

VILNIAUS UNIVERSITETAS

GABRIELIS KUNDROTAS

ŽMOGAUS MEZENCHIMINIŲ KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ
GENETINIŲ SAVYBIŲ TYRIMAS SAUGIAI TERAPIJAI UŽTIKRINTI

Daktaro disertacija

Biomedicinos mokslai, biologija (01B)

Vilnius, 2016

Disertacija rengta 2011–2015 metais Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakultete ir Nacionaliniame vėžio institute.

Mokslinė vadovė:

prof. dr. Gražina Slapšytė (Vilniaus universitetas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B);

Mokslinė konsultantė:

dr. Živilė Gudlevičienė (Nacionalinis vėžio institutas, biomedicinos mokslai, medicina – 06B).

TURINYS

SANTRUMPOS.....	5
1. ĮVADAS.....	8
2. LITERATŪROS APŽVALGA	12
2.1 Mezenchiminių kamieninių ląstelių identifikacija ir biologinės savybės ..	12
2.2 Mezenchiminių kamieninių ląstelių senėjimas.....	15
2.3 Mezenchiminių kamieninių ląstelių genetinis nestabilumas	23
2.3.1 Ilgalaikio auginimo įtaka žmogaus mezenchiminių kamieninių ląstelių genetiniam stabilumui	23
2.3.2 Žmogaus audinio šaldymo įtaka mezenchiminių kamieninių ląstelių genetiniam stabilumui	28
2.4 Žmogaus mezenchiminių kamieninių ląstelių panaudojimas klinikinėje praktikoje.....	29
2.5 Žmogaus mezenchiminių kamieninių ląstelių tyrinėjimai Lietuvoje	31
3. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI	34
3.1 Biomedicininų tyrimų etikos komiteto leidimas	34
3.2 Medžiagos ir reagentai	34
3.3 Įranga.....	39
3.4 Tyrimo objektas.....	40
3.5 Tyrimo eiga	40
3.6 Metodai.....	42
3.6.1 Išskyrimas ir auginimas	42
3.6.2 Proliferacijos tyrimas	44
3.6.3 Morfologijos tyrimas.....	45
3.6.4 Šaldymas ir atšildymas.....	45
3.6.5 Imunofenotipo tyrimas.....	46
3.6.6 Senėjimo tyrimas.....	47
3.6.7 Kariotipo tyrimas chromosomų dažymo G metodu.....	47
3.6.8 Genų raiškos tyrimas naudojant PGR gardeles.....	49
3.6.9 Funkcinė genų ontologijos analizė.....	52
3.6.10 Duomenų statistinė analizė	52

4. REZULTATAI	53
4.1 Mezenchiminių kamieninių ląstelių išskyrimo iš likutinės kaulų čiulpų medžiagos ir pagausinimo iki terapijai tinkamo kiekio metodikos sukūrimas.....	53
4.2 Ilgalaikio auginimo <i>in vitro</i> įtakos MKL savybėms tyrimas.....	55
4.2.1 Proliferacijos greičio analizė.....	55
4.2.2 Morfologijos analizė	56
4.2.3 Imunofenotipo analizė.....	57
4.2.4 Senėjimo analizė	57
4.2.5 Kariotipo stabilumo analizė	59
4.2.6 Genų raiškos analizė	60
4.3 Audinio šaldymo įtakos MKL kariotipo stabilumui tyrimas	68
4.4 Mitybinės terpės sudėties įtakos MKL genų raiškai tyrimas	69
5. REZULTATŲ APTARIMAS	74
5.1 MKL išskyrimo iš likutinės kaulų čiulpų medžiagos ir pagausinimo iki terapijai tinkamo kiekio metodika	74
5.2 Ilgalaikio auginimo <i>in vitro</i> įtaka MKL savybėms	76
5.2.1 Ilgalaikio auginimo <i>in vitro</i> įtaka MKL fenotipinėms, funkcinėms savybėms ir kariotipo stabilumui	77
5.2.2 MKL senėjimas ilgalaikio auginimo <i>in vitro</i> metu ir su senėjimu susiję biožymenys	79
5.3 Audinio šaldymo įtaka MKL kariotipo stabilumui	88
5.4 Mitybinės terpės sudėties įtaka MKL genų raiškai	89
6. IŠVADOS	92
7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS	93
8. REZULTATŲ VIEŠINIMAS	94
8.1 Publikacijos disertacijos tema	94
8.2 Pranešimai konferencijose.....	94
FINANSINĖ PARAMA	96
9. LITERATŪROS SĄRAŠAS	97
PADĖKA	121

SANTRUMPOS

Santrumpa	Paaiškinimas
7-AAD	– 7-amino-aktinomicinas D
AAT	– α -1-antitripsinas
bFGF	– pagrindinis fibroblastų augimo veiksnys (angl. <i>basic Fibroblast Growth Factor</i>)
BPP	– bendras populiacijos padvigubėjimas
CD	– ląstelių paviršiaus žymenys, būdingi tam tikrai ląstelių subpopuliacijai, diferenciacijos stadijai ar aktyvinimo laipsniui (angl. <i>Cluster of Differentiation</i>)
Cdk	– nuo ciklinų priklausanti kinazė (angl. <i>Cyclin-dependent kinase</i>)
CFG	– centrifugavimas naudojant fikolio gradientą
C_T	– ciklas, kurio metu PGR kreivė kerta foninės fluorescencijos slenkstį
DME	– mitybinė terpė (angl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's</i>)
DMSO	– dimetilsulfoksidas
DNR	– deoksiribonukleorūgštis
EVA	– Europos vaistų agentūra (angl. <i>The European Medicines Agency</i>)
FISH	– fluorescencinė <i>in situ</i> hibridizacija
FVS	– fetalinis veršelio serumas
g	– gravitacijos jėga
GGP	– Geros gamybos praktika (angl. <i>Good Manufacturing Practice, GMP</i>)
GO	– genų ontologija
HDAC	– histonų deacetilazė
HLA	– žmogaus leukocitų antigenai (angl. <i>Human Leucocyte Antigens</i>)
HMT	– histonų metiltransferazė

iRNR	– informacinė ribonukleorūgštis
kDNR	– komplementari deoksiribonukleorūgštis
KKLT	– kraujodaros kamieninių ląstelių transplantacija
kPGR	– kiekybinė polimerazės grandininė reakcija
miRNR	– mažoji mikroribonukleorūgštis
MKL	– mezenchiminės kamieninės ląstelės: AV MKL – amniono vandenų MKL, DP MKL – danties pulpos MKL, KČ MKL – kaulų čiulpų MKL, RA MKL – riebalinio audinio MKL, S MKL – sinovijos MKL, VDJA MKL – virkštelės drebutinio jungiamojo audinio MKL
P	– pasažas (nauja ląstelių kultūra, užaugusi iš dalies ankstesnės kultūros ląstelių)
p	– reikšmingumo lygmuo
PANTHER	– duomenų bazė ir klasifikacijos sistema (angl. <i>Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships</i>)
p16, p21, p53, p107, p130	– baltymai vėžio slopikliai
PDGF	– trombocitų augimo veiksnys (angl. <i>Platelet-Derived Growth Factor</i>)
PGR	– polimerazės grandininė reakcija
PP	– populiacijos padvigubėjimas
PPAR	– peroksisomų proliferatorių aktyvuojami receptoriai (angl. <i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i>)
Rb	– retinoblastomos baltymas
RIN	– RNR vientisumo skaičius (angl. <i>RNA Integrity Number</i>)
RKLL	– raudonųjų kraujo ląstelių lizavimas
RNR	– ribonukleorūgštis
SPSS	– programinės įrangos paketas statistinei analizei atlikti
TPŠL	– transplantato prieš šeimininką liga

- ULU** – užląstelinis užpildas (angl. *extracellular matrix*)
- v/v** – tūrio dalis bendrame tirpalo tūryje
- VDJA** – virkštelės drebutinis jungiamasis audinys (angl. *Wharton's jelly*)
- w/v** – svoris gramais 100 ml tūrio
- X-gal** – 5-bromo-4-chloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozidas

1. ĮVADAS

Žmogaus mezenchiminės kamieninės ląstelės (MKL) yra pagrindinės kamieninės ląstelės, naudojamos klinikiniuose tyrimuose. Jau daugiau nei 10 metų tyrinėjamas MKL potencialas reguliuoti imuninę sistemą ir skatinti audinių regeneraciją. Šiuo metu pasaulyje atliekama daugiau nei 400 MKL klinikinių tyrimų. MKL yra daug žadančios gydant degeneracines, imunines ligas, vėžį bei atkuriant pažeistus audinius – tokiai terapijai šiuo metu nėra efektyvių gydymo priemonių. Nepaisant reikšmingų MKL panaudojimo perspektyvų, vis dar lieka daug neatsakytų klausimų dėl manipuliacijų *in vitro* įtakos MKL savybėms ir paruošto MKL preparato saugumo recipientui.

