. S tem gojiščem smo pripravljali redčitveno vrsto obeh sprožiteljv senescence in raztopino kontrole DMSO pri testu MTT. V Pregl. 7 je prikazana sestava gojišča za ASC z 10 % FBS.

Preglednica 7: Sestava gojišča za ASC z 10 % FBS

Gojišče za ASC z 10 % FBS	
Sestavina	Količina za 100 mL
DMEM (1000 mg/L)	88 mL
FBS (10 %)	10 mL
L-glutamin (2 mM)	1 mL
Penicilin/streptomycin (1x)	1 mL

Za shranjevanje ASC smo uporabljali gojišče za zamrzovanje. Ustrezno število celic smo resuspendirali v 1 mL gojišča za zamrzovanje ASC in jih prenesli v epruvete za zamrzovanje celic (krioviale). Te smo shranili v zamrzovalnikih na -80 °C in kasneje v posodah s tekočim dušikom. V Pregl. 8 je prikazana sestava gojišča za zamrzovanje ASC. DMSO je krioprotektant, ki preprečuje nastanek kristalov ledu, ki bi lahko pri zamrzovanju/odmrzovanju poškodovali celice.

Preglednica 8: Sestava gojišča za zamrzovanje ASC

Gojišče za zamrzovanje ASC	
Sestavina	Količina za 10 mL
DMEM (1000 mg/L)	7 mL
FBS (10 %)	2 mL
DMSO	1 mL

3.3.3 Priprava krovnih stekelc, prevlečenih s poli-L-lizinom

Tehniko gojenja ASC na stekelcih premera 22 mm, prevlečenih s poli-L-lizinom, smo uporabili pri histokemijskem barvanju s substratom X-gal za detekcijo senescentnih celic. Poli-L-lizin omogoča lažje pritrjevanje celic na stekelca. Na ta način lahko pripravimo ustrezne preparate za histokemijska barvanja, pri katerih je treba celice spirati.

Iz založne raztopine poli-L-lizina s koncentracijo 400 $\mu\text{g/mL}$ si z redčenjem v sterilni dH_2O pripravimo delovno raztopino s koncentracijo 20 $\mu\text{g/mL}$. Postopek priprave krovnih stekelc izvajamo s sterilno opremo v brezprašni komori. Protokol je opisan v nadaljevanju:

- Stekelca v sterilni petrijevki (35 mm premer x 10 mm širina) smo prelili s 15 mL delovne raztopine poli-L-lizina ($c = 20 \mu\text{g/mL}$).
- Petrijevko smo postavili na stresalnik in stresali 3 ure.
- Nato smo odstranili raztopino poli-L-lizina ter stekelca 3-krat po 15 minut spirali s sterilno dH_2O (15 mL) z mešanjem na stresalniku.
- Stekelca smo posušili s sušenjem v brezprašni komori.

3.4 POSTOPKI *in vitro* GOJENJA ASC

3.4.1 Odmrzovanje celic

Različne linije ASC smo shranili v tekočem dušiku na različnih pasažah. Za namene izvedbe poskusov smo uporabili ASC na 4. pasaži. Zamrzovalne epruvete smo potopili v vodno kopel s temperaturo 37 °C in celice odmrznili. Celice smo odpipetirali v 15 mL centrifugirko s 5 mL gojišča za ASC z 20 % FBS in jih centrifugirali 5 minut pri 1000 vrtljajih/min. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in pelet celic resuspendirali v 1 mL svežega gojišča za ASC z 20 % FBS. Sledila je nasaditev celic (6000 celic/cm²) v ploščate platenke s površino 25 cm² (T25), kamor smo predhodno dodali 6 mL gojišča za ASC z 20 % FBS. T25 smo nato prenesli v inkubator. Celice smo gojili v inkubatorju pri temperaturi 37 °C in v vlažni atmosferi s 5 % CO₂. Gojišče smo jim menjali dvakrat tedensko (oziroma na 3-4 dni) in v gojilne posode T25 dodajali 6 mL gojišča.

3.4.2 Presajevanje celic

Vse linije ASC rastejo v monosloju, pritrjene na podlago. Rast celic smo spremljali s svetlobnim mikroskopom. Ko so celice dosegle 80-90 % konfluenco, smo jih presadili v novo T25. To smo storili tako, da smo odsesali gojišče, celice sprali s 5 mL pufra 1x PBS in jim dodali 1 mL tripsina (0,25 %) ter jih nato 5 minut inkubirali pri temperaturi 37 °C. Po 5 minutah smo v T25 dodali 5 mL gojišča za ASC z 20 % FBS, ki je z vsebnostjo FBS-a inaktiviral tripsin. Sledil je prenos celične suspenzije v centrifugirko in centrifugiranje 5 min pri 1000 vrtljaji/min. Po centrifugiranju smo odsesali supernatant in pelet celic resuspendirali v 1 mL svežega gojišča za ASC z 20 % FBS. Celice smo prešteli s hemocitometrom (metoda opisana v nadaljevanju) in nasadili 6000 celic/cm² v nove ploščate platenke.

Na tak način smo celice presajali vse do 7. pasaže, ko smo opravili eksperimente. Za potrebe eksperimentov smo nadalje uporabljali gojišče za ASC z 10 % FBS in gojilne

posode s 96 vdolbinami (poglavje 3.5.1 Test MTT, str. 27) ter gojilne posode s 24 vdolbinami (poglavje 3.6.1 Test SA- β -gal, str. 30).

3.4.3 Določanje števila celic na hemocitometru

Celice smo šteli s svetlobnim mikroskopom s pomočjo števne komore ali hemocitometra. Pri tem smo uporabili metodo barvanja s tripanskim modrilom, ki specifično obarva celice s poškodovano membrano. To so mrtve celice, ki jih ne štejemo. Žive celice ostanejo brezbarvne, so pravilne okrogle oblike in svetijo, ko jih opazujemo z mikroskopom, zato jih lahko na modrem ozadju brez težav preštujemo. Intaktnost njihove membrane namreč onemogoča vstop barvila v citoplazmo (Sever, 2007).

Postopek barvanja in štetja celic s hemocitometrom je opisan v nadaljevanju.

- Celice smo predhodno centrifugirali (1000 vrtljajev/min, 5 min), odsesali supernatant in pelet celic resuspendirali v 1 mL svežega gojišča za ASC z 20 % FBS.
- V novo epruveto smo odpipetirali 40 μ L barvila tripansko modrilo. Dodali smo 10 μ L celične suspenzije, ki smo jo pridobili v prejšnjem koraku.
- Iz mešanice celične suspenzije in barvila (50 μ L) smo odpipetirali 10 μ L in jih nanegli na hemocitometer. Prešteli smo vse viabilne celice v štirih kvadratih hemocitometra (označeni na Sl. 4).
- Končno število vseh celic v suspenziji smo izračunali s pomočjo naslednje enačbe (Sever, 2007):

$$N = \left(\frac{A+B+C+D}{4} \right) \times R \times K_p \times V_s \quad \dots (1)$$

kjer velja:

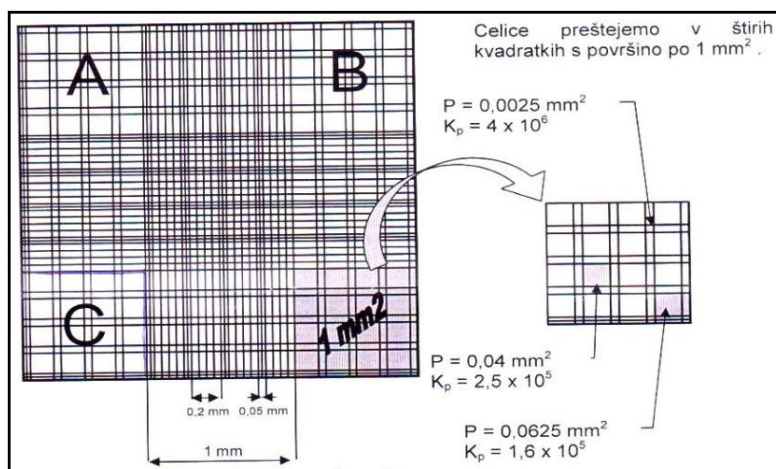
N: število vseh živih celic v suspenziji, ki smo ji določali koncentracijo,

A, B, C, D: število prešteti celic v štirih kvadratih hemocitometra,

R: faktor redčenja,

$K_p = 10^4$. Prostornina suspenzije pod stekelcem je 0,1 μL (globina komore je 0,1 mm), zato za pravilen izračun števila celic v 1 mL dobljeno vrednost pomnožimo z 10^4 .

V_s : če smo celice resuspendirali v drugačnem volumnu gojišča in ne v 1 mL, moramo dobljeno vrednost pomnožiti še z volumnom suspenzije.



Slika 4: Razporeditev in dimenzije kvadratov v hemocitometru (Sever, 2007).

3.5 TESTIRANJE PROLIFERACIJE CELIC

Proliferacijski testi merijo hitrost rasti celic. Z njimi lahko ugotovljamo pozitivno ali negativno spreminjanje proliferacije celic ob vplivu določenih pospeševalnih ali zaviralnih dejavnikov. Ob tem moramo upoštevati dejstvo, da imajo lahko posamezne celične linije že v osnovi različen proliferacijski potencial.

3.5.1 Test MTT

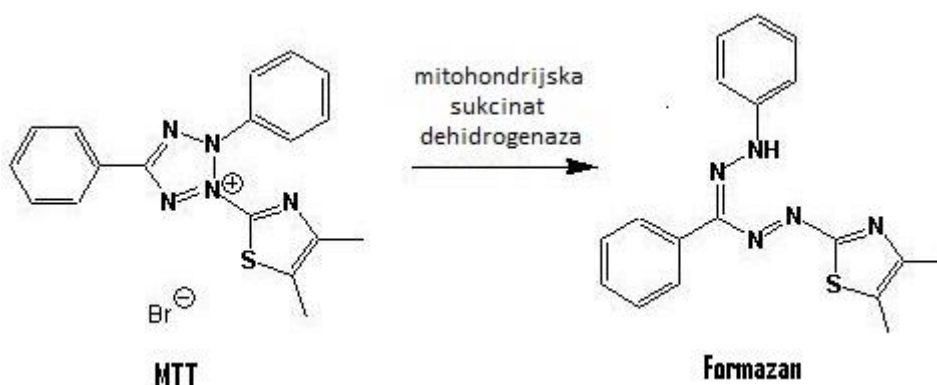
Test MTT je enostavna, natančna in kvantitativna kolorimetrična metoda za določanje števila živih celic. Prvi jo je leta 1983 opisal Mosmann in od takrat je vse bolj uveljavljena metoda za določanje vpliva določenih snovi, elementov, gojišč na proliferacijo celic, prav tako jo lahko uporabljamo kot test za določanje citotoksičnosti substanc. Opisana metoda

omogoča posreden način detekcije živih celic (preko merjenja metabolne aktivnosti celic) in je primerna za celice, ki rastejo v monosloju ali v suspenziji.

V naši nalogi smo test MTT uporabili za določanje proliferacije celic, in sicer smo z njim želeli preučiti vpliv različnih koncentracij TSA in mitoksantrona na metabolno aktivnost celic.

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid) je rumena vodotopna substanca, ki jo mitohondrijska sukcinat dehidrogenaza metabolno aktivnih celic reducira v vijoličaste nevodotopne kristale formazana (Sl. 5). Ti so topni v dimetil sulfoksidu (DMSO), izopropanolu in drugih podobnih organskih topilih. Razmerje med količino nastalega formazana in številom živih celic je pri homogeni populaciji v optimalnem območju linearno in specifično za vsako celično linijo (Sever, 2007).

Glavna prednost testa MTT je njegoa hitrost in natančnost ter dejstvo, da pri izvedbi metode ni potrebna uporaba nobenih radioaktivnih snovi in izotopov. Prav tako med izvajanjem testa ni potrebno opravljati vmesnih korakov izpiranja celic. Poleg tega lahko test uporabimo za analizo širokega območja gostote celic, saj z metodo zaznamo že zelo majhno število živih celic (Mosmann, 1983).



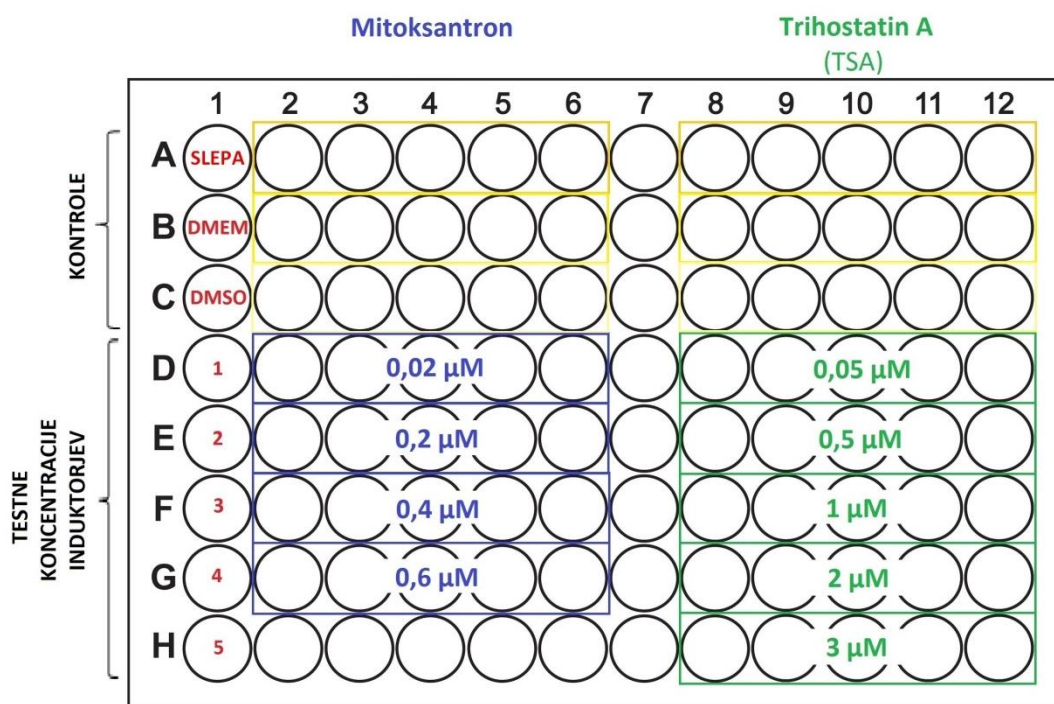
Slika 5: Struktura MTT in njegova redukcija v formazanski produkt (povzeto po Biotek, 2009)

Načrt izvedbe poskusa prikazuje Sl. 6. Test smo izvedli v treh ponovitvah. Pomembno je, da ga izvajamo v temi, saj je reagent MTT občutljiv na svetlobo. Postopek testa MTT, ki smo ga uporabljali pri izvedbi naših poskusov, je opisan v nadaljevanju.