Šiuo metu kaulų čiulpai yra pagrindinis klinikiniam panaudojimui skirtų MKL šaltinis. Tačiau kaulų čiulpų punkcija yra invazinė ir skausminga procedūra pacientui. Be to, taikant standartinius MKL išskyrimo metodus, yra rizika išgryninti nepakankamą MKL kiekį. Todėl reikalingas efektyvesnis ir mažiau nepatogumų donorams sukeliantis MKL išskyrimo iš kaulų čiulpų metodas.

Siekiant užtikrinti pakankamą MKL terapijos efektyvumą, reikalingi dideli ląstelių kiekiai, o tam ląstelės turi būti ilgą laiką auginamos *in vitro*. Tačiau auginimo sąlygos gali nulemti MKL biologinių savybių pokyčius. Visų pirma, MKL pereina į senėjimo fazę ir tai gali įvykti skirtingu ląstelių auginimo *in vitro* laiku. Su žmogaus MKL senėjimu susijusios įvairios rizikos. Jeigu MKL senėjimas įvyksta per anksti, tuomet yra prarandamas MKL preparatas. Be to, senstančiose MKL reikšmingai sustiprėja uždegimą skatinančių chemokinių bei citokinių sintezė ir sutrinka MKL terapinį poveikį nulemiantis imunomoduliacinis potencialas. MKL senėjimas vertinamas pagal morfologijos, proliferacijos greičio pokyčius ir fermento β -galaktozidazės aktyvumą. Tačiau iki šiol nėra standartinio metodo ląstelių senėjimui įvertinti. Tam reikalingi specifiniai, molekuliniai, žymenys, kurie padėtų nustatyti žmogaus MKL senėjimą.

Galiausiai ilgalaikis žmogaus MKL auginimas *in vitro* ir su juo susijęs šių ląstelių senėjimas didina piktybinės jų transformacijos riziką. Literatūros duomenys apie gausinamų *in vitro* žmogaus MKL genomo stabilumą yra prieštaringi. Vienų tyrimų rezultatai parodė, kad MKL genomas išlieka stabilus. Atliekant kitus tyrimus nustatyta, kad ilgalaikio auginimo metu išsivysto MKL kariotipo pokyčių. Visuotinai pripažinta, kad genomo nestabilumas sudaro sąlygas ląstelėms įgyti vėžinių ypatybių ir tai yra vienas labiausiai nerimą keliančių aspektų, siekiant žmogaus MKL saugiai panaudoti klinikinėje praktikoje. Nors dalis šokiruojančių publikacijų apie piktybinę žmogaus MKL transformaciją vėliau buvo atšauktos, tačiau diskusijos apie žmogaus MKL genetinį stabilumą ir panaudojimo klinikinėje praktikoje saugumą išlieka aktualios. Siekiant išvengti MKL, turinčių pakitusių genetinių savybių, panaudojimo terapijoje, šių ląstelių preparato paruošimo saugumas privalo būti kruopščiai ištirtas. Žmogaus MKL, skirtų klinikiniam panaudojimui, chromosomų stabilumą ištirti rekomenduoja Europos vaistų agentūra (angl. *the European Medicines Agency*) ir JAV maisto ir vaistų administracija (angl. *the U.S. Food and Drug Administration*).

Virkštelės audinys yra patraukli alternatyva kaulų čiulpams, kadangi MKL jame yra gausu, o išskiriamos jos neinvaziniu būdu. Norint išsaugoti virkštelės audinį, kurį galima būtų panaudoti ateityje, jį būtina užšaldyti ir saugoti ilgą laiką – kriokonservuoti. Tačiau šaldymo-atšildymo procesas gali pažeisti ląsteles ir iki šiol nėra aiški šios technologijos įtaka virkštelės audinio MKL genomo stabilumui.

MKL dažniausiai gausinamos mitybinėse terpėse, kuriose yra fetalinio veršelio serumo. Tačiau serumo panaudojimas didina veršelio patogenų perdavimo bei imuninių reakcijų prieš ksenogeninius serumo antigenus riziką. Geriausias šios problemos sprendimas būtų MKL gausinti apibrėžtos sudėties, serumo neturinčioje mitybinėje terpėje. Ankstesnių tyrinėjimų metu nustatyta, kad rekombinantiniais baltymais papildytoje mitybinėje terpėje virkštelės audinio MKL proliferuoja 5–10 kartų greičiau nei įprastoje 10 % FVS

turinčioje terpėje. Tikėtina, kad ši pažangiosios terapijos vaistinio preparato gamybai reikšminga savybė susijusi su ląstelių genų raiškos skirtumais.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Siekiant užtikrinti kuriamų ląstelių preparatų prototipų gamybos saugumą, buvo iškeltas šio mokslinio **darbo tikslas**: ištirti *in vitro* atliekamų manipuliacijų įtaką mezenchiminių kamieninių ląstelių genetinėms savybėms.

Užsibrėžtam darbo tikslui pasiekti buvo iškelti šie **darbo uždaviniai**:

1. Sukurti žmogaus MKL išskyrimo iš likutinės kaulų čiulpų medžiagos ir pagrausinimo *in vitro* iki terapijai tinkamo kiekio metodiką;
2. Ištirti ankstyvųjų (3–4) ir vėlyvųjų (6–7) pasažų žmogaus kaulų čiulpų MKL fenotipines, funkcines (morfologiją, imunofenotipą, senėjimą, proliferacijos potencialą) ir genetines (kariotipą ir genų raišką) savybes;
3. Palyginus vėlyvųjų ir ankstyvųjų pasažų ląstelių tyrimų rezultatus, įvertinti ilgalaikio auginimo *in vitro* įtaką žmogaus kaulų čiulpų MKL savybėms;
4. Atrinkti potencialius molekulinis biožymenis žmogaus kaulų čiulpų MKL senėjimui *in vitro* vertinti;
5. Ištirti kontroliuojamo šaldymo įtaką žmogaus virkštelės audinio MKL genomo stabilumui;
6. Ištirti naujos mitybinės terpės, papildytos rekombinantiniais baltymais, įtaką virkštelės audinio MKL genų raiškai ir palyginti su genų raiška virkštelės audinio MKL, auginomomis įprastoje terpėje, papildytoje FVS.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. MKL gali būti sėkmingai išskirtos iš nedidelio žmogaus kaulų čiulpų tūrio ir efektyviai pagrausintos iki kiekio, reikalingo terapiniam ląstelių preparatui pagaminti;

2. Ilgalaikis žmogaus kaulų čiulpų MKL auginimas *in vitro* turi įtakos jų morfologijai, proliferacijos greičiui, senėjimui, chromosomų stabilumui ir genų raiškai;
3. Naujus specifinius žmogaus kaulų čiulpų MKL senėjimo *in vitro* biožymenis galima nustatyti tiriant tikslingai atrinktų genų raišką;
4. Kontroliuojamas šaldymas ir atšildymas neturi įtakos žmogaus virkštelės audinio MKL chromosomų stabilumui;
5. Mitybinės terpės, papildytos rekombinantiniais baltymais, sudėtis turi įtakos žmogaus virkštelės audinio MKL genų raiškai.

DARBO MOKSLINIS NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ

Sukūrėme naują metodiką, pagal kurią MKL išskyrėme iš likutinės žmogaus kaulų čiulpų transplantacijos medžiagos ir pagausinome *in vitro* iki terapijai tinkamo kiekio. Taip neatliekant papildomos kaulų čiulpų biopsijos būtų galima sukurti nepakitusių savybių ląstelių produktą.

Nustatėme naujus potencialius 38 žmogaus kaulų čiulpų MKL senėjimo molekulinis žymenis, kurie suteikia naujų žinių apie MKL biologiją ir galėtų sudaryti pagrindą ląstelių preparato kokybės kontrolės kūrimui.

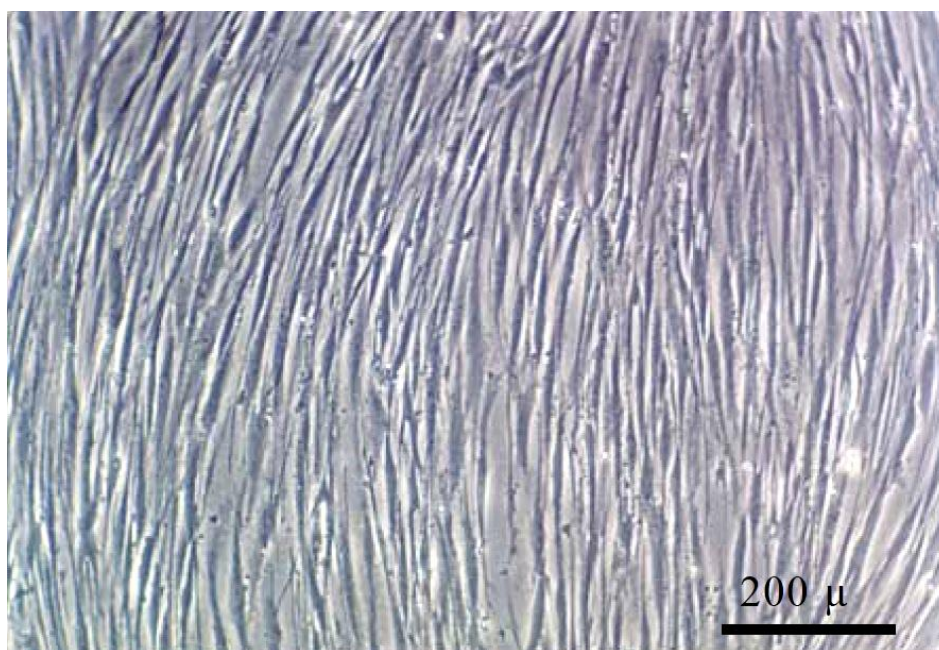
Pirmą kartą parodėme, kad žmogaus virkštelės audinio šaldymas ir atšildymas neturi įtakos MKL genomo stabilumui. Tai patvirtina virkštelės audinio kriokonservavimo saugumą. Parodėme, kad mitybinės terpės, papildytos rekombinantiniais baltymais, sudėtis turi didelės įtakos žmogaus virkštelės audinio MKL genų, siejamų su kamieniškumo palaikymu arba ląstelės dalijimosi stabdymu, raiškai.

Šis mokslinis darbas – pirmasis žmogaus MKL genomo stabilumo ir senėjimo tyrimas Lietuvoje.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

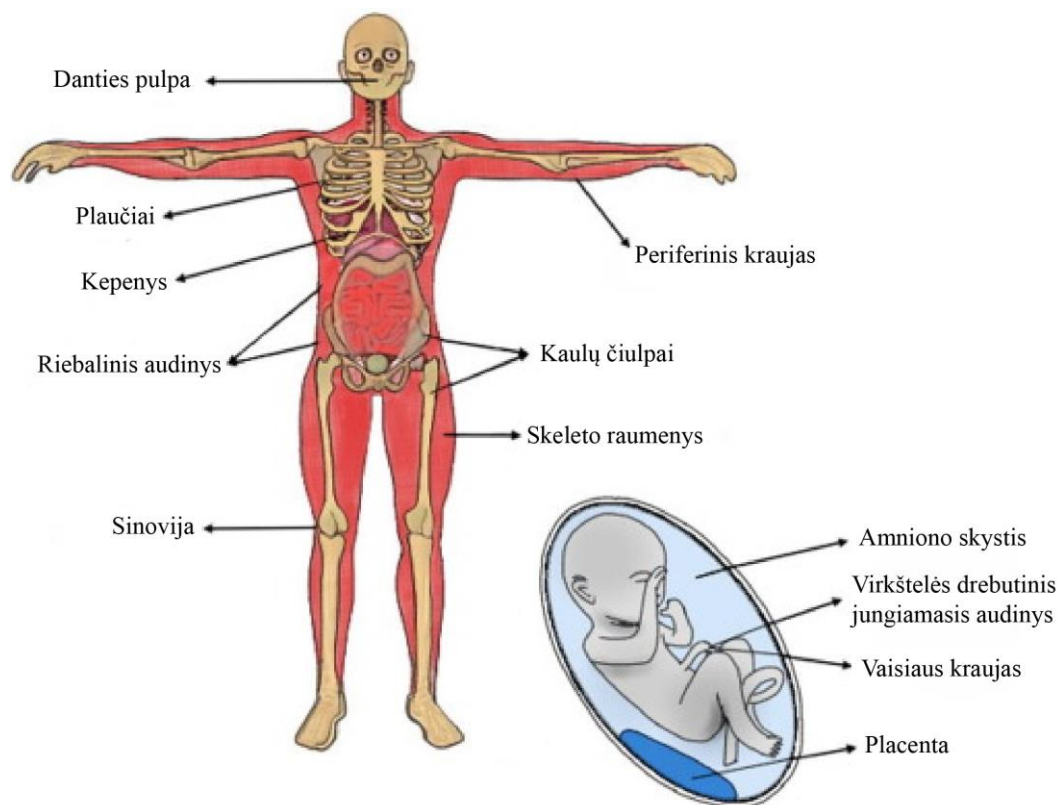
2.1 Mezenchiminių kamieninių ląstelių identifikacija ir biologinės savybės

Kamieninės ląstelės – tai tokios ląstelės, kurios nuo kitų organizmo ląstelių tipų skiriasi 3 bendrosiomis savybėmis: 1) jos geba dalytis ir taip save atnaujinti ilgą laiko tarpą, 2) jos yra nespecializuotos, 3) iš jų gali išsivystyti specializuotų tipų ląstelės¹. Žmogaus mezenchiminės kamieninės ląstelės (MKL) apibūdinamos kaip ne kraujodaros, besitvirtinančios prie paviršių, morfologiškai į fibroblastus panašios ląstelės (1 pav.), pasižyminčios savaiminiu atsinaujinimu ir gebėjimu diferencijuotis į skirtingų tipų ląsteles².



1 pav. Žmogaus MKL kultūra. Pagal *Grigorian et al*³

MKL gali būti išskirtos iš įvairių suaugusių žmonių audinių, tokių kaip kaulų čiulpai, riebalinis audinys, skeleto raumenys, sinovija bei danties pulpa, bei vaisiaus ar naujagimio audinių, tokių kaip virkštelės audinys, placenta ir amniono skystis⁴ (2 pav.) Visgi kaulų čiulpai yra pagrindinis MKL išskyrimo šaltinis⁵, nors riebaliniame audinyje šių ląstelių yra gausiausia⁶.