- V gojilno posodo s 96 vdolbinami z ravnim dnom smo odpipetirali suspenzijo celic posamezne celične linije: ASC-T1, ASC-T2, ASC-T3, ASC-H1, ASC-H2, ASC-H3, ASC-A1, ASC-A2. Vsako celično linijo smo nasadili v petih ponovitvah za vsako koncentracijo posameznega sprožitelja senescence (za koncentracije mitoksantrona 0,02 μM , 0,2 μM , 0,4 μM in 0,6 μM ter za koncentracije TSA 0,05 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM in 3 μM). Poleg celic za test smo nasadili tudi celice za negativno in pozitivno kontrolo (Sl. 6). Nasadili smo 5.000 celic/200 μL gojišča/vdolbino in pri tem uporabili gojišče za ASC z 10 % FBS.
- Po 24 urah gojenja, ko so se celice pritrdile na podlago, smo odsesali izrabljeno gojišče in celicam dodali 200 μL svežega medija s sprožiteljema TSA in mitoksantron ustreznih koncentracij. Celicam iz prvega kontrolnega poskusa smo dodali 200 μL čistega gojišča za ASC z 10 % FBS in celicam iz drugega kontrolnega poskusa 200 μL gojišča za ASC z 10 % FBS z dodanim DMSO (c = 0,06 %). Koncentracija DMSO je ustrezala količinam uporabljenega DMSO za redčenje obeh sprožiteljev iz založne raztopine. Namen kontrol je bil izločiti vpliv uporabljenega topila DMSO na rezultate poskusa. V gojilne posode smo dodali v 10 vdolbin brez celic 200 μL čistega gojišča za ASC z 10 % FBS, ki so služile za slepo kontrolo pri izračunu vrednosti absorbanc.
- Sledilo je 72 ur inkubacije celic v celičnem inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂). Nato smo v vse vdolbine dodali 20 μL reagenta MTT in celice ponovno postavili v inkubator za 3 ure.
- V digestoriju smo nato iz vseh vdolbin odpipetirali izrabljeno gojišče in dodali 200 μL DMSO, v katerem so se nastali kristali formazana raztopili.

Izmerili smo absorbanco v vseh vdolbinah gojilne posode pri valovni dolžini 570 nm in referenčni valovni dolžini 690 nm ($A_{570/690}$, Synergy). Podatke, ki smo jih izmerili s spektrofotometrom, smo s pomočjo programa Magellan uvozili v program Excel (*Microsoft Office*), kjer smo jih statistično obdelali in pri tem uporabili Studentov t-test z

dvodelno porazdelitvijo in dvovzorčno neenako varianco. Za statistično značilnost smo uporabili meji tveganja 0,05 ($p < 0,05$) in 0,01 ($p < 0,01$). Stopnja tveganja 0,05 pomeni, da lahko z več kot 95 % verjetnostjo trdimo, da se povprečni vzorec statistično značilno razlikujeta. Na grafih smo odstopanja prikazali z vrhom standardnih deviacij.



Slika 6: Shema izvedbe testa MTT v gojilni plošči s 96 vdolbinami

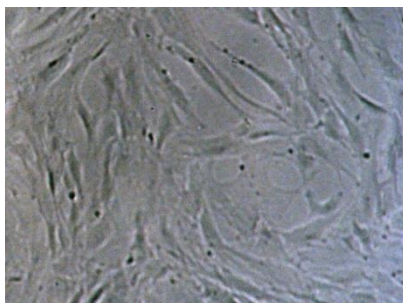
3.6 HISTOKEMIJSKO BARVANJE SENESCENTNIH CELIC

3.6.1 Test SA-β-gal

Sesalčje celice imajo lizosomsko β-galaktozidazno aktivnost, ki optimalno deluje pri pH 4,0. Celice, ki so v stanju replikativne senescence, imajo povečano izražanje β-galaktozidaze. Da se izognemo ozadju normalnih celic, jo merimo pri pH 6,0. S senescenco povezana β-galaktozidazna aktivnost (ang. *senescence-associated β-gal*, SA-β-gal) je postala široko uporabljen bioznačevalec za preučevanje sprožene senescence. To encimatsko aktivnost določamo s citokemijsko metodo barvanja celic s kromogenim substratom 5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktopiranozid (X-gal) pri pH 6,0. Celice, ki so v senescentnem stanju, se bodo po inkubaciji z X-gal obarvale modro. Opisane

reakcijske razmere omogočajo, da se celice, ki niso senescentne, ne obarvajo modro (Gary in Kindell, 2005).

Vsem osmim linijam ASC smo določili stopnjo senescence na 7. pasaži pri 50 % konfluenci (Sl. 7). Celice smo nasadili na stekelca, ki so bila predhodno tretirana s poli-L-lizinom. Stekelca smo položili v vdolbine gojilnih posod s 24 vdolbinami in nanje nasadili 15.000 celic/vdolbino. Celice smo po 24 urah gojenja, ko so se pritrdile na podlago, izpostavili testnim koncentracijam TSA in mitoksantrona ter pozitivno kontrolo DMSO ter jih po 72 urah obarvali z raztopino s substratom X-gal.



Slika 7: Videz mezenhimskih matičnih celic, izoliranih iz maščevja. Celice so vretenaste, po obliki podobne fibroblastom. Prikazane so celice ASC-H1, izolirane iz maščevja (boki) pasaže 7 v kulturi pri 50 % konfluenci (40-kratna povečava, foto T. Rajar).

Postopek barvanja senescentnih celic testom SA- β -gal je opisan v nadaljevanju:

- Celicam smo odesali izrabljeno gojišče za ASC z 10 % FBS in jih 3-krat sprali z 1x PBS.
- Po tretjem spiranju smo odstranili 1x PBS in celice fiksirali v 0,25 % raztopini glutaraldehida pri sobni temperaturi 15 minut.
- Odstranili smo fiksativ in celice sprali z 2 mL 1x PBS.
- Dodali smo raztopino za barvanje s substratom X-gal (Pregl. 9). Dodali smo 250 μ L raztopine za barvanje v vsako vdolbino.

- Celice smo nato 7 ur inkubirali v bakterijskem inkubatorju v normalni atmosferi in pri temperaturi 37 °C.
- Po končani inkubaciji smo celice 3-krat sprali z dH₂O.
- Jedra celic smo obarvali z barvilom Hoechst po navodilih proizvajalca. To je modro fluorescenčno barvilo, ki se veže v mali žleb jedrne DNA in ima emisijski maksimum pri ≈ 460 nm. Uporabili smo 1000x redčeno (v 1x PBS) raztopino barvila, barvanje pa smo izvajali 5 min v temi pri sobni temperaturi.
- Po končanem barvanju smo celice sprali z dH₂O.
- Stekelca s celicami smo nato prenesli na objektna stekla, kamor smo kapnili 15 μ L reagenta, ki preprečuje bledenje (ang. »anti-fade«) in ohranja fluorescentni signal. Obarvanje celic smo analizirali s fluorescentnim mikroskopom.

Preglednica 9: Količine in imena reagentov/substrata za pripravo raztopine za histokemijsko barvanje

Reagent/substrat	Količina (μ L)
citronska kislina/ NO_2HPO_4	240
$\text{K}_4(\text{Fe}(\text{CN})_6) \times 3\text{H}_2\text{O}$	60
$\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$	60
NaCl	36
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	2,4
dH ₂ O	741,6
X-gal	60
Končni volumen raztopine	1200

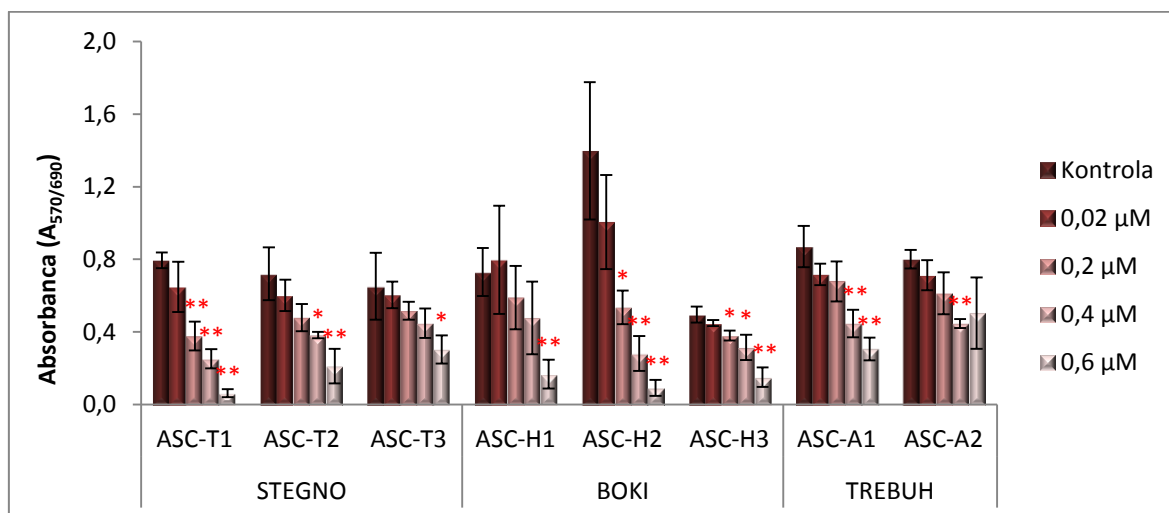
4 REZULTATI

4.1 ANALIZA PROLIFERACIJE CELIC

V našem delu smo ovrednotili proliferacijo 8 celičnih linij ASC, izoliranih iz treh telesnih lokacij (stegno, boki, trebuh) (Pregl. 5). To smo storili z uporabo testa MTT. Ob tem smo preučili tudi možen toksičen vpliv različnih koncentracij sprožiteljev senescence mitoksantrona in TSA na stopnjo viabilnosti celic. Vse linije ASC so imele podoben proliferacijski potencial. Izstopale so le ASC-H2, ki so izkazovale višjo stopnjo proliferacije. V delu smo prav tako analizirali morebiten vpliv anatomske lokacije, iz katere smo izolirali ASC, na stopnjo proliferacije celic.

4.1.1 Vpliv mitoksantrona na stopnjo proliferacije različnih linij ASC

Oba sprožitelja senescence mitoksantron in trihostatin A imata znaten vpliv na proliferacijo vseh testiranih celičnih linij ASC (Sl. 8 in 9). Velja, da povečevanje koncentracije sprožitelja negativno vpliva na metabolno aktivnost celic. Višja kot je testirana koncentracija mitoksantrona ali TSA, manjša je bila zaznana stopnja proliferacije ASC. Pri koncentraciji mitoksantrona 0,02 μM se proliferacija ASC glede na kontrolo ni znižala. Statistično značilno znižanje proliferacije ASC najprej opazimo pri izpostavitvi celic 0,2 μM koncentraciji mitoksantrona, in sicer se je pri ASC-T1 $A_{570/690}$ znižala za 52,56 % ($p < 0,01$), pri ASC-H2 za 61,68 % ($p < 0,05$) ter pri ASC-H3 za 23,37 % ($p < 0,05$). Največji vpliv na znižanje proliferacije celic opazimo pri ASC-H2 (znižanje $A_{570/690}$ za 93,38 %; $p < 0,01$), medtem ko ima mitoksantron najmanjši vpliv na znižanje proliferacije pri ASC-A2 (znižanje $A_{570/690}$ za 44,23 %; $p < 0,01$) (Sl. 8). Pri koncentracijah mitoksantrona 0,4 μM in 0,6 μM smo najpogosteje določili znižanje proliferacije ASC, in sicer pri 6 oz. 7 linijah ASC.

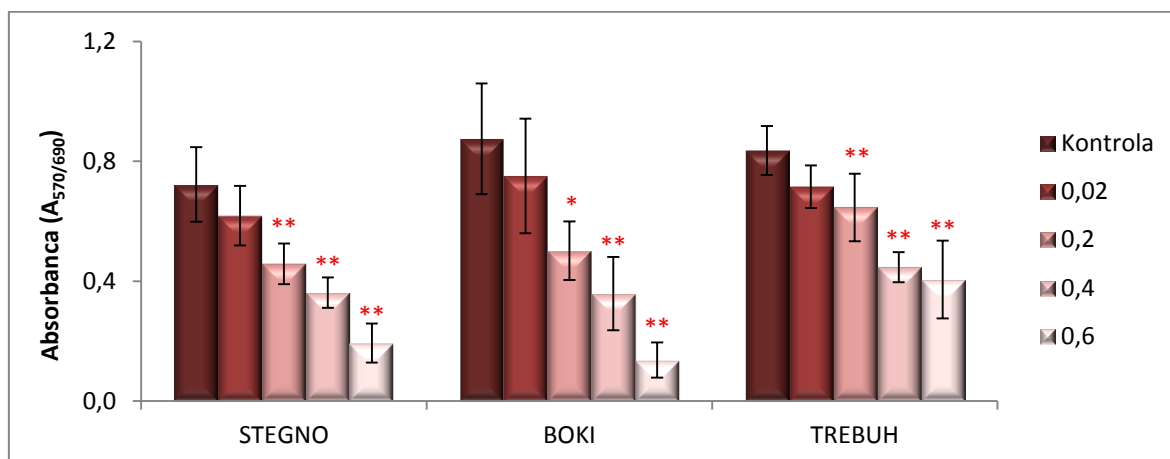


Slika 8: Vpliv mitoksantrona na proliferacijo mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja. Celice na 7. pasaži, izolirane iz treh telesnih lokacij, tj. stegna (T), bokov (H) in trebuha (A). $p < 0,05 = *$ in $p < 0,01 = **$.

4.1.2 Vpliv mitoksantrona na stopnjo proliferacije ASC glede na telesno lokacijo

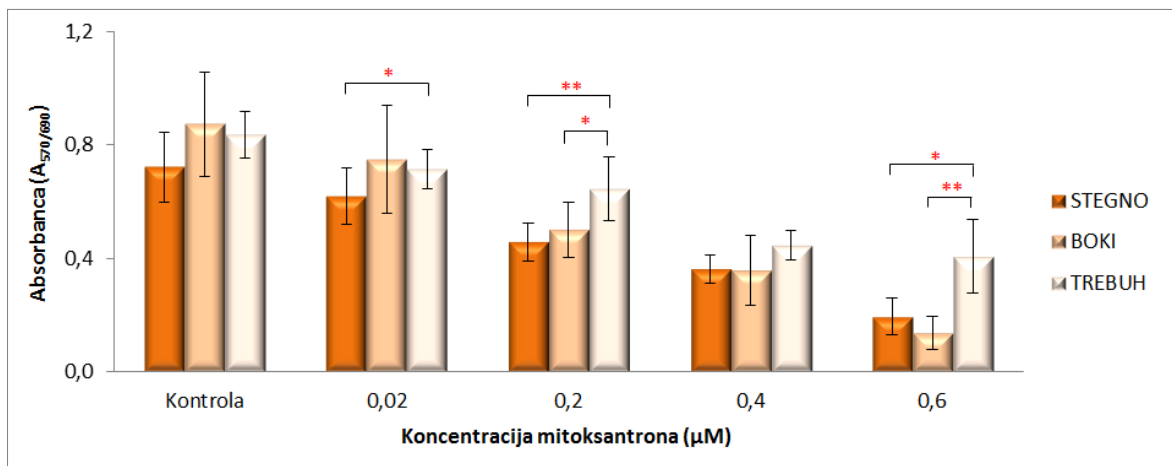
Nadalje smo določali vpliv mitoksantrona in TSA na stopnjo proliferacije celic glede na telesno lokacijo. To smo naredili tako, da smo za vsako testirano koncentracijo sprožitelja senescence izračunali povprečje meritev treh oziroma dveh celičnih linij, ki so pripadale isti telesni lokaciji.

Na Sl. 9 opazimo, da so vse testirane koncentracije mitoksantrona, razen najnižje ($0,02 \mu\text{M}$), statistično značilno ($p < 0,01$) vplivale na preživelost ASC (razen pri celicah iz bokov in $0,2 \mu\text{M}$ mitoksantrona, kjer velja $p < 0,05$). Rezultati kažejo tudi, da je bila v primerjavi z drugima dvema telesnima lokacijama preživelost celic celičnih linij trebuha glede na kontrolo višja pri vseh testiranih koncentracijah mitoksantrona, saj je mitoksantron v tem primeru najmanj znižal $A_{570/690}$, in sicer za 51,51 %. To pomeni, da so ASC, izolirane iz predela trebuha, bolj odporne, tj. manj dovzetne na vpliv mitoksantrona. Največje znižanje proliferacije smo opazili pri celicah, ki so bile izolirane iz predela bokov, in sicer je bilo znižanje $A_{570/690}$ 84,33 %.