2 pav. Žmogaus MKL išskyrimo šaltiniai

Mezenchiminės kamieninės ląstelės gali būti išskirtos iš įvairių tiek suaugusių žmonių, tiek vaisiaus ar naujagimio audinių. Pagal *Kobolak et al*⁴

Hematti su bendraautoriais⁷, *Lindner* su bendraautoriais⁸ bei *Prockop* su bendraautoriais⁹ apžvelgė MKL savybes ir jų tyrinėjimus nuo pat MKL atradimo iki šių laikų. MKL atradėju laikomas *Friedenstein*, kuris nuo 1960 metų tyrinėjo sąveikas tarp kaulinio ir hemopoetinių audinių. Jis pirmasis parodė, kad kaulų čiulpuose yra ne kraujodaros ląstelių, kurioms būdingos tokios savybės kaip virtinimasis prie plastiko paviršiaus, kolonijų iš vienos ląstelės suformavimas, proliferacijos ir persėjimo potencialas bei osteogeninis potencialas. Šias ląsteles jis pavadino kolonijas formuojančiais fibroblastų vienetais (angl. *colony-forming unit-fibroblastic cells, CFU-F*). Remdamasis *Friedenstein* tyrimų rezultatais, 1985 m. *Owen* pasiūlė prielaidą, kad egzistuoja „stromos“ kamieninės ląstelės, kurios kaulų čiulpuose sudaro nišą kraujodaros kamieninėms ląstelėms. 1991 m. *Caplan* parodė, kad šioms ląstelėms būdingos kamieninių ląstelių savybės: gebėjimas diferencijuoti į mezodermos linijos ląsteles (adipocitus, chondrocitus ir osteoblastus) ir pasiūlė „mezenchiminių

kamieninių ląstelių“ terminą. 1999 m. *Pittenger* paskelbė, kad MKL būdingos multipotentinės diferenciacijos galimybė. Vėlesnių tyrimų su gyvūnais metu nustatyta, kad MKL skatina pažeistų audinių regeneraciją *in vivo*.

Tyrėjai skirtingai charakterizavo MKL, o dėl greitai gausėjančių publikuojamų duomenų tapo sudėtinga palyginti atskirų tyrimų rezultatus. Todėl 2006 metais Tarptautinė ląstelių terapijos draugija (angl. *The International Society for Cellular Therapy, ISCT*) pasiūlė minimalius kriterijus, kuriuos turėtų atitikti *in vitro* auginamos žmogaus MKL¹⁰:

- 1) tvirtinimasis prie plastiko paviršiaus;
- 2) specifinių paviršiaus žymenų (antigenų) raiška: >95 % MKL populiacijos turi ekspresuoti CD105, CD90 bei CD73 ir <2 % MKL populiacijos turi ekspresuoti CD34, CD45, CD14 arba CD11b, CD79 α arba CD19 bei HLA-DR;
- 3) multipotentinės diferenciacijos galimybė į osteoblastus, chondrocitus ir adipocitus.

Šiomis rekomendacijomis buvo siekiama paskatinti vienodesnę MKL apibūdinimą ir palengvinti tyrėjų duomenų palyginimą.

„Mezenchiminės kamieninės ląstelės“ yra sutartinis terminas. Embriono vystymosi metu iš mezodermos vystosi mezenchima, o iš jos – visų tipų jungiamasis audinys, kuriame ir aptinkamos MKL¹¹. Tačiau kai kurie tyrėjai šias ląsteles linkę vadinti „mezenchiminėmis stromos ląstelėmis“ teigdami, kad jos yra organų struktūrinę funkciją atliekančiame jungiamajame audinyje⁸ ir kad trūksta šių ląstelių kamieniškumo įrodymų tyrimuose *in vivo*¹². 2013 metais *Bianco* su bendraautoriais įrodė, kad bent jau kaulų čiulpų MKL iš tikrųjų yra kamieninės ląstelės: po transplantacijos MKL *in vivo* suformavo nedidelę taisyklingos histologijos kaulinę struktūrą, kurioje pradėjo vykti recipientinio gyvūno hemopoezė¹³.

2.2 Mezenchiminių kamieninių ląstelių senėjimas

Daugiau nei prieš penkis dešimtmečius *Hayflick* ir *Moorhead* nustatė, kad normalių žmogaus fibroblastų dalijimosi skaičius *in vitro* yra ribotas. Šį reiškinį jie pavadino „ląstelės senėjimu“ (angl. *cellular senescence*)¹⁴. Šiuo metu ląstelių senėjimas apibrėžiamas kaip negrįžtamas ląstelės ciklo sustabdymas ir su tuo susiję įvairūs fenotipiniai pokyčiai¹⁵. Senstančios ląstelės nuo kitų nesidalijančių ląstelių, tokių kaip ramybės būsenos arba galutinai diferencijavusių ląstelių, skiriasi morfologiniais pokyčiais bei kai kuriais žymenimis: ląstelės tampa didesnės, suplokštėja, joms būdingas su senėjimu susijusios β -galaktozidazės aktyvumas (3 pav.), su senėjimu susijusios heterochromatino sankaupos (angl. *senescence-associated heterochromatic foci*), vėžio slopiklių ir ląstelės ciklo slopiklių raiška bei deoksiribonukleorūgščių (DNR) pažaidų žymenys¹⁴.



3 pav. Senstančių žmogaus MKL kultūra

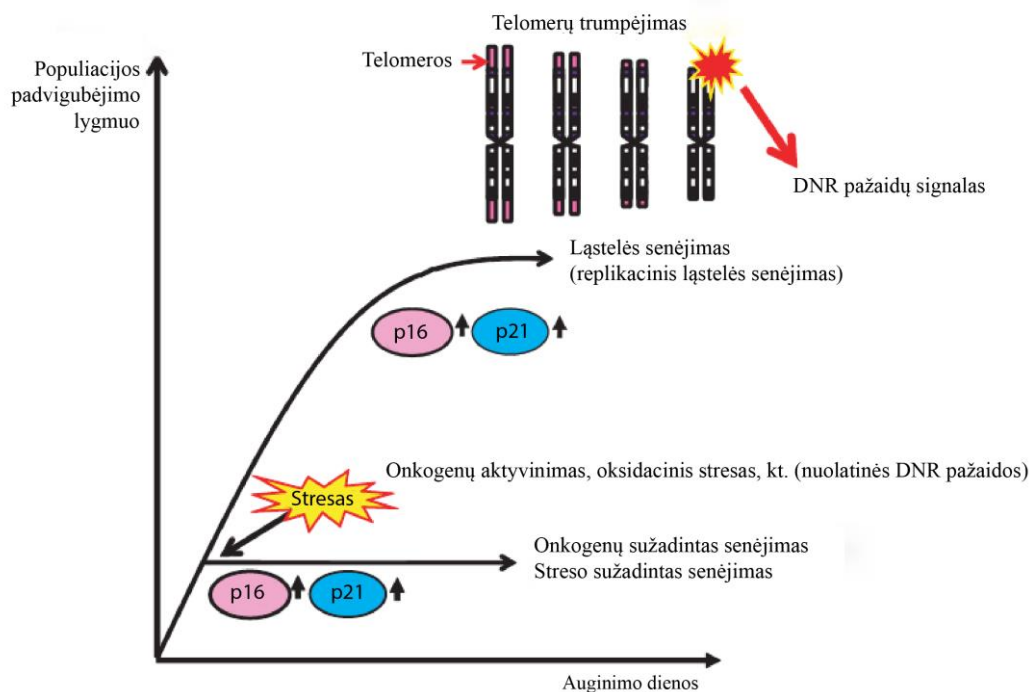
Senstančios ląstelės yra didesnės ir vertinimo metu dėl β -galaktozidazės aktyvumo aplink ląstelių branduolius susikaupia žalsvai mėlynos spalvos dažai. Pagal *Hass et al*¹⁶