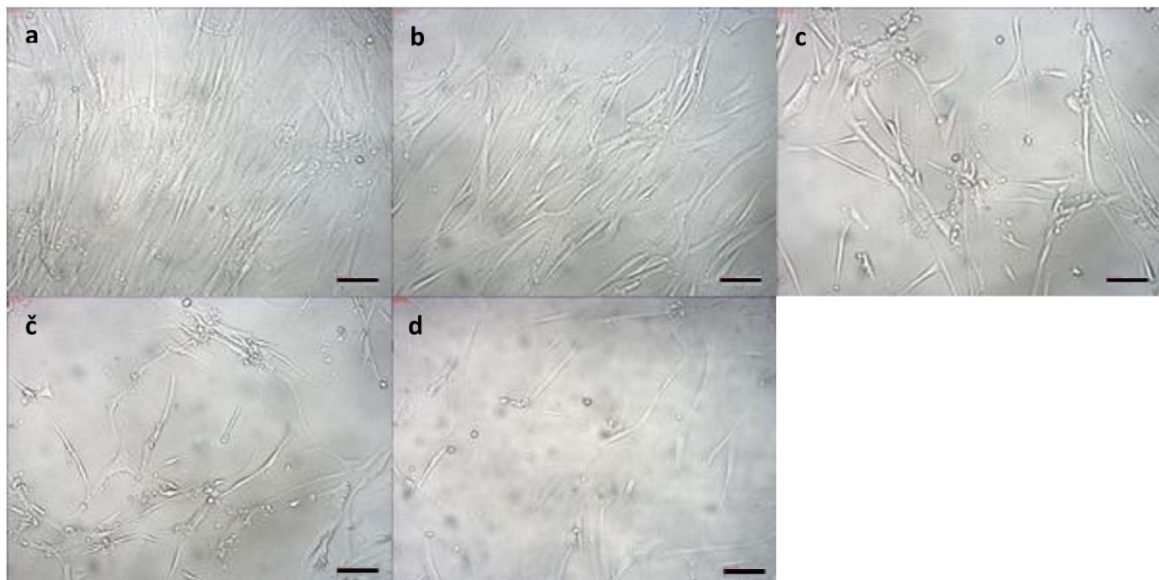


Slika 9: Vpliv mitoksantrona na proliferacijo mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja glede na telesno lokacijo. Celice na 7. pasaji. Stegno –ASC-T1, ASC-T2, ASC-T3; boki –ASC-H1, ASC-H2, ASC-H3; trebuh –ASC-A1, ASC-A2. $p < 0,05 = *$ in $p < 0,01 = **$.

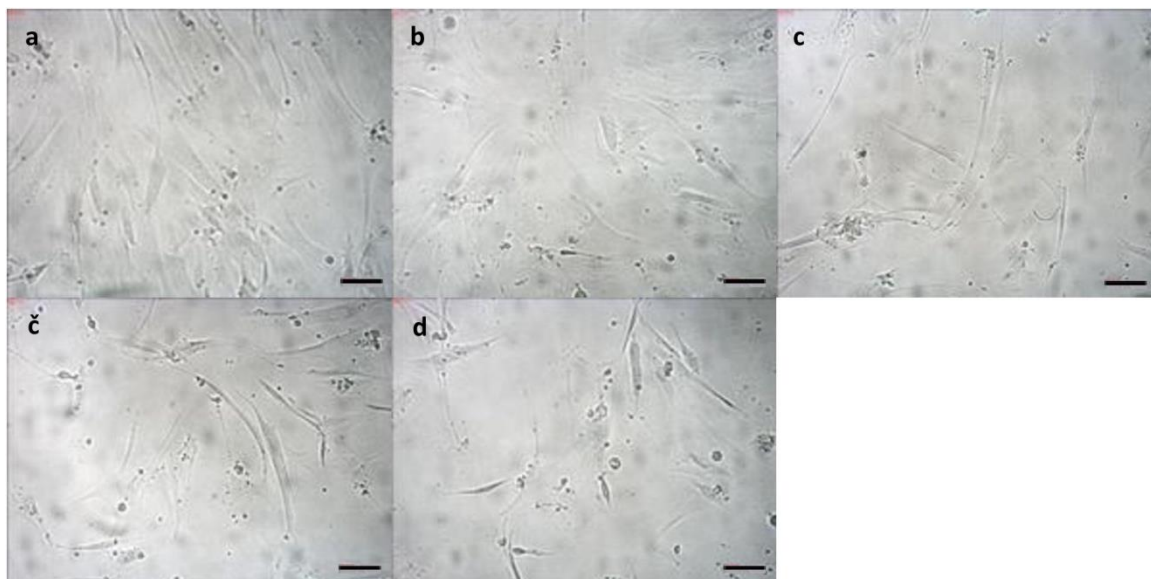
Bolj nazorno nam večjo proliferativnost celic celičnih linij iz trebuha prikazuje Sl. 10. Opazimo, da je preživelost ASC, ki so bile izolirane iz predela trebuha, statistično značilno večja od preživelosti ASC, ki so bile izolirane iz predela stegna pri kar treh (0,02 μM in 0,6 μM pri $p < 0,05$ ter 0,2 μM pri $p < 0,01$) od štirih testiranih koncentracij mitoksantrona. Pri koncentraciji mitoksantrona 0,02 μM je $A_{570/690}$ višja za 13,58 %, pri 0,2 μM za 29,11 % in pri 0,6 μM za 52,28 %. V primerjavi z ASC, ki so bile izolirane iz predela bokov, je preživelost ASC, izoliranih iz predela trebuha, večja pri dveh testiranih koncentracijah mitoksantrona (0,2 μM pri $p < 0,05$ in 0,6 μM pri $p < 0,01$). Pri koncentraciji mitoksantrona 0,2 μM je $A_{570/690}$ višja za 22,34 % ter pri 0,6 μM za 66,19 %. Ugotovimo lahko, da je vpliv mitoksantrona na znižanje proliferacije najmanj prisoten ravno pri ASC, izoliranih iz maščevja trebuha, kar pomeni, da so te celične linije bolj odporne.



Slika 10: Vpliv različnih koncentracij mitoksantrona na proliferacijo ASC izoliranih iz maščevja stegna, bokov in trebuha ter primerjava med telesnimi lokacijami. Celice na 7. pasaži. Stegno –ASC-T1, ASC-T2, ASC-T3; boki –ASC-H1, ASC-H2, ASC-H3; trebuh –ASC-A1, ASC-A2. $p < 0,05 = *$ in $p < 0,01 = **$.



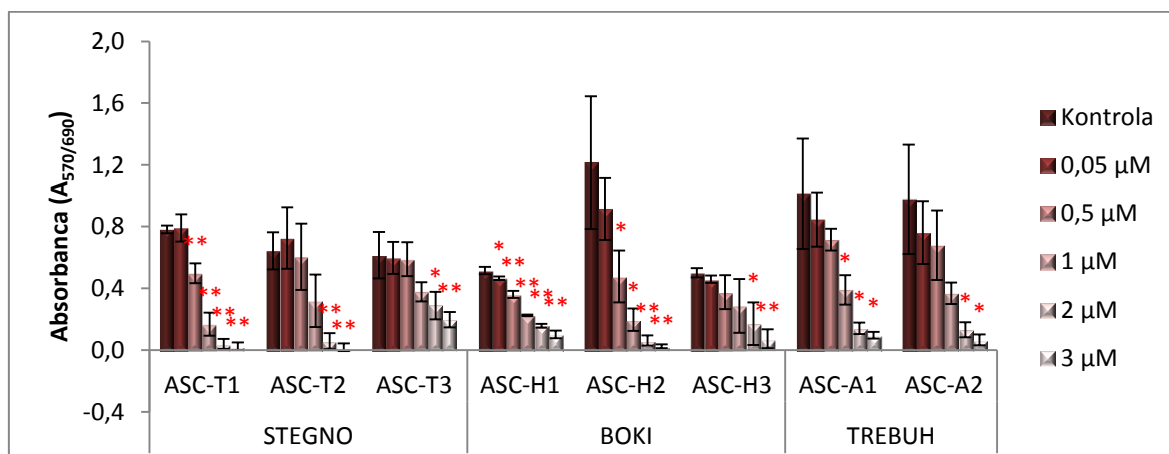
Slika 11: Primer bolje rastočih mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja. ASC-A2, 7. pasaža. Celice so izpostavljene različnim koncentracijam mitoksantrona. (a) Kontrola DMSO; (b) Konc. mitoksantrona = 0,02 μM ; (c) Konc. mitoksantrona = 0,2 μM ; (č) Konc. mitoksantrona = 0,4 μM ; (d) Konc. mitoksantrona = 0,6 μM ; (100-kratna povečava, foto T. Rajar).



Slika 12: Primer slabše rastočih mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja. ASC-H3, 7. pasaža. Celice so izpostavljene različnim koncentracijam mitoksantrona. (a) Kontrola DMSO; (b) Konc. mitoksantrona = 0,02 μM ; (c) Konc. mitoksantrona = 0,2 μM ; (č) Konc. mitoksantrona = 0,4 μM ; (d) Konc. mitoksantrona = 0,6 μM ; (100-kratna povečava, foto T. Rajar).

4.1.3 Vpliv trihostatina A (TSA) na stopnjo proliferacije različnih linij ASC

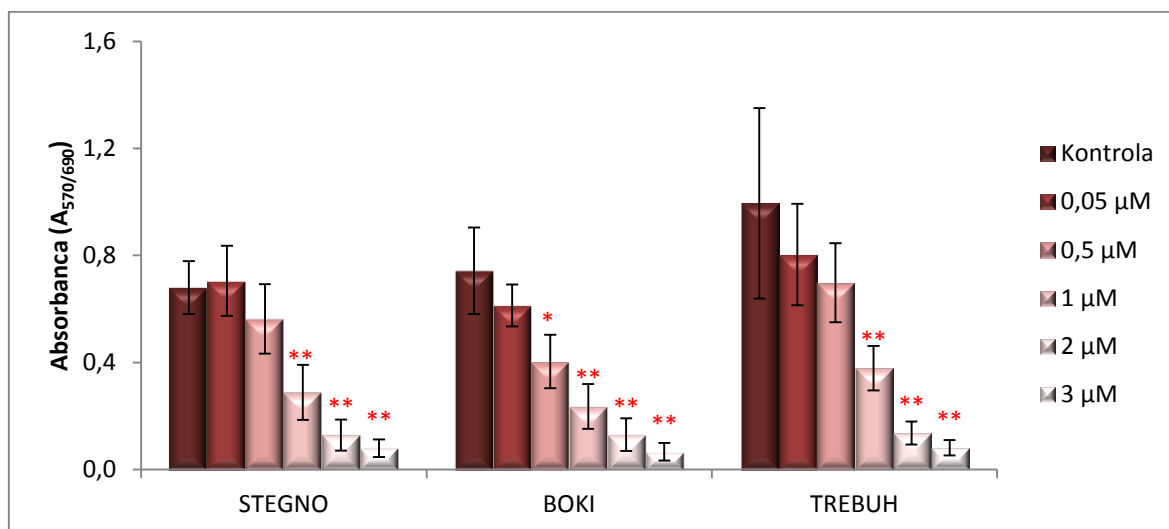
Za razliko od mitoksantrona smo tudi že pri najnižji koncentraciji TSA, tj. 0,05 μM , opazili statistično značilno ($p < 0,05$) znižanje proliferacije pri celicah, ki smo jih izpostavili omenjenemu sprožitelju senescence, glede na kontrolo (Sl. 13). To so bile ASC-H1, kjer se je $A_{570/690}$ znižala za 9,53 %. ASC-H1 so tako tudi edina testirana celična linija, pri kateri smo pri vseh testiranih koncentracijah uporabljenega sprožitelja (v tem primeru TSA) zaznali znižanje proliferacije celic. Edini testirani koncentraciji sprožitelja, pri katerih smo določili znižanje proliferacije pri vseh ASC, sta bili najvišji dve koncentraciji TSA, tj. 2 μM in 3 μM . Pri koncentraciji TSA 2 μM se je proliferacija najbolj znižala pri ASC-H2 (znižanje $A_{570/690}$ za 94,88 %; $p < 0,01$), prav tako tudi pri koncentraciji TSA 3 μM , saj nasploh največji vpliv TSA na znižanje proliferacije opazimo prav pri ASC-H2 (znižanje $A_{570/690}$ za 97,95 %; $p < 0,01$). TSA je imel najmanjši vpliv pri ASC-T3 (znižanje $A_{570/690}$ za 67,89 %; $p < 0,01$).



Slika 13: Vpliv trihostatina A na proliferacijo mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja. Celice na 7. pasaji, izolirane iz treh telesnih lokacij, tj. stegna (T), bokov (H) in trebuha (A). $p < 0,05 = *$ in $p < 0,01 = **$.

4.1.4 Vpliv trihostatina A (TSA) na stopnjo proliferacije ASC glede na telesno lokacijo

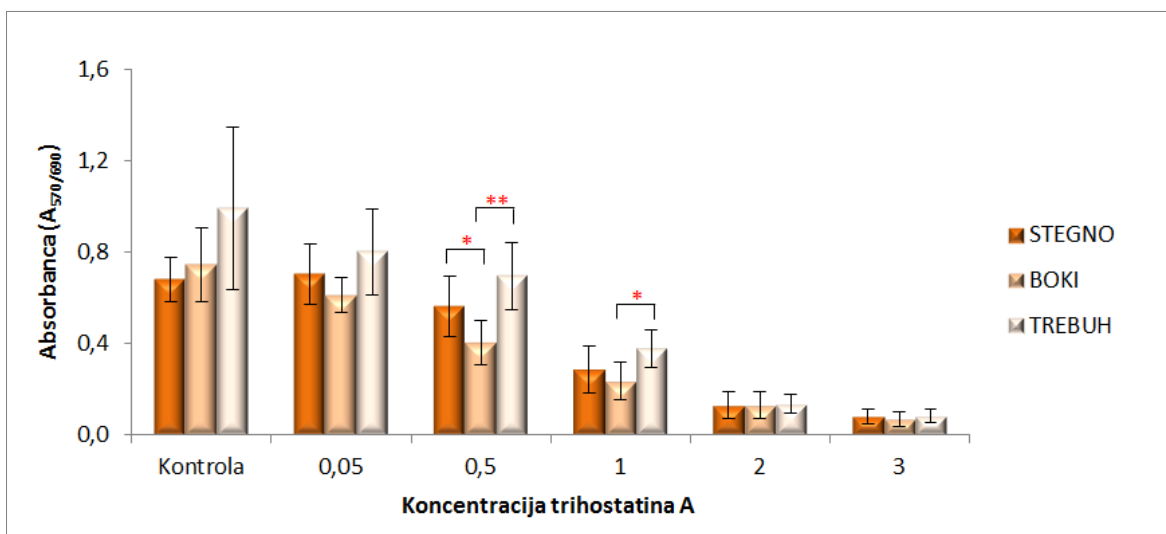
Rezultati meritev vpliva trihostatina A na stopnjo proliferacije ASC prav tako kažejo, da TSA statistično značilno ($p < 0,01$) zmanjša stopnjo proliferacije ASC, izoliranih iz maščevja vseh treh telesnih lokacij. Zopet velja, da to drži za višje koncentracije TSA ($1 \mu\text{M}$, $2 \mu\text{M}$ in $3 \mu\text{M}$), medtem ko za dve najnižji testirani koncentraciji sprožitelja senescence ($0,05 \mu\text{M}$ in $0,5 \mu\text{M}$) tega ne moremo trditi (razen za primer bokov pri koncentraciji TSA $0,5 \mu\text{M}$; $p < 0,05$). Največje znižanje $A_{570/690}$ smo izmerili pri ASC, izoliranih iz maščevja trebuha, kjer se je absorbanca znižala za 91,77 %, najmanjši vpliv na absorbanco pa je imel TSA pri ASC, izoliranih iz maščevja stegna, in sicer se je $A_{570/690}$ znižala za 88,17 % (Sl. 14).