Skiriamos dvi ląstelių senėjimo kategorijos: „pirmalaikis senėjimas“ ir „replikacinis senėjimas“¹⁷. „Replikacinis senėjimas“ susijęs su telomerų trumpėjimu kultūros augimo metu¹⁸. Dėl DNR replikacijos proceso prigimties ir nepakankamo telomerazės aktyvumo telomeros po truputį trumpėja kiekvieno ląstelės dalijimosi metu. Sutrikus telomerų funkcijoms, sužadinami DNR pažaidų atsako signaliniai keliai, kurie aktyvina nuo vėžio slopiklio p53 priklausomus ląstelės kontrolės taškus ir galiausiai ląstelė pereina į senėjimo fazę¹⁹. „Pirmalaikis senėjimas“ yra pasekmė kitų stresinių būklių, tokių kaip reaktyvių deguonies radikalų perteklius (oksidacinis stresas), DNR pažeidžiančios medžiagos ar tam tikrų onkogenų aktyvinimas¹⁸. Šie dirgikliai sukelia nepataisomas DNR pažaidas, o nuolatiniai DNR pažaidų signalai galiausiai sužadina negrįžtamą ląstelės proliferacijos sustabdymą¹⁹. Abiejų tipų senėjimas gali vykti kartu auginimo *in vitro* metu¹⁸ (4 pav.).

Yra gerai žinoma, kad suaugusių žmonių kaulų čiulpų MKL (KČ MKL) senėjimą ir su juo susijusius MKL savybių pokyčius sužadina šių ląstelių ilgalaikis auginimas *in vitro*²⁰. Žmogaus MKL telomerazės aktyvumas yra nepakankamas, kad atstatytų trumpėjančias telomeras²¹. Žmogaus KČ MKL būdingas ir pirmalaikis senėjimas²²⁻²⁴. Tačiau senėjimas nėra susijęs su fiksuotu ląstelių pasidalijimo skaičiumi. Vieni tyrėjai nustatė ankstesnę žmogaus KČ MKL senėjimą – po 6–16 populiacijos padvigubėjimų²⁵, kiti vėlesnę – po 25–40¹⁷ ar 35–52 populiacijos padvigubėjimų²⁶. Šių tyrimų metu MKL senėjimas buvo vertintas pagal morfologijos, proliferacijos kinetikos ir fermento β-galaktozidazės aktyvumo pokyčius. Deja, iki šiol nėra auksinio standartinio metodo ląstelių senėjimui įvertinti. Todėl reikalingi specifiskesni, molekuliniai, žymenys, siekiant įvertinti žmogaus MKL senėjimą auginamose kultūrose²⁷.

p53–p21–Rb ir p16–Rb yra pagrindiniai ląstelės senėjimą sužadinantys signaliniai keliai²⁸. Įvairūs vidiniai ir išoriniai dirgikliai aktyvina įvairius ląstelės signalinius kelius, kurie galiausiai aktyvina vėžio slopiklį p53 arba p16^{Ink4a}, arba abu. Suaktyvintas p53 sužadina vėžio slopiklį p21, kuris, slopindamas ciklino E–Cdk2 kompleksą, lemia laikiną ląstelės ciklo

sustabdymą. p16^{Ink4a} taip pat slopina ląstelės ciklą, tačiau veikdamas ciklino D–Cdk4 ir ciklino D–Cdk6 kompleksus. Abu, p21 ir p16^{Ink4a}, neleidžia vykti Rb inaktyvinimui, o tai lemia nuolatinę transkripcijos veiksmų E2F kontroliuojamų genų, būtinų pereiti į S fazę, raiškos slopinimą. Esant stipriam stresui, laikinas ląstelės augimo sustabdymas tampa negrįžtamas. Šio virsmo mechanizmai iki šiol nėra žinomi. Nedidelio masto DNR pažeidimai ištaisomi ir ląstelė grįžta į normalią ciklo eigą. Esant vidutiniam stresui, p53–p21 signalinis kelias aktyvina vadinamąjį pagalbinį ląstelės ciklą (angl. *assisted cycling*), kurio metu ląstelės ciklo trukmė prailginama, taip suteikiant papildomai laiko pažeidimams ištaisyti. Taigi p53–p21 kelias gali veikti arba priešingai, arba sinergiškai su p16^{Ink4a}, priklausomai nuo streso tipo ir stiprumo²⁹.



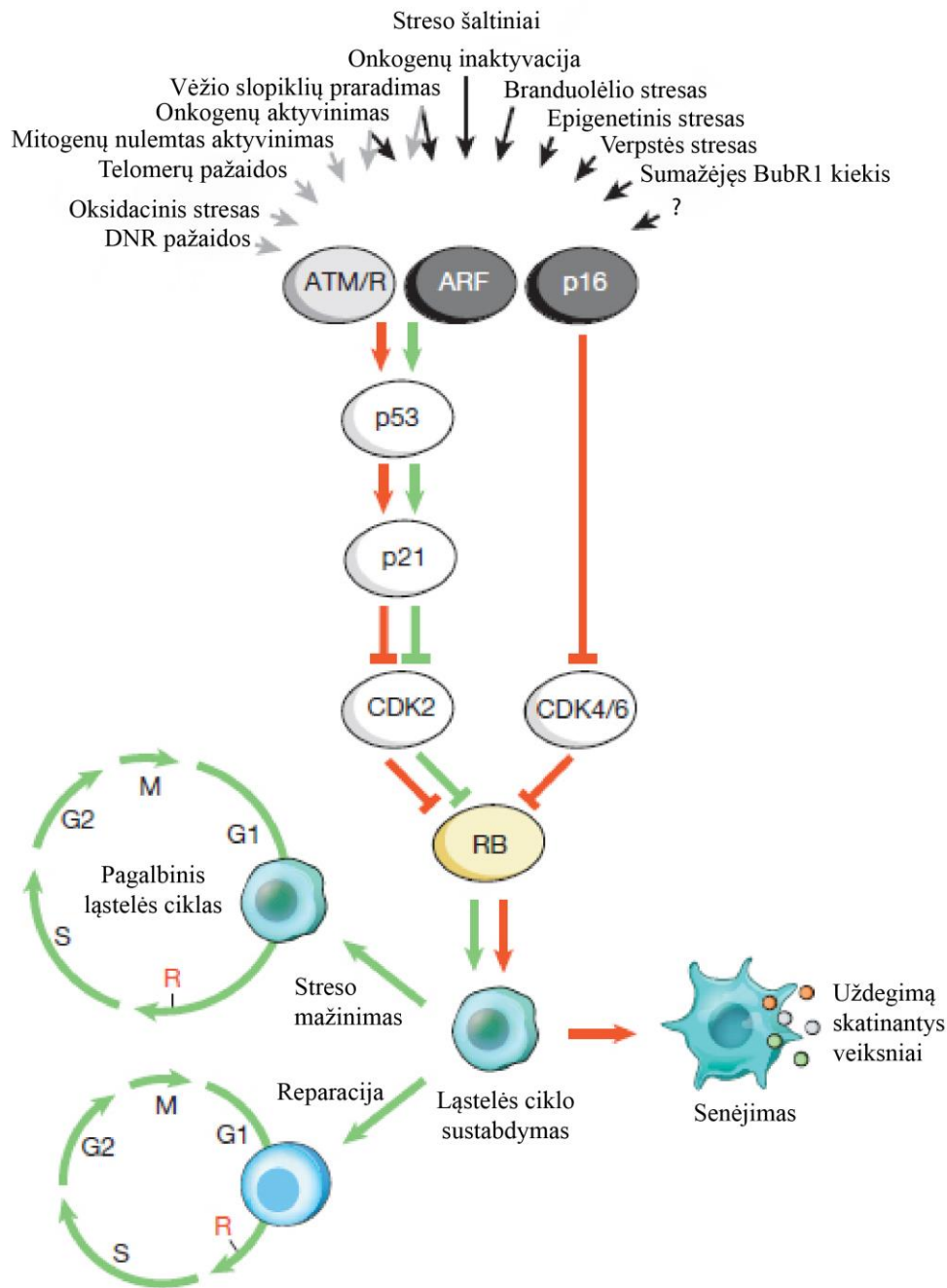
4 pav. Ląstelių senėjimas auginimo *in vitro* metu