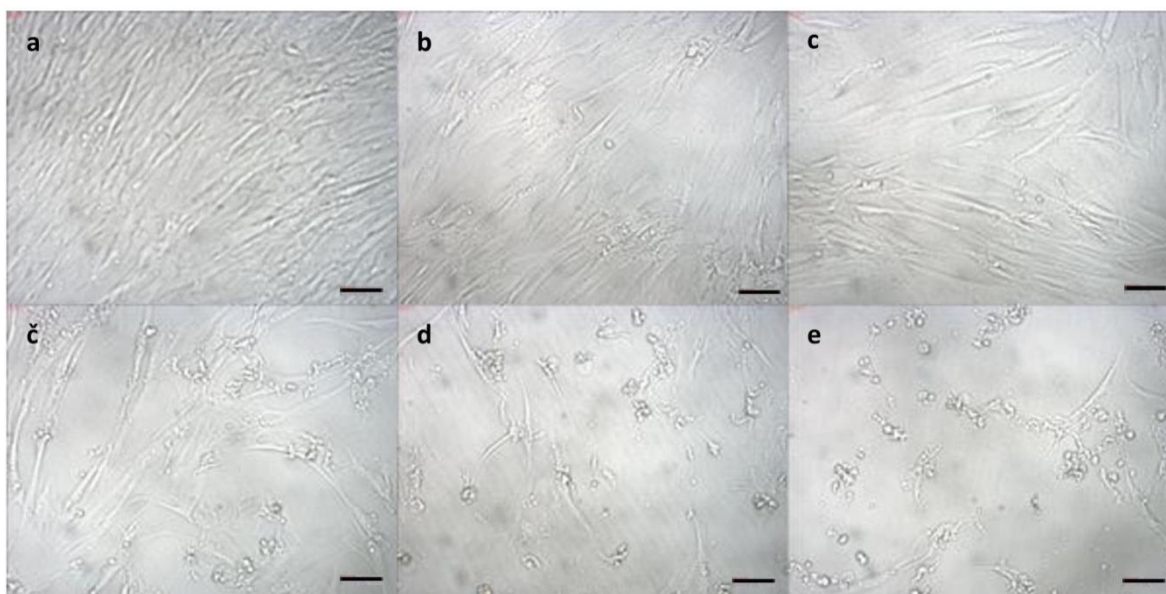
Slika 14: Vpliv trihostatina A na proliferacijo mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja glede na telesno lokacijo. Celice na 7. pasaji. Stegno – ASC-T1, ASC-T2, ASC-T3; boki – ASC-H1, ASC-H2, ASC-H3; trebuh – ASC-A1, ASC-A2. $p < 0,05 = *$ in $p < 0,01 = **$.

Razlika v stopnji proliferacije je sicer prisotna v manjši meri kot v primeru mitoksantrona (primerjaj Sl. 10 in Sl. 15), kljub temu se ta pojavi med celičnimi linijami ASC, izoliranimi iz predela trebuha in bokov, pri koncentracijah TSA 0,5 μM ($p < 0,01$) in 1 μM ($p < 0,05$). Pri 0,5 μM koncentraciji TSA so imele ASC, izolirane iz predela trebuha, 42,04 % večjo proliferacijo od ASC, izoliranih iz predela bokov, pri 1 μM koncentraciji TSA pa 37,69 %. Pri koncentraciji TSA 0,5 μM opazimo statistično značilno ($p < 0,05$) razliko v stopnji proliferacije tudi med celičnimi linijami ASC, izoliranih iz predela bokov in stegna. V tem primeru imajo ASC, izolirane iz maščevja stegna, 28,20 % večjo proliferacijo od ASC, izoliranih iz maščevja bokov (Sl. 15).

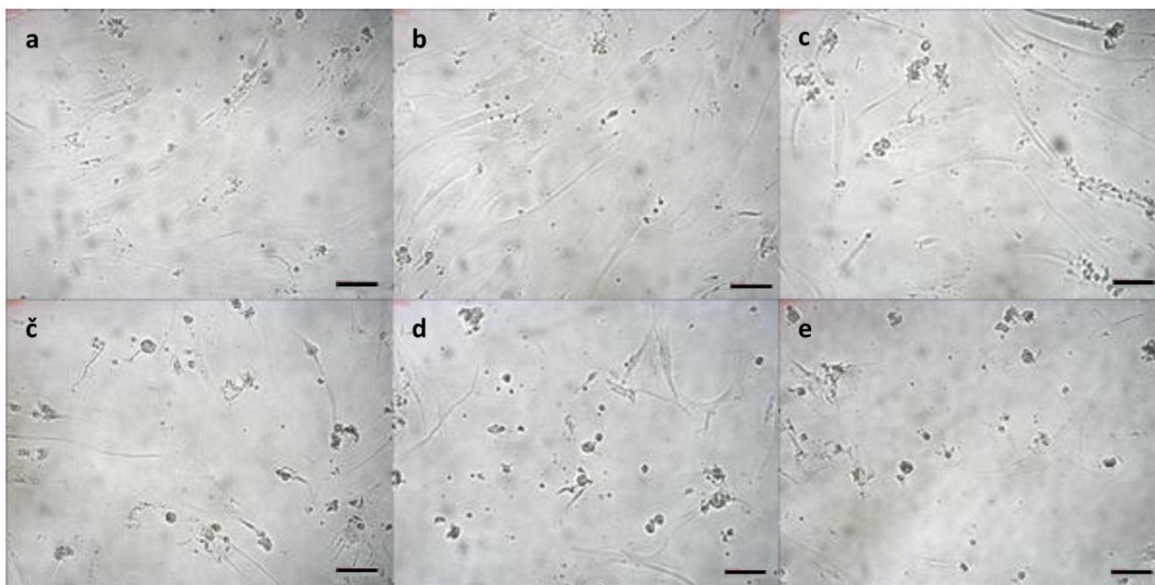
Rezultati kažejo, da so imele ASC, izolirane iz maščevja trebuha, pri vseh testiranih koncentracijah TSA največjo proliferacijo v primerjavi z ostalimi linijami ASC, kar pomeni, da so te celice manj dovzete za vpliv TSA.



Slika 15: Vpliv različnih koncentracij trihostatina A na proliferacijo ASC izoliranih iz maščevja stegna, bokov in trebuha ter primerjava med telesnimi lokacijami. Celice na 7. pasaži. Stegno – ASC-T1, ASC-T2, ASC-T3; boki – ASC-H1, ASC-H2, ASC-H3; trebuh – ASC-A1, ASC-A2. $p < 0,05 = *$ in $p < 0,01 = **$.



Slika 16: Primer dobro rastočih mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja. ASC-A2, 7. pasaža. Celice so izpostavljene različnim koncentracijam trihostatina A. (a) Kontrola DMSO; (b) Konc. TSA = 0,05 μM ; (c) Konc. TSA = 0,5 μM ; (č) Konc. TSA = 1 μM ; (d) Konc. TSA = 2 μM ; (e) Konc. TSA = 3 μM ; (100-kratna povečava, foto T. Rajar).



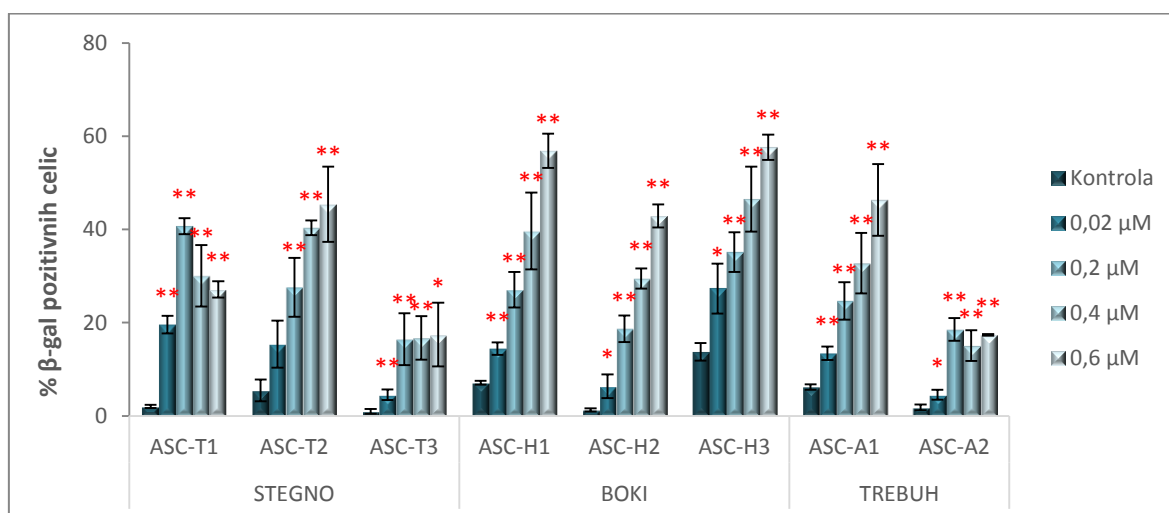
Slika 17: Primer slabše rastočih mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja. ASC-H3, 7. pasaja. Celice so izpostavljene različnim koncentracijam trihostatina A. (a) Kontrola DMSO; (b) Konc. TSA = 0,05 μM ; (c) Konc. TSA = 0,5 μM ; (č) Konc. TSA = 1 μM ; (d) Konc. TSA = 2 μM ; (e) Konc. TSA = 3 μM ; 100-kratna povečava, foto T. Rajar).

4.2 ANALIZA SENESCENCE CELIC

Ob nasajanju celic v gojilno posodo s 96 vdolbinami za test MTT smo celice nasadili tudi na stekelca v gojilne posode s 24 vdolbinami za test SA- β -gal. Kot predstavljeno, smo celice izpostavili substratu X-gal ter pri pH 6,0 določili modro obarvane celice. S to metodo smo ovrednotili stopnjo senescence celic pasaje 7 ob prisotnosti različnih koncentracij sprožiteljev senescence mitoksantrona in trihostatina A. Rezultati testa so pokazali, da je že osnovna stopnja senescence različna med linijami ASC. Najmanjši odstotek senescentnih celic pri kontrolnem vzorcu smo določili pri ASC-T3, in sicer 0,98 %, največji pa pri ASC-H3, in sicer 13,74 %. Razloge lahko poiščemo v dejstvu, da so že tekom gojenja različne linije ASC imele različno uspešno rast in posledično različno stopnjo senescence na določeni stopnji gojenja. Nenazadnje smo izvajali raziskovalno delo ob predpostavki, da obstaja razlika v kvaliteti različnih ASC. Če povzamemo, je ASC-T3 dejansko hitro rastoča celična linija, medtem ko je ASC-H3 počasi rastoča celična linija.

4.2.1 Vpliv mitoksantrona na stopnjo senescence različnih linij ASC

Mitoksantron je pričakovano povečal stopnjo senescence pri vseh celičnih linijah ASC, ki so bile izpostavljene sprožitelju senescence. Vpliv na stopnjo senescence lahko opazimo pri skoraj vseh linijah ASC ter pri vseh testiranih koncentracijah mitoksantrona (razen pri ASC-T2 pri koncentraciji mitoksantrona 0,02 μM) (Sl. 18). Pri najnižji koncentraciji mitoksantrona 0,02 μM se je statistično značilno ($p < 0,01$) najbolj povečal odstotek senescentnih celic pri ASC-T1, in sicer za 17,75 %. Splošno je ponovno prisoten trend povečevanja stopnje senescence ob povečevanju koncentracije sprožitelja senescence. Kljub temu lahko opazimo spremembo trenda pri celičnih linijah ASC-T1 in ASC-A2 ob izpostavitvi visokim koncentracijam mitoksantrona, saj tu odstotek senescentnih celic s povečevanjem koncentracije mitoksantrona tudi pada. Tako se je pri ASC-T1 in ASC-A2 pri koncentraciji mitoksantrona 0,2 μM statistično značilno ($p < 0,01$) najbolj povečal odstotek senescentnih celic, in sicer pri ASC-T1 za 38,71 % ter pri ASC-A2 za 16,69 %. Nekatere celične linije kažejo manjši odziv ob izpostavitvi sprožitelju senescence. Primer sta celični liniji ASC-T3 in ASC-A2 (predstavnici ASC celic s hitrejšo, uspešnejšo rastjo), pri katerih je moč opaziti občutno manjši vpliv mitoksantrona na povečano stopnjo senescence. Pri ASC-T3 ob izpostavitvi mitoksantronu (koncentracija 0,6 μM) se je statistično značilno ($p < 0,05$) povečal odstotek senescentnih celic le za 16,47 % ter pri ASC-A2 le za 16,69 % (koncentracija mitoksantrona 0,2 μM ; $p < 0,01$).

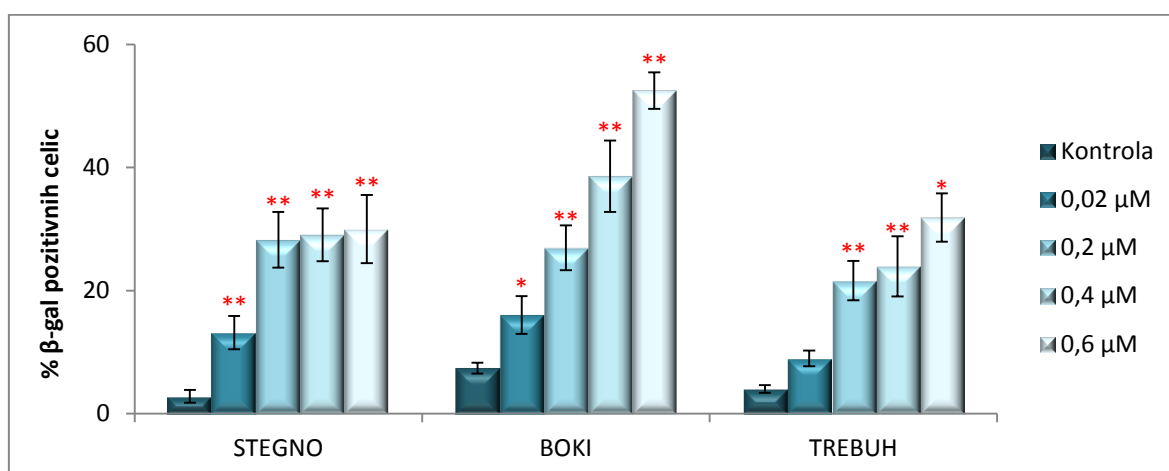


Slika 18: Vpliv mitoksantrona na stopnjo senescence mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja. Celice na 7. pasaži, izolirane iz treh telesnih lokacij, tj. stegna (T), bokov (H) in trebuha (A). $p < 0,05 = *$ in $p < 0,01 = **$.

4.2.2 Vpliv mitoksantrona na stopnjo senescence ASC glede na telesno lokacijo

Vpliv sprožitelja senescence smo ovrednotili tudi pri merjenju stopnje senescence ASC glede na telesno lokacijo. Tudi tukaj smo izračune naredili na enak način kot pri določanju stopnje proliferacije celic. Povprečne rezultate smo pridobili tako, da smo za vsako testirano koncentracijo sprožitelja senescence izračunali povprečje meritev treh oziroma dveh celičnih linij, ki so pripadale isti telesni lokaciji.

Rezultati kažejo, da se je glede na kontrolo pri vseh treh telesnih lokacijah (stegno, boki, trebuh) pri skoraj vseh testiranih koncentracijah mitoksantrona povečal odstotek senescentnih celic (razen v primeru trebuha pri koncentraciji 0,02 μM) (Sl. 19). Tudi tukaj velja pravilo, da se s povečevanjem koncentracije sprožitelja povečuje tudi delež senescentnih ASC. Pri koncentraciji mitoksantrona 0,02 μM se je statistično značilno ($p < 0,01$) najbolj povišal odstotek senescentnih celic tistih ASC, ki so bile izolirane iz maščevja stegna, in sicer za 10,33 %. Rezultati vpliva mitoksantrona na stopnjo senescence oziroma delež β -gal pozitivnih celic kažejo, da je bil izmed vseh celičnih linij vpliv mitoksantrona na ASC, izoliranih iz maščevja bokov, največji, in sicer se je pri izpostavitvi celic mitoksantronu statistično značilno ($p < 0,01$) odstotek senescentnih celic povečal za 45,08 %. Po drugi strani je mitoksantron najmanj vplival na senescenco ASC, izoliranih iz maščevja stegna, saj se je v tem primeru delež senescentnih celic statistično značilno ($p < 0,01$) povečal za 27,17 %, vendar tukaj naj pripomnimo, da je imel mitoksantron podobno majhen vpliv tudi na senescenco ASC, izoliranih iz maščevja trebuha, saj se je tu odstotek senescentnih celic statistično značilno ($p < 0,05$) povečal za 27,84 %.

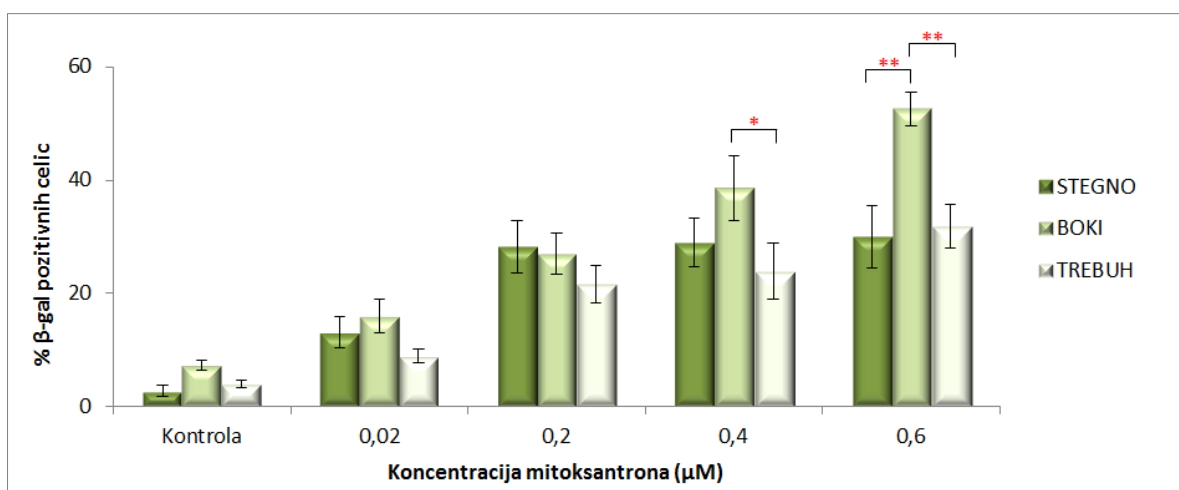


Slika 19: Vpliv mitoksantrona na stopnjo senescence mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja glede na telesno lokacijo. Celice na 7. pasaži. Stegno – ASC-T1, ASC-T2, ASC-T3; boki – ASC-H1, ASC-H2, ASC-H3; trebuh – ASC-A1, ASC-A2. $p < 0,05 = *$ in $p < 0,01 = **$.

Na Sl. 20 vidimo, da je bila pri vseh testiranih koncentracijah mitoksantrona stopnja senescence najnižja pri celičnih linijah ASC, izoliranih iz trebuha, razen v primeru koncentracije mitoksantrona 0,6 μM . Razliko smo določili med ASC, izoliranimi iz maščevja trebuha in bokov, in sicer tako pri koncentraciji mitoksantrona 0,4 μM ($p < 0,05$), kjer je bilo 14,64 % več celic senescentnih pri ASC, izoliranih iz maščevja trebuha, kot pri ASC, izoliranih iz maščevja bokov, kot tudi pri koncentraciji mitoksantrona 0,6 μM ($p < 0,01$), kjer je bilo 20,60 % več celic senescentnih pri ASC, izoliranih iz maščevja trebuha v primerjavi z ASC, izoliranimi iz maščevja bokov. Glede na dejstvo, da razlike v stopnji senescence med ASC, izoliranimi iz maščevja trebuha in ASC, izoliranimi iz maščevja bokov, pri nižjih koncentracijah Mxt ni bilo ter da je obenem ta razlika z naraščanjem koncentracije Mxt med obema skupinama ASC naraščala (ASC, izolirane iz maščevja trebuha, so manj senescentne), lahko sklepamo, da so ASC, izolirane iz maščevja trebuha, v primerjavi z ASC, izoliranimi iz maščevja bokov, bolj odporne na vpliv Mxt in tako bolj kvalitetne. Poleg tega smo pri najvišji koncentraciji mitoksantrona opazili tudi, da je statistično značilna ($p < 0,01$) razlika v odstotku senescentnih celic prisotna tudi med linijami ASC, izoliranimi iz maščevja bokov in ASC, izoliranimi iz maščevja stegna, in sicer je ta 22,48 % v prid ASC, izoliranih iz maščevja bokov.

Iz rezultatov lahko ugotovimo tudi, da imajo najvišjo stopnjo senescence linije ASC, izolirane iz maščevja bokov, saj je ta najvišja pri skoraj vseh testiranih koncentracijah

mitoksantrona, razen pri koncentraciji 0,2 μM (Sl. 20). Rezultati torej kažejo, da je mitoksantron najbolj vplival na povišano stopnjo senescence pri ASC, izoliranih iz maščevja bokov, kar pomeni, da so bile te celične linije najmanj odporne in so zato manj kvalitetne.



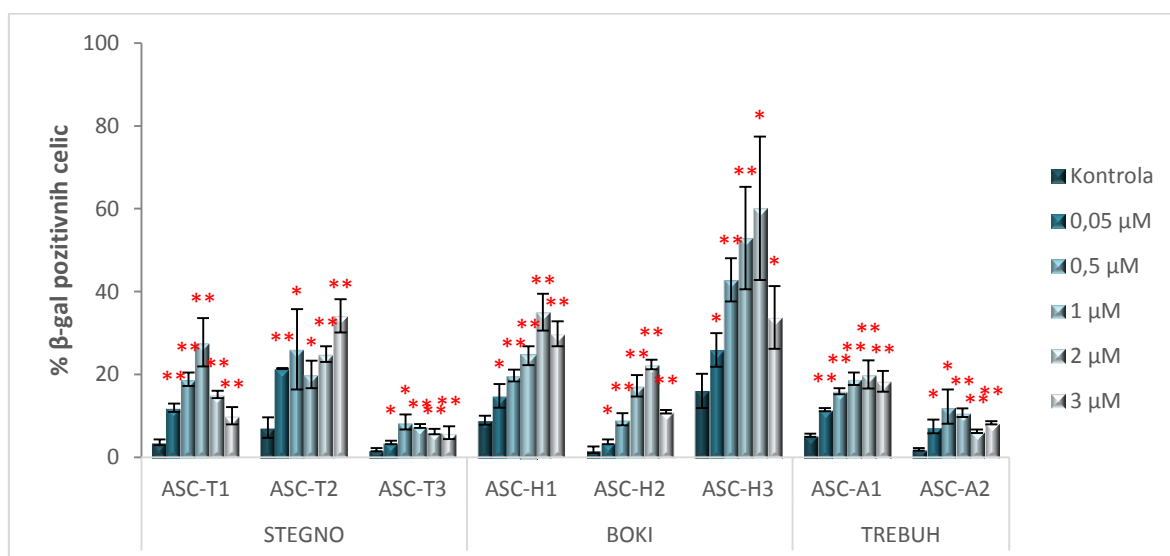
Slika 20: Vpliv različnih koncentracij mitoksantrona na stopnjo senescence ASC izoliranih iz maščevja stegna, bokov in trebuha ter primerjava med telesnimi lokacijami. Celice na 7. pasaži. Stegno – ASC-T1, ASC-T2, ASC-T3; boki – ASC-H1, ASC-H2, ASC-H3; trebuh – ASC-A1, ASC-A2. $p < 0,05 = *$ in $p < 0,01 = **$.

4.2.3 Vpliv trihostatina A (TSA) na stopnjo senescence različnih linij ASC

V primeru izpostavitve ASC sprožitelju senescence TSA opazimo vpliv pri vseh testiranih linijah ASC ter pri vseh testiranih koncentracijah TSA (Sl. 21). V tem primeru trend povečevanja stopnje senescence ASC ob povečevanju koncentracije TSA ni zelo izrazit, saj pri nobeni od testiranih linij ASC pri najvišji koncentraciji TSA nismo obenem določili tudi najvišje stopnje senescence (razen pri ASC-T2).

Pri najnižji koncentraciji TSA, tj. 0,05 μM , se je statistično značilno ob vrednosti $p < 0,01$ povečal odstotek senescentnih celic pri ASC-T1 za 8,36 % in pri ASC-T2 za 14,22 % (izolirane iz maščevja stegna) ter pri ASC-A1 za 6,17 % (izolirane iz maščevja trebuha). Če primerjamo tiste koncentracije TSA, pri katerih smo pri določenih ASC določili najvišji odstotek senescentnih celic, ugotovimo, da ima TSA največji vpliv pri ASC-T2, kjer se je pri koncentraciji TSA 3 μM povečal odstotek senescentnih celic za 26,97 %. Na katere linije ASC je imel TSA najmanjši vpliv, dejansko težko sklepamo glede na pridobljene

rezultate, saj povečana koncentracija TSA enoznačno ne pomeni višji odstotek senescentnih celic. Sklepamo, da je to odstopanje povezano z večjo umrljivostjo celic ob izpostavitvi visokim koncentracijam trihostatina A in posledično oteženemu štetju modro obarvanih celic. Ob primerjavi tistih koncentracij TSA, pri katerih smo pri posameznih ASC določili najvišji delež senescentnih celic, lahko vseeno ugotovimo, da TSA (pri koncentraciji 0,5 μM) najmanj vpliva na ASC-T3, saj povzroči za 6,66 % več senescentnih celic v primerjavi s kontrolo. Naslednja taka celična linija je ASC-A2, kjer je TSA (s koncentracijo 0,5 μM) povzročil za 10,30 % več ASC v senescentnem stanju v primerjavi s kontrolo. Upoštevajoč, da smo kljub temu pri vseh testiranih koncentracijah TSA opazili razliko v odstotku senescentnih celic glede na kontrolo, lahko trdimo, da ima TSA manjši vpliv na celični liniji ASC-T3 in ASC-A2 (predstavnici ASC celic z uspešnejšo rastjo), kar pomeni, da sta bolj odporni in posledično bolj kvalitetni.

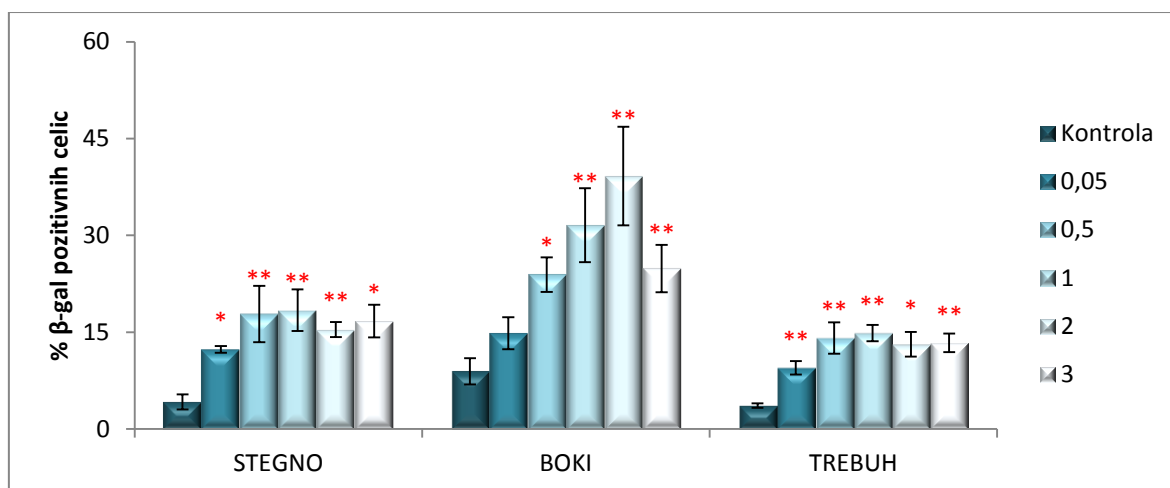


Slika 21: Vpliv trihostatina A na stopnjo senescence mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja. Celice na 7. pasaji, izolirane iz treh telesnih lokacij, tj. stegna (T), bokov (H) in trebuha (A). $p < 0,05 = *$ in $p < 0,01 = **$.

4.2.4 Vpliv trihostatina A (TSA) na stopnjo senescence ASC glede na telesno lokacijo

Sl. 22 in 23 predstavljata rezultate določanja vpliva trihostatina A na stopnjo senescence ASC glede na telesno lokacijo. Zopet opazimo, da so se pri vseh treh telesnih lokacijah (stegno, boki, trebuh) glede na kontrolo pri skoraj vseh koncentracijah sprožitelja

senescence deleži β -gal pozitivnih oziroma senescentnih celic (razen v primeru bokov pri koncentraciji sprožitelja 0,05 μ M) povečali (Sl. 22). Statistično značilno ($p < 0,05$) se je pri najmanjši koncentraciji TSA 0,05 μ M povečal odstotek senescentnih celic pri ASC, izoliranih iz maščevja stegna, in sicer za 8,11 %. Najbolj se je delež β -gal pozitivnih celic povečal pri ASC, izoliranih iz bokov, pri izpostavitvi celic koncentraciji TSA 2 μ M ($p < 0,01$). V tem primeru se je odstotek senescentnih celic povečal za 30,26 %. Medtem ko smo najmanjši porast β -gal pozitivnih celic opazili pri ASC, izoliranih iz maščevja trebuha, pri koncentraciji TSA 1 μ M ($p < 0,01$). V tem primeru se je odstotek senescentnih celic povečal za 11,26 %.

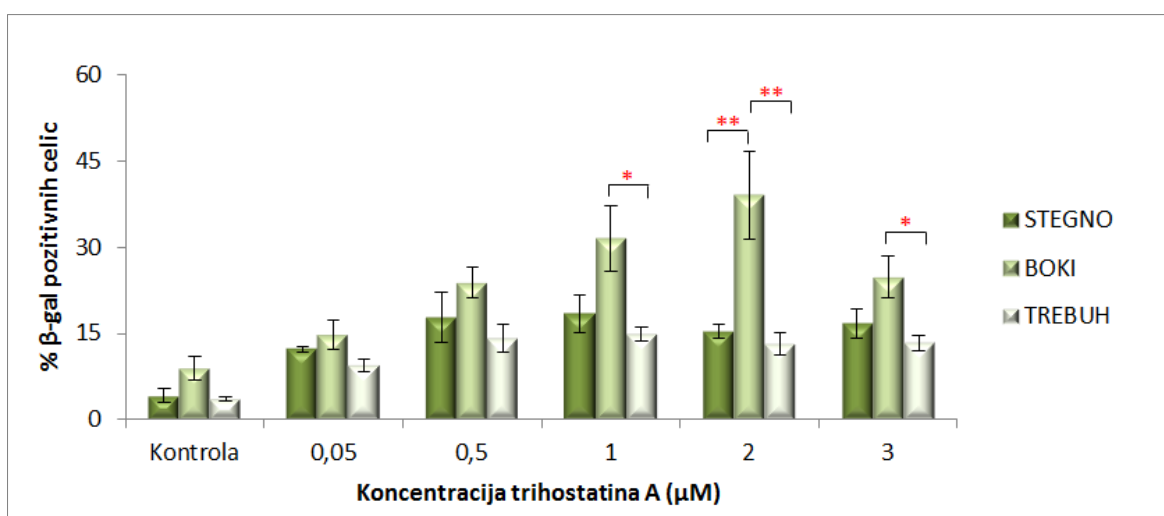


Slika 22: Vpliv trihostatina A na stopnjo senescence mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja glede na telesno lokacijo. Celice na 7. pasaži. Stegno – ASC-T1, ASC-T2, ASC-T3; boki – ASC-H1, ASC-H2, ASC-H3; trebuh – ASC-A1, ASC-A2. $p < 0,05 = *$ in $p < 0,01 = **$.