Galimas dvejopas ląstelių senėjimas: „replikacinis“, susijęs su telomerų trumpėjimu, ir „pirmalaikis“, susijęs su auginimo sąlygų nulemtu stresu, tokiu kaip oksidacinis stresas ar onkogenų aktyvinimas. DNR pažeidų signaliniai keliai sustiprina raišką vėžio slopiklių p16 ir p21, kurie dalyvauja sužadinant abiejų tipų ląstelės senėjimą. Pagal Ohtani ir Hara¹⁹

Pagrindinių su žmogaus KČ MKL senėjimu siejamų genų raiškos tyrimų rezultatai prieštaringi. *Cheng* su bendraautoriais parodė, kad genų *p16*, *p21* ir *p53* raiška yra reikšmingai padidėjusi ilgalaikio auginimo metu senstančiose žmogaus KČ MKL, o baltymų *p21* ir *p53* raiškos pokyčiai sutampa su RNR raiškos pokyčiais³⁰. *Shibata* su bendraautoriais parodė, kad žmogaus KČ MKL gyvavimo pabaigoje reikšmingai padidėja tik geno *p16* informacinės RNR (iRNR) raiška, bet ne genų *p21* ir *p53* raiška, ir atitinkamų baltymų kiekių pokyčiai sutampa su iRNR raiškos pokyčiais³¹. Panašius rezultatus paskelbė ir *Tarte* su bendraautoriais, nustojusiose dalytis žmogaus KČ MKL nustatę *p16* iRNR kiekio padidėjimą ir nenustatę genų *p53* ir *p21* raiškos pokyčių²⁶. *Kim* su bendraautoriais parodė, kad žmogaus KČ MKL ilgalaikio auginimo metu geno *p16* raiška nekinta, o *p53* raiška sumažėja³².

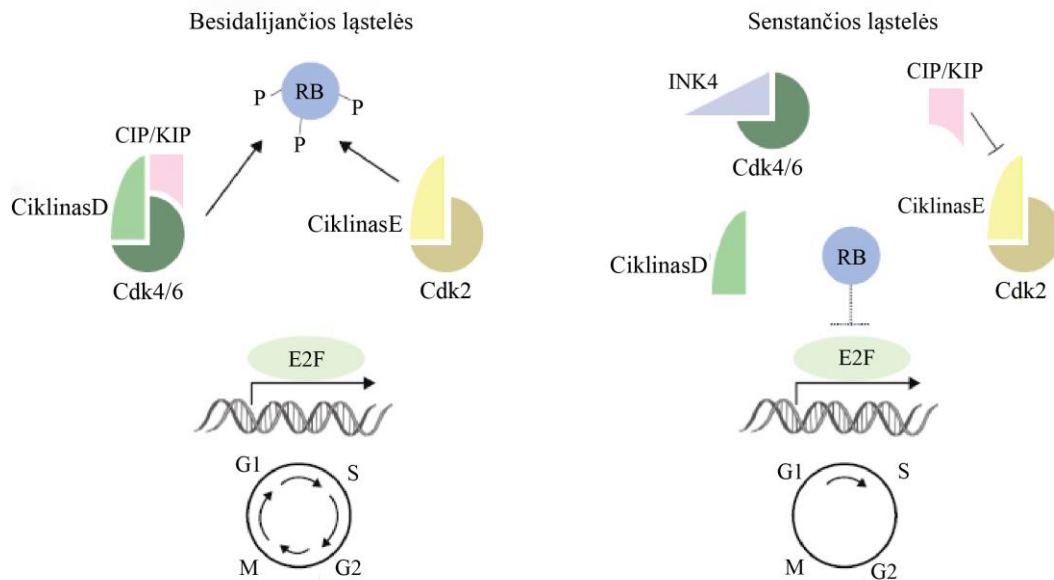
Rb ir jo šeimos baltymai, *p107* ir *p130*, yra ypač svarbūs inicijuojant senstančios ląstelės ciklo stabdymą¹⁹. Proliferuojančiose ląstelėse ciklino D–Cdk4,6 bei ciklino E–Cdk2 kompleksai lemia Rb šeimos fosforilinimą, dėl kurio šie baltymai būna neaktyvūs. Tačiau senstančiose ląstelėse veikiant INK4 (priklauso *p16*) ir CIP/KIP (priklauso *p21*) šeimų Cdk slopikliams, minėti kompleksai nuslopinami, o hipofosforilintos būsenos Rb baltymai tampa aktyvūs ir veikia kaip transkripcijos veiksniai E2F slopikliai³³ (6 pav.). E2F1–5 reguliuoja raišką genų, dalyvaujančių vykstant DNR replikacijai bei reparacijai, ląstelės ciklui, ląstelės metabolizmui bei stabdant ląstelės ciklą³⁴ (7 pav.). Tačiau baltymų Rb, *p107* ir *p130* MKL biologinės funkcijos iki šiol nėra žinomos³⁵.

Noh su bendraautoriais, panaudodami viso transkriptomo oligonukleotidų mikrogardeles (*Affymetrix*, JAV), parodė, kad auginimo *in vitro* metu senstančiose vėlyvojo 11 pasažo (P11) žmogaus KČ MKL, palyginti su ankstyvojo P4 ląstelėmis, 243 genų raiška padidėja ir 340 genų raiška sumažėja daugiau kaip 2 kartus. Genų ontologijos analizė parodė, kad šie genai susiję su ląstelės ciklu, citoskeletu, DNR reparacija, chromatinu susirinkimu bei DNR metabolizmu – procesais, kurie siejami su ląstelės senėjimu³⁶. *Yoo* su bendraautoriais, panaudodami slopinamojo atėmimo hibridizacijos (angl.



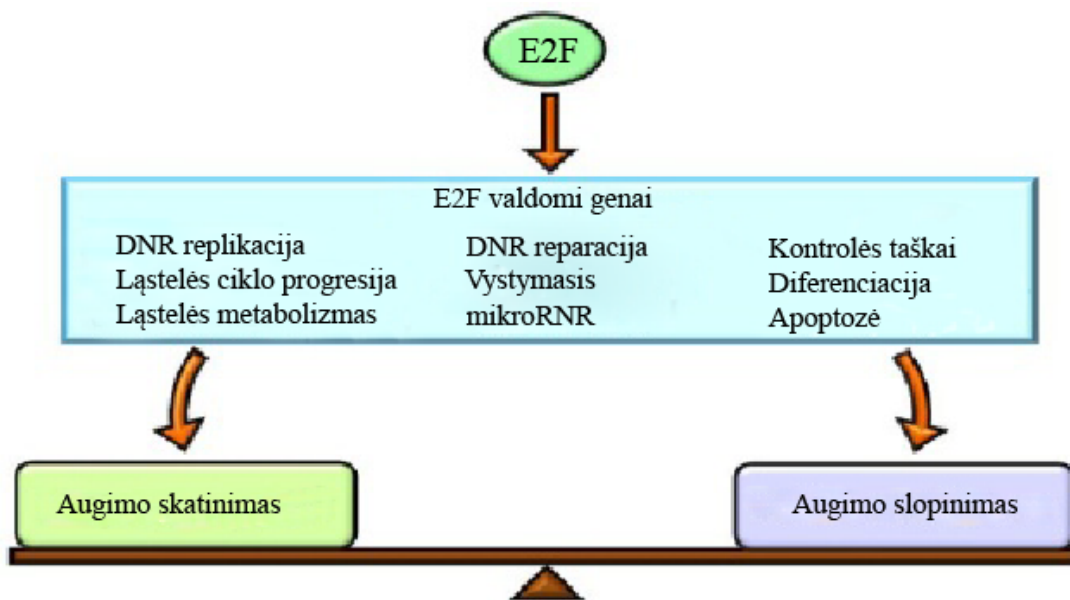
5 pav. Dirgikliai ir pagrindiniai signaliniai keliai, sužadinantys ląstelės senėjimą