V primeru izpostavitve celic sprožitelju senescence trihostatinu A sta se liniji ASC, ki sta bili izolirani iz maščevja trebuha, najmanj odzivali na sproženje senescence, saj rezultati kažejo, da so v primerjavi z ASC, izoliranimi iz maščevja bokov, manj senescentni pri treh od petih testiranih koncentracijah TSA (Sl. 23). Pri koncentraciji TSA 1 μ M je odstotek senescentnih celic pri linijah ASC, izoliranih iz maščevja trebuha, statistično značilno ($p < 0,05$) manjši od odstotka senescentnih celic pri ASC, izoliranih iz maščevja bokov, za 16,69 %, pri koncentraciji TSA 2 μ M za 26,05 % ($p < 0,01$) in pri koncentraciji TSA 3 μ M za 11,52 % ($p < 0,05$). Ob primerjavi stopnje senescence med ASC, izoliranimi iz maščevja trebuha, in ASC, izoliranimi iz maščevja stegna, prav tako ugotovimo, da je odstotek senescentnih celic glede na kontrolo bolj naraščal v primeru ASC, izoliranih iz maščevja

stegna, saj je razlika v odstotku β -gal pozitivnih celic med obema skupinama ASC z začetnih 0,59 % pri kontroli narasla do 3,72 % pri koncentraciji TSA 0,5 μ M. Podobna razlika v odstotku senescentnih celic med ASC, izoliranimi iz maščevja trebuha, in ASC, izoliranimi iz maščevja stegna, se ohrani tudi pri najvišjih treh koncentracijah TSA (1 μ M, 2 μ M in 3 μ M).

Med ASC, izoliranimi iz maščevja bokov, in ASC, izoliranimi iz maščevja stegna, opazimo statistično značilno ($p < 0,01$) razliko ob izpostavitvi celic koncentraciji TSA 2 μ M (Sl. 23). V tem primeru je bil odstotek senescentnih celic pri ASC, izoliranih iz maščevja bokov, višji za 23,78 % kot pri ASC, izoliranih iz maščevja stegna. Prav linije ASC, izolirane iz maščevja bokov, so pri izpostavitvi trihostatinu A pokazale najmanjšo odpornost na vpliv sprožitelja senescence, enako kot v primeru sproženja senescence z mitoksantronom. Sklepamo, da so te celične linije ASC z nižjo kvaliteto.



Slika 23: Vpliv trihostatina A na stopnjo senescence ASC izoliranih iz maščevja stegna, bokov in trebuha ter primerjava med telesnimi lokacijami. Celice na 7. pasaži. Stegno –ASC-T1, ASC-T2, ASC-T3; boki –ASC-H1, ASC-H2, ASC-H3; trebuh –ASC-A1, ASC-A2. $p < 0,05 = *$ in $p < 0,01 = **$.

5 RAZPRAVA

Uporaba mezenhimskih matičnih celic iz maščevja v regenerativni medicini postaja vedno bolj pogosta, saj so ASC izjemno uporabne v zdravljenju regeneracije tkiv pri poškodbah tkiva in pri številnih bolezenskih stanjih. Izvajajo se tudi klinične študije, ki preučujejo uporabnost ASC v proti-rakavih terapijah. Poleg znanih bioloških značilnosti ASC je za namene zdravljenja pomembno poznati tudi njihovo kvaliteto. Med pokazatelje kvalitete ASC sodita njihova proliferacijska sposobnost ter pojav senescence tekom deljenja in rasti.

Znano je, da lahko ASC pridobivamo iz katere koli vrste belega maščobnega tkiva. Pri ljudeh je maščobno tkivo v prvi vrsti porazdeljeno v podkožne (subkutane) in trebušne (visceralne) depoje, za katere je značilno, da imajo različne biokemijske in funkcionalne lastnosti (Russo in sod., 2013). V preteklosti so različni avtorji že dokazali, da obstajajo razlike med ASC, izoliranimi iz subkutanega ali visceralnega maščevja, in sicer v sposobnosti adipogeneze, stopnji proliferacije, dovzetnosti na apoptozo in vplivu tiazolidindionov (TZD) na proliferacijo ASC (Macotela in sod., 2012; Tchkonja in sod., 2002 in 2006; Kelly in sod., 1999). Ugotovili so, da imajo ASC, izolirane iz podkožnega maščobnega tkiva, največjo aktivnost PPAR- γ (posledično boljšo sposobnost adipogeneze) in večjo akumulacijo lipidov, so najmanj podvržene apoptozi, obenem pa imajo TZD največji vpliv na njihovo hitrejšo proliferacijo in boljšo diferenciacijo (Macotela in sod., 2012; Tchkonja in sod., 2002). Upoštevati moramo dejstvo, da smo v našo raziskavo vključili zgolj vzorce podkožnega maščevja. Na predelih stegna in bokov je celotno maščobno tkivo sestavljeno iz podkožnih depojev maščevja, medtem ko na predelu trebuha najdemo oba tipa maščobnega tkiva.

Zaradi potrebe po ovrednotenju kvalitete ASC smo se v magistrskem delu usmerili v razvoj metodologije ovrednotenja kvalitete mezenhimskih matičnih celic izoliranih iz maščevja, in sicer smo se osredotočili na ASC, izolirane iz maščevja treh telesnih lokacij, tj. stegna, bokov in trebuha. To smo storili glede na oceno proliferacijskih sposobnosti ASC ter dovzetnosti na kemijsko sproženo senescenco. Predpostavljamo, da so ASC, ki imajo večje proliferacijske sposobnosti ter so manj dovzetne na sproženo senescenco, bolj kvalitetne in primerne za uporabo v kliniki. Senescenca je stanje stabilne in dolgotrajne

izgube proliferativnih sposobnosti celic, kljub temu pa te ostanejo še naprej metabolno aktivne. V skladu s Hayflickovo limito vemo, da se tekom *in vitro* gojenja človeških celic njihove telomere, katerih naloga je, da ščitijo konce kromatid na kromosomih, krajšajo, kar sčasoma povzroči, da se celice prenehajo deliti. Telomere se krajšajo, ker DNA polimeraza ni sposobna v celoti podvojevati zaporedja DNA. Ko telomere dosežejo svojo minimalno dolžino in zato ne zmorejo več opravljati svoje funkcije, to izzove popravilne mehanizme za poškodbe DNA. Eden izmed označevalcev omenjenih mehanizmov je fosforilirana oblika histona H2AX (γ -H2AX). Dodatno se v senescentnih celicah aktivirata z DNA poškodbami povezani kinazi ATM in ATR, ki ob povečanem signalu poškodb DNA aktivirata kinazi CHK2 in CHK1. Komunikacijo med dejavniki, ki so povezani s poškodbami DNA, ter celičnim ciklom omogočata fosforilacija in aktivacija proteinov celičnega cikla, kot so CDC25 (družina fosfataz) in p53 (Kuilman in sod., 2015). Naše delo je potekalo tako, da smo preizkusili dva znana kemijska sprožitelja senescence, mitoksantron in trihostatin A (TSA), ki sicer delujeta na različen način in preko različnih mehanizmov. Za mitoksantron je znano, da se veže na dvoverižno molekulo DNA z interkalacijo ter inhibira DNA topoizomerozo II, kar povzroči nastanek eno- in dvoverižnih prelomov DNA (Kapuscinski in Darzynkiewicz, 1986). Mitoksantron povzroča zastoj celičnega cikla v fazi G₁ (Kapuscinski in Darzynkiewicz, 1986) in G₂ (Khan in sod., 2010). Po drugi strani je TSA inhibitor histonskih deacetilaz (HDACI) razreda I in II, ki onemogoča pravilno zvijanje strukture kromatina. Na ta način vpliva na sposobnost vezave transkripcijskih faktorjev na DNA zaporedja in povzroči zaustavitev celičnega cikla, vendar pa je danes o mehanizmih epigenetskih modifikatorjev, kot je TSA, ki do tega privedejo, še vedno malo znanega (Saini in sod., 2014).

Rezultati naše raziskave so pokazali, da oba testirana sprožitelja senescence, mitoksantron in TSA, znižata proliferacijsko sposobnost ASC in tako spodbujata celice, da preidejo v senescenco. Preostala proliferacijska sposobnost ASC po sproženju senescence je koncentracijsko odvisna v primeru izpostavitve ASC obema sprožiteljema senescence, in sicer je razlika v znižanju stopnje proliferacije prisotna od koncentracije mitoksantrona 0,2 μ M dalje ter v primeru TSA od 0,5 μ M dalje. Potrebno je poudariti, da ta vpliv ni enako močno prisoten pri vseh celičnih linijah, saj obstajajo vidne razlike med celičnimi linijami, ki so izolirane iz enake anatomske lokacije. Opazili smo torej veliko variabilnost v

preostali proliferacijski sposobnosti med ASC, neodvisno od lokacije odvzetega maščevja, tj. biološko variabilnost v odgovoru na sproženje senescence pri ASC. Vse testirane koncentracije mitoksantrona in TSA so povišale tudi stopnjo sprožene senescence v vseh linijah ASC, ki so bile izpostavljene posameznemu sprožitelju senescence. Tudi ta vpliv je bil koncentracijsko odvisen in sorazmeren v primeru obeh sprožiteljev senescence. S tem smo potrdili hipotezo, da mitoksantron in TSA znižata proliferacijsko sposobnost ASC ter povzročita senescenco celic, ki je primerljiva s spontano senescenco.

Lastnosti mezenhimskih matičnih celic iz maščevja so odvisne od različnih parametrov. Dokazano lahko k razlikam v sposobnosti proliferacije (in diferenciacije) ASC doprinesejo različne spremenljivke kot so starost darovalca maščobnega tkiva (Hauner in Entenmann, 1991; van Harmelen in sod., 2003), indeks telesne mase darovalca (BMI) (Aust in sod., 2004; Jaiswal in sod., 1997) ter bolezenska stanja, kot sta osteoartritis in sladkorna bolezen (Barry, 2003; Murphy in sod., 2002; Ramsay in sod., 1995). V primeru ASC pa ima tudi anatomsko mesto izolacije celic pomemben vpliv na regenerativni potencial izoliranih celic (Choudhery in sod., 2015; Kološa in sod., v tisku). Potrebno se je zavedati, da imajo lahko ASC, izolirane iz maščevja, različno rast in morfologijo ter so posledično različne kvalitete za uporabo v celičnem zdravljenju tkiv. Na podlagi tega dejstva smo oblikovali hipotezo, v kateri smo domnevali, da med linijami ASC, izoliranimi iz maščevja na različnih telesnih predelih, obstajajo razlike v proliferacijski sposobnosti ASC, ki ostane po sproženi senescenci ter v dovzetnosti oziroma odpornosti na sproženo senescenco. Tekom gojenja linij ASC smo spremljali njihovo morfologijo, s testom MTT določili njihovo proliferacijo ter s testom SA- β -gal izmerili njihovo dovzetnost na sproženo senescenco. Kot primer dobro rastočih ASC se je izkazala celična linija ASC-A2 (celice izolirane iz maščevja trebuha). Prav tako so imele ASC vretenasto morfologijo, ki je značilna za mezenhimske matične celice. Prav pri ASC-A2 je imel mitoksantron najmanjši vpliv na znižanje proliferacije, medtem ko se je pri izpostavitvi celic TSA najmanj znižala stopnja proliferacije pri ASC-T3 (Sl. 13), ki so prav tako primer dobro rastočih ASC (celice izolirane iz maščevja stegna). Pri obeh celičnih linijah smo prav tako opazili občutno manjši vpliv sprožiteljev senescence mitoksantrona in TSA na stopnjo senescence (Sl. 18 in 21). Podobno večjo rast ob odsotnosti sprožiteljev senescence smo opazili pri celični liniji ASC-H2 (celice izolirane iz maščevja bokov), vendar sta imela oba sprožitelja

senescence prav na to celično linijo nepričakovano zelo velik vpliv. Stopnja proliferacije se je najbolj znižala ravno pri ASC-H2 pod vplivom mitoksantrona in TSA. Sklepamo, da sta celični liniji ASC-A2 in ASC-T3 primera kvalitetnejših mezenhimskih matičnih celic iz maščevja in sta posledično manj dovzetni za vpliv sprožiteljev senescence. V magistrski nalogi smo skušali dokazati, da med posameznimi linijami ASC obstajajo razlike v dovzetnosti na sproženo senescenco tudi glede na anatomsko lokacijo pridobitve ASC. Pričakovali smo torej, da bo telesna lokacija izoliranih ASC vplivala na njihov odziv ob izpostavitvi obema sprožiteljema senescence. Rezultati določanja stopnje senescence ASC so pokazali, da je bil izmed vseh celičnih linij vpliv mitoksantrona in TSA na celične linije, izolirane iz maščevja trebuha, najmanjši (Sl. 20 in 23). Sklepamo, da so te celice bolj kvalitetne, saj je bila preostala proliferacijska sposobnost ASC, izoliranih iz maščobnega tkiva trebuha, v primerjavi z drugima dvema telesnima lokacijama (stegno in boki), višja pri skoraj vseh koncentracijah sprožiteljev mitoksantrona in TSA (Sl. 10 in 15). Linije ASC, izolirane iz maščevja bokov, so pri izpostavitvi mitoksantronu pokazale najmanjšo odpornost na vpliv sprožitelja senescence (Sl. 20), enako kot v primeru sproženja senescence s TSA (Sl. 23). Sklepamo, da so te celične linije ASC nižje kvalitete. Ob primerjavi podkožnega maščobnega tkiva iz različnih anatomskih lokacij so številni avtorji ugotovili, da med ASC, izoliranimi iz različnih lokacij, prav tako obstajajo določene razlike. Schipper in sod. (2008) so dokazali, da je podkožno maščevje s predela trebuha manj dovzetno na apoptozo v primerjavi s podkožnim maščobnim tkivom s predela stegen, bokov in rok (Schipper in sod., 2008). Jurgens in sod. (2008) so preiskovali vpliv mesta izolacije ASC na donos oz. število izoliranih mezenhimskih matičnih celic. Ugotovili so, da obstaja razlika v izkoristku izolacije ASC med podkožnim maščobnim tkivom trebuha in podkožnim maščobnim tkivom iz predela bokov oziroma stegen. Izolati SVF, ki so bili pridobljeni iz trebušnega maščevja, so vsebovali več ASC. Razloge za to so med drugim pripisali različnemu številu izoliranih ASC v izolatih SVF iz različnih regij, saj so ASC, izolirane iz maščevja trebuha, dosegle 80 % - 90 % konfluenco po petih dneh gojenja, medtem ko so ASC, izolirane iz maščevja bokov oziroma stegna, dosegle enako konfluenco šele po 9 dneh gojenja, čeprav so bile vse celice na pasažo 0 nasajene z enako gostoto. Opažamo, da ugotovitve zgoraj navedenih avtorjev sovpadajo z rezultati naše raziskave. Trebušno maščevje se je v primerjavi s maščobnim tkivom iz predela stegen

oziroma bokov izkazalo kot boljši kandidat za mesto izolacije ASC za namene celičnih terapij (Jurgens in sod., 2008).