Pilkos spalvos dirgikliai ir rodyklės – aktyvinantys p53 per DNR pažeidimų atsako signalinius kelius. Raudonos spalvos jungtys rodo „senėjimą skatinančias“, o žalios – „senėjimą slopinančias“ veiklas. Raudonos spalvos rodyklės rodo senėjimo eigą esant stipriam stresui, žalios spalvos rodyklės – esant silpnam ir vidutiniam stresui. Senstančiose ląstelėse sustiprėja uždegimą skatinančių veiksnių (pavaizduoti spalvotais rutuliukais) sintezė. Pagal *van Deursen*²⁹



6 pav. Žinduolių ląstelių ciklo G1/S eigos reguliacija

Ciklinų ir nuo ciklinų priklausančių kinazių (Cdk) kompleksai lemia Rb šeimos baltymų (Rb1, p107, p130) fosforilinimą, dėl kurio šie baltymai būna neaktyvūs. Veikiant Cdk slopikliams, priklausantiems šeimoms INK4 ir CIP/KIP, ciklinų–CDK kompleksai nuslopinami, o hipofosforilintos būsenos Rb baltymai tampa aktyvūs ir veikia kaip E2F slopikliai. Pagal *Chandler et al*³³

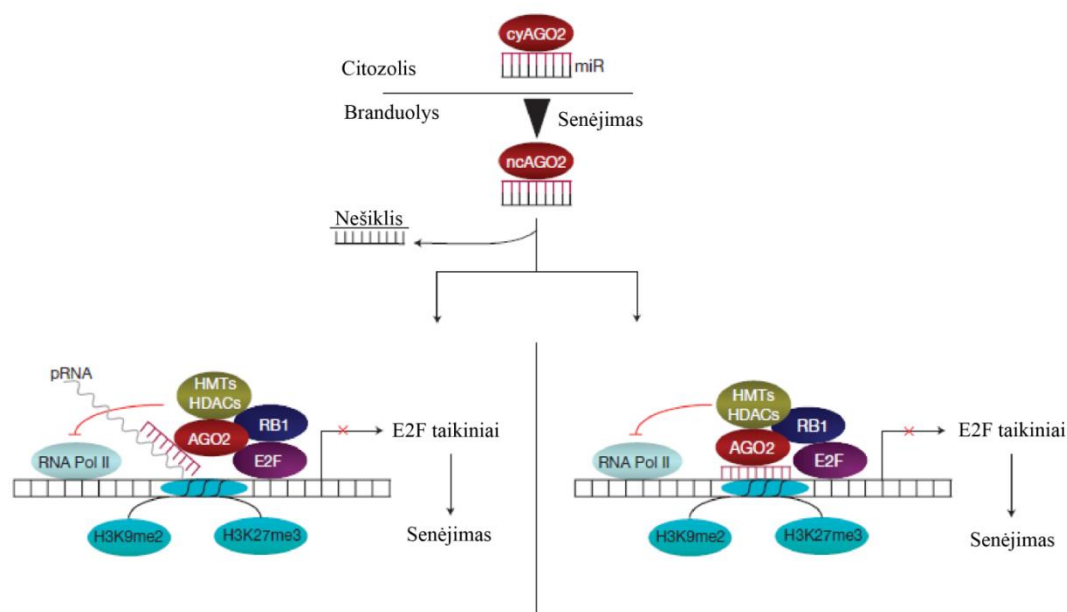


7 pav. Transkripcijos veiksnio E2F įtaka ląstelei augti arba augimui stabdyti

Transkripcijos veiksniai E2F aktyvina tiek ląstelės augimą skatinančius, tiek slopinančius genus. Manoma, kad ląstelės likimas priklauso nuo E2F veikiamų genų-taikinių balanso. Pagal *Ozono et al*³⁴

suppression subtractive hybridization) technologiją, parodė, kad senstančiose *in vitro* žmogaus KČ MKL (jų populiacijai padvigubėjus 30 kartų), palyginti su jaunomis ląstelėmis (jų populiacijai padvigubėjus 10 kartų), 43 genų raiška padidėjo ir 19 genų raiška sumažėjo. Šie genai daugiausia buvo susieti su ląstelių tvirtinimusi prie paviršių ir metabolizmu³⁷. *Choi* su bendraautoriais, išanalizavę viso genomo DNR metilinimo mikrogardelių (*NimbleGen*, JAV) duomenis, vėlyvojo P15 žmogaus KČ MKL, palyginti su ankstyvojo P5 ląstelėmis, nustatė 44 hipermetilintas miRNR ir 2587 hipermetilintus genus, tarp kurių buvo susijusių su DNR replikacija, ląstelės ciklu ir PPAR signaliniu keliu. Hipermetilinimą tyrimo autoriai susiejo su genų raiškos slopinimu ir ląstelių senėjimu³⁸.

Mažosios mikroRNR (miRNR) yra nepaprastai svarbios reguliuojant daugybę ląstelės procesų, įskaitant proliferaciją³⁹ ir genomo stabilumą⁴⁰. Tik visai neseniai buvo išsiaiškinta, kad miRNR, dar vadinamos su senėjimu susijusiomis miRNR (angl. *senescence-associated miRNR*), yra svarbūs ląstelės senėjimo veiksniai⁴¹. *Benhamed* su bendraautoriais neseniai nustatė, kad miRNR dalyvauja ląstelės ciklo stabdymo procese kartu su Rb1/E2F kompleksu slopindamos proliferaciją skatinančių genų raišką⁴². Tyrėjai parodė, kad ląstelės senėjimo metu citozoliniai miRNR/AGO2 kompleksai yra perkeltami į ląstelės branduolį, kur jungiasi prie transkripcijos veiksnių E2F valdomų genų promotorių. Taip miRNA/AGO2 kompleksai blokuoja RNR polimerazės II prisijungimą prie promotorių, o kartu su Rb1/E2F pritraukia kitus slopiklius, tokius kaip histonų metiltransferazės ir histonų deacetilazės, ir slopina E2F valdomus promotorius. Galiausiai promotorius nuslopinamas dėl susiformavusio neaktyvaus chromatino, kuriam būdingas histono H3 lizino metilinimas 9 ir 27 padėtyse (8 pav.). Procesą tyrėjai pavadino su senėjimu susijusiu genų transkripcijos slopinimu (angl. *senescence-associated transcriptional gene silencing*).