Rezultati naše raziskave so potrdili, da obstajajo razlike med ASC, izoliranimi iz različnih anatomskih lokacij podkožnega maščobnega tkiva, in sicer tako v preostali stopnji proliferacije kot tudi v dovzetnosti na kemijsko sproženo senescenco. Pri uporabi ASC za celične terapije v kliniki je zelo pomembno, da se zavedamo, da se maščevje na različnih predelih telesa razlikuje in da je ključnega pomena prava izbira anatomske lokacije za izolacijo ASC. Uporaba sprožene senescence se je izkazala kot primerna dopolnitev uveljavljenim metodam opredeljevanja lastnosti ASC. Za natančnejšo določitev kvalitete ASC, izoliranih iz različnih telesnih predelov, bi v nadaljnjih raziskavah vključili določevanje različnih označevalcev senescence celic ter na ta način dodatno potrdili, da kvalitetnejše celice izražajo manj za senescenco značilnih označevalcev. Ti vključujejo tako značilne morfološke spremembe senescentnih celic, saj celice postanejo večje, ploske in večjedrne (Parrinello in sod., 2003), kot tudi molekulske označevalce senescence, kot so i) povišano izražanje inhibitorjev od ciklina odvisnih kinaz (CDKs): p21^{WAF1}, p16^{INK4A} in p27^{KIP1}, ki zavirajo proliferacijo senescentnih celic in ii) vztrajno izražanje označevalcev odgovora na poškodbe DNA, kot je γ -H2AX (Zhao in sod., 2010). Boljše poznavanje in razumevanje lastnosti ASC, izoliranih iz različnih anatomskih lokacij maščobnih depojev, bo v največji meri pripomoglo k identifikaciji določenega vira maščobnega tkiva, ki bo najbolj primeren za specifične aplikacije v regenerativni medicini.

6 SKLEPI

- Ugotovili smo, da oba kemijska sprožitelja senescence, mitoksantron in TSA, znižata proliferacijsko sposobnost linij MSC iz maščevja, tako imenovanih ASC, in v njih sprožata senescenco, ki sovpada s spontano senescenco. Za oba sprožitelja senescence velja, da se s povečevanjem testirane koncentracije sprožitelja povečuje njen negativen vpliv na stopnjo proliferacije in pozitiven vpliv na stopnjo sprožene senescence pri ASC.
- Iz različnih telesnih predelov lahko izoliramo linije ASC, ki imajo različno hitrost rasti in se različno odzivajo na sproženje senescence. Naši rezultati potrjujejo, da obstajajo razlike v dovzetnosti na sproženo senescenco med linijami ASC, ki so bile izolirane tako iz istega telesnega predela kot tudi med linijami ASC, izoliranimi iz različnih telesnih predelov, vendar zaradi majhnega števila vzorcev podrobnejša statistična analiza ni bila mogoča.
- Iz rezultatov sklepamo, da so ASC, izolirane iz maščevja trebuha, bolj kvalitetne od ASC, izoliranih iz maščevja bokov in stegna, in so zato bolj primerne za nadaljnjo uporabo v kliniki za celične terapije. Kljub temu je za dokončno potrditev te ugotovitve potrebno v študijo vključiti več vzorcev izolatov ASC.
- Bodoče delo: Zaradi naraščajočih možnosti ASC za razvoj novih pristopov za celične terapije pri zdravljenju različnih bolezni bi bila potrebna enostavna, hitra in natančna metoda določitve kvalitete ASC. Nadaljnje raziskave v tej smeri bodo bodo vključevale podrobnejšo analizo proliferacijskih, senescentnih (določevanje morfoloških in molekularskih označevalcev) in diferenciacijskih sposobnosti ASC, izoliranih iz različnih anatomskih lokacij.

7 POVZETEK

Človeško maščevje predstavlja obetaven vir za darovanje tkiva pri celičnih transplantacijah zaradi dejstev, da ga je razmeroma veliko na voljo, prav tako je pridobivanje maščobnega tkiva razmeroma enostavno. Uporaba maščevja v kliniki vključuje rekonstruktivne in kozmetične posege, prav tako ga uporabljajo za zdravljenje različnih poškodb. Matične celice, izolirane iz maščobnega tkiva, se lahko diferencirajo v številne celične tipe, in sicer v adipogeno, osteogeno, hondrogeno, miogeno in neurogeno celično linijo. Rezultati številnih raziskav v preteklosti kažejo, da imajo ASC izjemen terapevtski potencial za uporabo v tkivnem inženirstvu in celičnih terapijah.

V naši raziskavi smo se osredotočili na razvoj hitre in enostavne metode za opredelitev kvalitete MSC, izoliranih iz različnih telesnih predelov maščobnega tkiva. Ocenjevali smo dovzetnost ASC na sproženo senescenco ter v ta namen preizkusili dva sprožitelja senescence, tj. mitoksantron in trihostatin A (TSA). V delu smo ovrednotili njun vpliv na stopnjo preostale proliferacije in sproženje senescence pri ASC. Ugotovili smo, da sta oba sprožitelja senescence vplivala na znižanje stopnje proliferacije pri vseh linijah ASC v odvisnosti od koncentracije ter v celicah sprožila senescenco, ki sovpada s spontano senescenco. Naši rezultati so potrdili tudi, da med linijami ASC obstajajo razlike tako v stopnji preostale proliferacije kot tudi v dovzetnosti na sproženo senescenco. Te so prisotne tako znotraj določene anatomske lokacije kot tudi med posameznimi telesnimi predeli maščevja. Celični liniji ASC, izolirani iz trebušnega maščevja, sta se izkazali za bolj odporni na vpliv mitoksantrona, saj je imel le-ta najmanjši vpliv na znižanje stopnje proliferacije pri ASC-A2. Ob primerjavi rezultatov vpliva mitoksantrona in TSA na sproženje senescence pri linijah ASC smo ugotovili, da imata oba sprožitelja senescence primerljiv vpliv na ASC in sta oba imela najmanjši vpliv na povišanje stopnje sprožene senescence pri izpostavitvi celicam ASC-A2 (izolirane iz maščevja trebuha). Prav tako so rezultati vplivov sprožiteljev senescence glede na telesno lokacijo izvora ASC potrdili, da imata mitoksantron in TSA najmanjši vpliv na ASC, izolirane iz maščobnega tkiva trebuha, največji vpliv pa sta imela pri ASC, izoliranih iz maščevja bokov.

V naši raziskavi smo na podlagi rezultatov prišli do ugotovitev, da so ASC, izolirane iz maščevja trebuha, bolj odporne na sprožitelja senescence mitoksantron in TSA ter zato predstavljajo kvalitetnejše celične linije. ASC, izolirane iz maščobnega tkiva bokov, pa so se izkazale kot manj odporne celice in posledično manj kvalitetne. Da bi lahko natančneje opredelili razlike v lastnostih ASC, izoliranih iz različnih telesnih predelov darovalcev, bi se v prihodnjih raziskavah osredotočili na natančnejšo opredelitev prisotnosti označevalcev sprožene senescence pri ASC, na določitev sposobnosti adipogeneze in podvrženosti celic apoptozi ter na določevanje diferenciacijskega potenciala ASC, izoliranih iz različnih telesnih lokacij maščevja. Vsekakor bo podrobnejše poznavanje značilnosti različnih ASC glede na njihov anatomske izvor v prihodnosti ključnega pomena za izvajanje ciljno oblikovanih celičnih terapij v regenerativni medicini.

8 VIRI

- Aust L., Devlin B., Foster S. J. 2004. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy*, 6: 7–14
- Baer P. C., Schubert R., Bereiter-Hahn J., Plosser M., Geiger H. 2009. Expression of a functional epidermal growth factor receptor on human adipose-derived mesenchymal stem cells and its signaling mechanism. *European journal of cell biology*, 88: 273-283
- Barry F. P. 2003. Mesenchymal stem cell therapy in joint disease. *Novartis foundation symposia*, 249: 86–96
- Barry F. P., Murphy J. M. 2004. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36: 568-584
- Bassaneze V., Miyakawa A. A., Krieger J. E. 2008. A quantitative chemiluminescent method for studying replicative and stress-induced premature senescence in cell cultures. *Analytical biochemistry*, 372, 2: 198-203
- Beltrami A. P., Cesselli D., Beltrami C. A. 2011. At the stem of youth and health. *Pharmacology & therapeutics*, 129, 1: 3-20
- Bennetti R., Garcia-Cao M., Blasco M. A. 2007. Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. *Nature genetics*, 39: 243-250
- Bhattacharyya J., Basu A., Kumar G. S. 2014. Intercalative interaction of the anticancer drug mitoxantrone with double stranded DNA: a calorimetric characterization of the energetics. *The journal of chemical thermodynamics*, 75: 45-51
- Blasco M. A. 2007. Telomere length, stem cells and aging. *Nature chemical biology*, 3: 640-649

- Biotek. 2009. Quantifying cytotoxicity of thiostrepton on mesothelioma cells using MTT assay and the epoch microplate spectrophotometer. Biotek Instruments, Winooski, Vermont.
<http://www.biotek.com/resources/articles/quontification-cell-viability-epoch.html> (14. 6. 2014)
- Bongso A., Lee E. H. 2005. Stem cells: their definition, classification and sources. V: Stem cells: from benchtop to bedside. Brenner S., Yeo P. (eds.). Singapore, World Scientific Publishing: 1-13
- Bourin P., Bunnell B. A., Casteilla L., Dominici M., Katz A. J., March K. L., Redl H., Rubin J. P., Yoshimura K., Gimble J. M. 2013. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15: 641-648
- Cahan P., Daley G. Q. 2013. Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity. *Nature reviews, molecular cell biology*, 14: 357-368
- Campisi J. 2007. Ageing and cancer cell biology, 2007. *Aging cell*, 6: 261-263
- Cao Y., Sun Z., Liao L., Meng Y., Han Q., Zhao R. C. 2005. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells *in vitro* and improve postnatal neovascularization *in vivo*. *Biochemical and biophysical research communications*, 332: 370-379
- Centeno C. J. 2014. Clinical challenges and opportunities of mesenchymal stem cells in musculoskeletal medicine. *PM & R*, 6, 1: 70-77
- Chen Q. M., Liu J., Merrett J. B. 2000. Apoptosis or senescence-like growth arrest: influence of cell-cycle position, p53, p21 and bax in H₂O₂ response of normal human fibroblasts. *The biochemical journal*, 347, 2: 543-551

- Cheng K.-H., Kuo T.-L., Kuo K.-K., Hsiao C.-C. 2011. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and current application in regeneration medicine. *Genomic medicine, biomarkers and health sciences*, 3, 2: 53-62
- Choudhery M. S., Badowski M., Muise A., Pierce J., Harris D. T. 2015. Subcutaneous adipose tissue-derived stem cell utility is independent of anatomical harvest site. *BioResearch Open Access*, 4, 1: 131-145
- Choumerianou M. D., Dimitriou H., Kalmanti M. 2008. Stem Cells: Promises Versus Limitations. *Tissue engineering*, 14, 1: 53-60
- Coppé J.-P., Patil C. K., Rodier F., Sun Y., Muñoz D. P., Goldstein J., Nelson P. S., Desprez P.-Y., Campisi J. 2008. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLOS biology*, 6, 12: 301
- Cristancho A. G., Lazar M. A. 2011. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nature reviews, molecular cell biology*, 12: 722-734
- d'Adda di Fagagna F., Reaper P. M., Clay-Farrace L., Fiegler H., Carr P., Von Zglinicki T., Saretzki G., Carter N. P., Jackson S. P. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, 426, 6963: 194-198
- De Vasconcellos Machado M. C., Da Silva Telles P. D., Nascimento I. L. O. 2013. Immunological characteristics of mesenchymal stem cells. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 35: 62-67
- Deng Y., Chan S. S., Chang S. 2008. Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection. *Nature reviews cancer*, 8: 450-458
- Di Leonardo A., Linke S. P., Clarkin K., Wahl G. M. 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & development*, 8, 21: 2540-2551

Di Micco R., Cicalese A., Fumagalli M., Dobрева M., Verrecchia A., Pelicci P. G., d'Adda di Fagagna F. 2008. DNA damage response activation in mouse embryonic fibroblasts undergoing replicative senescence and following spontaneous immortalization. *Cell cycle*, 7, 22: 3601-3606

Dimri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E. E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 20: 9363-9367

Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 4: 315-317

Dumont P., Burton M., Chen Q. M., Gonos E. S., Fripiat C., Mazarati J. B., Eliaers F., Remacle J., Toussaint O. 2000. Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast. *Free radical biology & medicine*, 28, 3: 361-373

Estrov Z. 2009. Stem cells and somatic cells: reprogramming and plasticity. *Clinical lymphoma & myeloma*, 9, 3: 319-328

Friedenstein A.J., Petrakova K.V., Kurolesova A.I., Frolova G.P. 1968. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6, 2: 230-247

Furno D. L., Pellitteri R., Graziano A. C., Giuffrida R., Vancheri C., Gili E., Cardile V. 2013. Olfactory ensheathing cells (OEC)- and neuroblastoma B104 cell line-conditioned media promotes differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue toward a neural phenotype. *Journal of cellular physiology*, elektronska objava pred tiskano verzijo.

- Gary R. K., Kindell S. M. 2005. Quantitative assay of senescence-associated β -galactosidase activity in mammalian cell extracts. *Analytical biochemistry*, 343, 2: 329-334
- Ghorbani A., Jalali S. A., Varedi M. 2014. Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method. *Tissue and cell*, 46, 1: 54-58
- Gomillion C. T., Burg K. J. 2006. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*, 27: 6052-6063
- Gonos E. S., Derventzi A., Kveiborg M., Agiostratidou G., Kassem M., Clark B. F., Jat P. S., Rattan S. I. 1998. Cloning and identification of genes that associate with mammalian replicative senescence. *Experimental cell research*, 240, 1: 66-74
- Gu C., Castellino A., Chan J. Y., Chao M. V. 1998. BRE: a modulator of TNF-alpha action. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12, 12: 1101-1108
- Hayflick L., Moorhead P.S. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25: 585-621
- Hampel B., Malisan F., Niederegger H., Testi R., Jansen-Dürr P. 2004. Differential regulation of apoptotic cell death in senescent human cells. *Experimental gerontology*, 39, 11-12: 1713-1721
- Hampel U., Klonisch T., Sel S. 2013. Insulin-like factor 3 promotes wound healing at the ocular surface. *Endocrinology*, 154: 2034-2045
- Han-Tsung L., Chien-Tzung C. 2014. Osteogenic potential: comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells. *World journal of stem cells*, 6, 3: 288-295
- Hauner H., Entenmann G. 1991. Regional variation of adipose differentiation in cultured stromal-vascular cells from the abdominal and femoral adipose tissue of obese women. *International journal of obesity*, 15: 121-126

Herbig U., Jobling W. A., Chen B. P., Chen D. J., Sedivy J. M. 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Molecular cell*, 14, 4: 501-513

Horwitz E. M. 2003. Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Archives of medical research*, 34, 6: 600-606

Hutt D.M., Herman D., Rodrigues A.P., Noel S., Pilewski J.M., Matteson J., Hoch B., Kellner W., Kelly J.W., Schmidt A., Thomas P.J., Matsumura Y., Skach W.R., Gentsch M., Riordan J.R., Sorscher E.J., Okiyonedo T., Yates J.R. 3rd, Lukacs G.L., Frizzell R.A., Manning G., Gottesfeld J.M., Balch W.E. 2010. Reduced histone deacetylase 7 activity restores function to misfolded CFTR in cystic fibrosis. Supplementary information. *Nature chemical biology*, 6, 1: 25-33

Irmeler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J. L., Schröter M., Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French L. E., Tschopp J. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*, 388, 6638: 190-195

Itahana K., Campisi J., Dimri G. P. 2004. Mechanisms of cellular senescence in human and mouse cells. *Biogerontology*, 5, 1: 1-10

Jackson J. G., Pereira-Smith O. M. 2006. p53 is preferentially recruited to the promoters of growth arrest genes p21 and gadd45 during replicative senescence of normal human fibroblasts. *Cancer research*, 66, 17: 8356-8360

Jaiswal N., Haynesworth S. E., Caplan A. I., Bruder S. P. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry*, 64: 295-312

Jurgens W.J.F.M., Oedayrajsingh-Varma M.J., Helder M.N., ZandiehDoulabi B., Schouten T.E., Kuik D.J., Ritt M.J.P.F., van Milligen F.J. 2008. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell tissue research*, 332: 415-426

Kang S. G., Shinojima N., Hossain A., Gumin J., Yong R. L., Colman H., Marini F., Andreeff M., Lang F. F. 2010. Isolation and perivascular localization of mesenchymal stem cells from mouse brain. *Neurosurgery*, 67: 711-720

Kapur S. K., Katz A. J. 2013. Review of the adipose derived stem cells secretome. *Biochimie*, 5: 103-110

Kapuscinski J., Darzynkiewicz Z. 1986. Relationship between the pharmacological activity of antitumor drugs Ametantrone and mitoxantrone (Novatrone) and their ability to condense nucleic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83, 17: 6302-6306

Khan S. N., Lal S. K., Kumar P., Khan A. U. 2010. Effect of mitoxantrone on proliferation dynamics and cell-cycle progression. *Bioscience reports*, 30: 375-381

Kim W. S., Park B. S., Sung J. H. 2009. The wound-healing and antioxidant effects of adipose-derived stem cells. *Expert opinion on biological therapy*, 9: 879-887

Kelly I. E., Han T. S., Walsh K., Leam M. E. 1999. Effects of a thiazolidinedione compound on body fat and fat distribution of patients with type 2 diabetes. *Diabetes care*, 22, 2: 288-293

Kokai L. E., Marra K., Rubin P. J. 2014. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Translational research*, 163, 4: 399-408

Kološa K., Motaln H., Herold-Mende C., Koršič M., Lah T. T. 2015. Paracrine effects of mesenchymal stem cells induce senescence and differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Cell transplantation*, 24: 631-644

Kološa K., Leskovšek A., Motaln H., Rajar T., Lah T. T. V tisku. Proliferation and senescence of human adipose tissue mesenchymal stem cells depends on its anatomical location.

Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W. J., Peeper D. S. 2015. The essence of senescence. *Genes & development*, 24: 2463-2479

- Lafferty-Whyte K., Cairney C. J., Jamieson N. B., Oien K. A., Keith W. N. 2009. Pathway analysis of senescence-associated miRNA targets reveals common processes to different senescence induction mechanisms. *Biochimica et biophysica acta*, 1792, 4: 341-352
- Lama V. N., Smith L., Badri A., Flint A., Andrei A. C., Murray S., Wang Z., Liao H., Toews G. B., Krebsbach P. H., Peters-Golden M., Pinsky D. J., Martinez F. J., Thannickal V. J. 2007. Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. *Journal of clinical investigation*, 117: 989-996
- Lavoie J. R., Rosu-Myles M. 2013. Uncovering the secrets of mesenchymal stem cells. *Biochimie*, 95: 2212-2221
- Lawless C., Wang C., Jurk D., Merz A., Zglinicki T. V., Passos J. F. 2010. Experimental gerontology, 45, 10: 772-778
- Lee Y.-H., Mottillo E. P., Granneman J. G. 2014. Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochimica et biophysica acta*, 1842, 3: 358-369
- Li, M., Ikehara S. 2013. Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair. *Stem Cells International*, 2013: 1-8
- Li Q., Ching A. K.-K., Chan B. C.-L., Chow S. K.-Y., Lim P.-L., Ho T. C.-Y., Ip W.-K., Wong C.-K., Lam C. W.-K., Lee K. K.-H., Chan J. Y.-H., Chui Y.-L. 2004. A death receptor-associated anti-apoptotic protein, BRE, inhibits mitochondrial apoptotic pathway. *The journal of biological chemistry*, 279, 50: 52106-52116
- Locke M., Windsor J., Dunbar P. R. 2009. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ journal of surgery*, 79, 4: 235-244
- Macotela Y., Emanuelli B., Mori M. A., Gesta S., Schulz T. J., Tseng Y. H., Kahn C. R. 2012. Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes*, 61, 7: 1691-1699

- Mahmoudifar N., Doran P. M. 2010. Chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in polyglacolic acid mesh scaffolds under dynamic culture conditions. *Biomaterials*, 31: 3858-3867
- Makridakis M., Roubelakis M. G., Vlahou A. 2013. Stem cells: insights into the secretome. *Biochimica et biophysica acta*, 1834, 11: 2380-2384
- Martinez P., Thanasoula M., Muñoz P., Liao C., Tejera A., McNees C., Flores J. M., Fernández-Capetillo O., Tarsounas M., Mlasco M.A. 2009. Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice. *Genes & development*, 23, 17: 2060-2075
- Mazzoccoli G., Tevy M. F., Brghesan M., Delle Vergini M. R., Vinciguerra M. 2014. Caloric restriction and aging stem cells: the stick and the carrot? *Experimental gerontology*, 50: 137-148
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65, 1-2: 55-63
- Motaln H., Schichor C., Lah T. T. 2010. Human mesenchymal stem cells and their use in cell-based therapies. *Cancer*, 116: 2519-2530
- Motaln H., Gruden K., Hren M., Schichor C., Primon M., Rotter A., Lah T. T. 2012. Human mesenchymal stem cells exploit the immune response mediating chemokines to impact the phenotype of glioblastoma. *Cell transplantation*, 21: 1529-1545
- Motaln H. in Lah Turnšek T. 2015. Cytokines play a key role in communication between mesenchymal stem cells and brain cancer cells. *Protein & peptide letters*, 22 (4): 322-331
- Murphy J. M., Dixon K., Beck S., Fabian D., Feldman A., Barry F. 2002. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*, 46: 704-713

- Najimi M., Khuu D. N., Lysy P. A., Jazouli N., Abarca J., Sempoux C., Sokal E. M. 2007. Adult-derived human liver mesenchymal-like cells as a potential progenitor reservoir of hepatocytes? *Cell transplantation*, 16: 717-728
- Narita M., Núñez S., Heard E., Narita M., Lin A. W., Hearn S. A., Spector D. L., Hannon G. J., Lowe S. W. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell*, 113, 6: 703-716
- Niemelä S., Miettinen S., Sarkanen J. R., Ashammakhi N. 2008. Adipose tissue and adipocyte differentiation: molecular and cellular aspects and tissue engineering applications. *Topics in tissue engineering*, 4: 25 str.
- Ning H., Lin G., Lue T. F. 2006. Neuron-like differentiation of adipose tissue-derived stromal cells and vascular smooth muscle cells. *Differentiation*, 74: 510-518
- Pang J. H., Chen K. Y. 1994. Global change of gene expression at late G1/S boundary may occur in human IMR-90 diploid fibroblasts during senescence. *Journal of cell physiology*, 160, 3: 531-538
- Parrinello S., Samper E., Krtolica A., Goldstein J., Melov S., Campisi J. 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nature cell biology*, 5: 741-747
- Pascal T., Debacq-Chainiaux F., Chretien A., Bastin C., Dabee A. F., Bertholet V., Remacle J., Toussaint O. 2005. Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. *FEBS letters*, 579, 17: 3651-3659
- Ramsay T. G., White M. E., Wolverton C. K. 1995. The onset of maternal diabetes in swine induces alterations in the development of the fetal preadipocyte. *Journal of animals*, 73: 69-76
- Rebbaa A., Zheng X., Chou P. M., Mirkin B. L. 2003. Caspase inhibition switches doxorubicin-induced apoptosis to senescence. *Oncogene*, 22, 18: 2805-2811

- Rebbaa A., Zheng X., Chu F., Mirkin B. L. 2006. The role of histone acetylation versus DNA damage in drug-induced senescence and apoptosis. *Cell death and differentiation*, 13, 11: 1960-1967
- Rodriguez A. M., Elabd C., Delteil F. 2004. Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochemical and biophysical research communications*, 315: 255-263
- Rogan E. M., Bryan T. M., Hukku B., Maclean K., Chang A. C., Moy E. L., Englezou A., Warneford S. G., Dalla-Pozza L., Reddel R. R. 1995. Alterations in p53 and p16INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. *Molecular and cellular biology*, 15, 9: 4745-4753
- Rožman P., Jež M. 2010. Matične celice in napredno zdravljenje (zdravljenje s celicami, gensko zdravljenje in tkivno inženirstvo) – Pojmovnik. Ljubljana, DCTIS – Društvo za celično in tkivno inženirstvo Slovenije: 90 str.
http://www.dctis.si/wp-content/uploads/2014/02/SC_slovarcek_SLO20.pdf (24. 7. 2013)
- Rožman P., Strbad M., Knežević M. 2007. Uporaba matičnih celic v medicini. V: Genialna prihodnost – genetika, determinizem in svoboda. Mednarodni posvet Biološka znanost in družba, Ljubljana, 4.-5. oktober 2007, Ljubljana. Strgulc-Krajšek S., Popit T., Vičar M., Schrader Š. (ur.). Ljubljana, Zavod RS za šolstvo: 202-212
- Saini M., Selokar N. L., Revey T., Singla S. K., Chauhan M. S., Palta P., Madan P. 2014. Trichostatin A alters the expression of cell cycle controlling genes and microRNAs in donor cells and subsequently improves the yield and quality of cloned bovine embryos. *Theriogenology*, 82, 7: 1036-1042
- Salgado A. J., Reis R. L., Sousa N., Gimble J. M. 2010. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Current stem cell research & therapy*, 5: 103-110
- Sanchez-Gurmanches J., Guertin D. A. 2013. Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat. *Biochimica et biophysica acta*, 1842, 3: 340-351

Schellenberg A., Lin Q., Schüler H., Koch C. M., Jousen S., Denecke B., Walenda G., Pallua N., Suscek C. V., Zenke M., Wagner W. 2011. Replicative senescence of mesenchymal stem cells causes DNA-methylation changes which correlate with repressive histone marks. *Ageing*, 3, 9: 873-888

Schipper B. M., Marra K. G., Zhang W., Donnenberg A. D., Rubin J. P. 2008. Regional anatomic and age effects on cell function of human adipose-derived stem cells. *Annals of plastic surgery*, 60, 5: 538-544

Schreml S., Babilas P., Fruth S., Erso E., Schmitz G., Mueller M. B., Nerlich M., Prantl L. 2009. Harvesting human adipose tissue-derived adult stem cells: resection versus liposuction. *Cytotherapy*, 11, 7: 947-957

Sharpless N. E., DePinho R. A. 2007. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nature reviews, Molecular cell biology*, 8, 9: 703-713

Shelton D. N., Chang E., Whittier P. S., Choi D., Funk W. D. 1999. Microarray analysis of replicative senescence. *Current biology*, 9, 17: 939-945

Seluanov A., Gorbunova V., Falcovitz A., Sigal A., Milyavsky M., Zurer I., Shohat G., Goldfinger N., Rotter V. 2001. Change of the death pathway in senescent human fibroblasts in response to DNA damage is caused by an inability to stabilize p53. *Molecular and cellular biology*, 21, 5: 1552-1564

Semov A., Marcotte R., Semova N., Ye X., Wang E. 2002. Microarray analysis of E-box binding-related gene expression in young and replicatively senescent human fibroblasts. *Analytical biochemistry*, 302, 1: 38-51

Seo M. J., Suh S. Y., Bae Y. C., Jung J. S. 2005. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage *in vitro* and *in vivo*. *Biochemical and biophysical research communications*, 328: 258-264

Seshadri T., Campisi J. 1990. Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science*, 247, 4939: 205-209

- Sever, N. 2007. Gojenje celičnih linij. Dokument 10G-POS-02. Ljubljana, Nacionalni inštitut za biologijo (interno gradivo): 10 str.
- Stein G. H., Drullinger L. F., Robetorye R. S., Pereira-Smith O. M., Smith J. R. 1991. Senescent cells fail to express *cdc2*, *cycA*, and *cycB* in response to mitogen stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 24: 11012-11016
- Stewart C. M., Stewart A. A. 2011. Mesenchymal stem cells: characteristics, sources and mechanisms of action. *Veterinary clinics of North America: Equine Practice*, 27, 2: 243-261
- Stienstra R., van Diepen J. A., Tack C. J. 2011. Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 15324-15329
- Tajnšek U., Motaln H., Levičar N., Rotter A., Lah T. T. 2013. The duality of stem cells: double-edged sword in tumor evolution and treatment. *Trends in stem cell proliferation and cancer research*, 3: 391-433
- Takahashi K., Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 4: 663-676
- Takai H., Smogorzewska A., de Lange T. 2003. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Current biology*, 13, 17: 1549-1556
- Tchkonina T., Giorgadze N., Pirtskhalava T., Tchoukalova Y., Karagiannides I., Forse R. A., DePonte M., Stevenson M., Guo W., Han J., Waloga G., Lash T. L., Jensen M. D., Kirkland J. L. 2002. Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned human preadipocytes. *American journal of physiology - regulatory, integrative and comparative physiology*, 282, 5: 1286-1296

- Tchkonia T., Giorgadze N., Pirtskhalava T., Thomou T., DePonte M., Koo A., Forse R. A., Chinnappan D., Martin-Ruiz C., von Zglinicki T., Kirkland J. L. 2006. Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human pre-adipocytes. *Diabetes*, 55: 2571-2578
- Van Harmelen V., Skurk T., Röhrig K. 2003. Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *International journal of obesity and related metabolic disorders*, 27: 889–895
- Wang H. S., Hung S. C., Peng S. T., Huang C. C., Wei H. M., Guo Y. J., Fu Y. S., Ali M. C., Chen C. C. 2004. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem cells*, 22: 1330-1337
- West C. C., Murray I. R., Gonzáles Z. N., Hindle P., Hay D. C., Stewart K. J., Péault B. 2014. Ethical, legal and practical issues of establishing an adipose stem cell bank for research. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*, 67, 6: 745-751
- Yarak S., Okamoto K. O. 2010. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85, 5: 647-656
- Zhao H., Halicka D., Traganos F., Jorgensen E., Darzynkiewicz Z. 2010. New biomarkers probing depth of cell senescence assessed by laser scanning cytometry. *Cytometry part A*, 77, 11: 999-1007
- Zuk P. A., Zhu M., Ashijan P., De Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P., Hedrick M. H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*, 13: 4279-4295

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem prof. dr. Tamari Lah Turnšek za prevzem mentorstva in natančen pregled magistrskega dela ter za vse popravke, ki so pripomogli k njegovemu izboljšanju. Obenem se zahvaljujem za omogočeno možnost izvedbe raziskovalnega dela in opravljanja magistrske naloge v Laboratoriju za genetsko toksikologijo in biologijo raka na Nacionalnem inštitutu za biologijo.

Posebna zahvala je namenjena asist. dr. Heleni Motaln za vse strokovne razlage ob pregledu magistrskega dela ter nasvete, ideje in pomoč pri njegovem nastajanju.

Iskrena zahvala je namenjena Katji Kološa za vso potrpežljivost, dobro voljo in pomoč pri laboratorijskem delu ter za vse spodbudne besede.

Predsedniku komisije prof. dr. Borisu Bulogu in recenzentki prof. dr. Jasni Štrus se zahvaljujem za pregled magistrskega dela in vse strokovne opombe in predloge.

Ob koncu prisrčna hvala vsem mojim najbližjim, ki so mi stali ob strani v času študija in me spodbujali. Hvala za vso vašo ljubeznivo podporo.