8 pav. AGO2 ir miRNR veikimo modelis ląstelės senėjimo metu slopinant E2F valdomų genų transkripciją

miRNR/AGO2 prie geno promotoriaus jungiasi arba tiesiogiai (dešinėje), arba per su promotoriumi susijungusią pRNR (kairėje). Cy – citozolinis, nc – branduolio, HMT - histonų metiltransferazė, HDAC – histonų deacetilazės. Pagal Benhamed *et al*⁴²

Literatūros duomenimis, pirmosios publikacijos apie miRNR tyrinėjimus žmogaus KČ MKL senėjimo *in vitro* metu pasirodė tik 2014 metais. Yoo su bendraautorais⁴³ klonavo 43 miRNR senstančiose žmogaus KČ MKL. Iš jų 24 jau anksčiau buvo susietos su kitų ląstelių tipų senėjimu. Likusias 19 miRNR ištyrė kiekybinės PGR gardelių metodu (*Qiagen*, JAV) ir nustatė, kad 14-os raiška padidėjo ir 5-ių sumažėjo *in vitro* senstančiose KČ MKL, palyginti su raiška jaunose ląstelėse. Tome su bendraautorais⁴⁴ kiekybinės PGR metodu parodė, kad *miR-335* raiška reikšmingai didėja senstančiose žmogaus KČ MKL ilgalaikio (>7 savaitės) auginimo *in vitro* metu bei dirbtinai sužadinus šių ląstelių senėjimą apšvitinant γ -jonizuojančiąja spinduliuote. Tyrėjai taip pat nustatė stiprią koreliaciją tarp didėjančio *miR-335* kiekio ląstelėse ir donorų vyresnio amžiaus.

Su žmogaus MKL senėjimu susijusios įvairios rizikos. Visų pirma ląstelių senėjimas apriboja pirminių ląstelių kultūrų proliferacijos potencialą⁴⁵. Senstančios ląstelės neigiamai paveikia ir aplinkines normalias ląsteles: išskirdamos tirpius veiksnius, jos gali sustabdyti normalių ląstelių ląstelės ciklą

ir taip apriboti jų proliferacijos potencialą⁴⁶. Dėl to trumpėja ląstelių gyvavimo laikotarpis⁴⁷. Nors į senėjimo fazę perėjusios ląstelės nebegali toliau dalytis, jos išlieka gyvybingos ir metaboliškai aktyvios¹⁹. Tačiau senstančioms MKL būdingas su senėjimu susijęs sekretomo fenotipas (angl. *senescent-associated secretory phenotype*): tokiose ląstelėse reikšmingai sustiprėja uždegimą skatinančių chemokinių ir citokinių sintezė²¹ bei sutrinka MKL terapinį poveikį nulemiantis imunomoduliacinis potencialas⁴⁸. Galiausiai dėl ląstelių senėjimo sutrinka ląstelės ciklo kontrolės taškų veikla, todėl padidėja chromosomų nestabilumo⁴⁹ ir ląstelių neoplazinės transformacijos rizika^{50,51}. Žmogaus MKL, skirtų klinikiniam panaudojimui, proliferacijos potencialą ir senėjimo būseną įvertinti rekomenduoja Europos vaistų agentūra (angl. *The European Medicines Agency*)⁵².

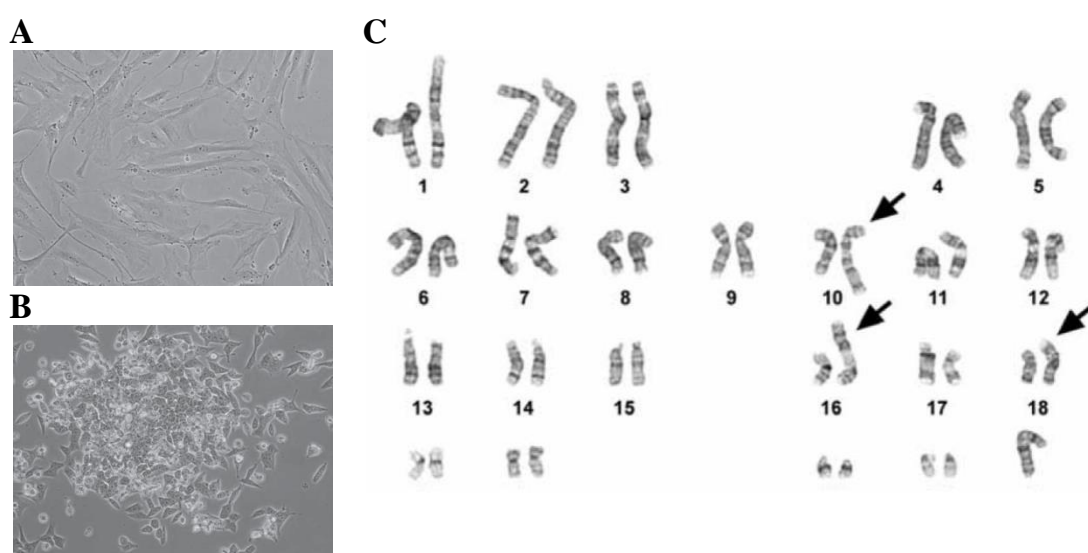
2.3 Mezenchiminių kamieninių ląstelių genetinis nestabilumas

2.3.1 Ilgalaikio auginimo įtaka žmogaus mezenchiminių kamieninių ląstelių genetiniam stabilumui

Siekiant užtikrinti pakankamą mezenchiminių kamieninių ląstelių (MKL) terapijos efektyvumą, reikalingi dideli ląstelių kiekiai, o tam ląstelės turi būti ilgą laiką auginamos *in vitro*⁵³. Tačiau kai kurie tyrėjai nustatė auginamų MKL kariotipo nestabilumą^{26,54,55}. Genomo nestabilumas apibrėžiamas kaip genomo pokyčių dažnio padidėjimas ląstelės ciklo metu⁵⁶ ir yra skirstomas į mikrosatelitų nestabilumą, kai kinta chromatino struktūra ir genų raiška, bei chromosomų nestabilumą, kai kinta chromosomų struktūra ir skaičius⁵⁷. Visuotinai pripažinta, kad genomo nestabilumas sudaro sąlygas ląstelėms įgyti vėžinių ypatybių⁵⁸, todėl žmogaus MKL kancerogeninis potencialas yra vienas svarbiausių nerimą keliančių aspektų, siekiant šias ląsteles panaudoti klinikoje⁵⁹.

Žmogaus KČ MLK genomo stabilumo tyrimų rezultatai yra labai prieštaringi. Wang su bendraautoriais⁵⁴ parodė, kad žmogaus KČ MKL

auginimo *in vitro* metu susiformavo spontaninės piktybinės transformacijos fenotipu pasižyminčių ląstelių subpopuliacija. Šios ląstelės buvo besitvirtinančios prie paviršių, sferos formos (9 pav. A, B), joms buvo būdingas didelis telomerazės aktyvumas, greitesnis augimas nesant kontaktinio slopinimo (angl. *contact inhibition*), dominavimas normalių kultūros ląstelių atžvilgiu, nebuvo būdinga CD105 raiška, o CD90 raiška buvo labai nedidelė. Analizuojant šių ląstelių klonų 7 ir 13 pasažų G metodu dažytas (angl. *G-banding*) chromosomas buvo nustatyti chromosomų pokyčiai: aneuploidija ir translokacijos (9 pav. C). Tokios ląstelės suformavo makroskopinius solidinius navikus NOD/SCID pelių daugybėje organų ir audinių. Histologinė analizė parodė, kad šie navikai labai silpnai diferencijuoti, agresyviai augantys, turintys didelius nekrozės plotus. Autoriai padarė išvadą, kad *in vitro* sąlygos yra palankios transformuotoms žmogaus KČ MKL susiformuoti ir/arba daugintis ir pabrėžė kariotipo analizės būtinumą prieš šių ląstelių panaudojimą klinikoje.



9 pav. Žmogaus KČ MKL transformacija auginimo *in vitro* metu

KČ MKL yra besitvirtinančios prie paviršių, fibroblastinės morfologijos, formuoja homogeninį sluoksnį (A). Transformavusios ląstelės apvalios, kubo ar trumpos verpstės formos, formuoja kompaktiškas kolonijas (B). 15 % transformacijos fenotipu pasižyminčių KČ MKL nustatytas kariotipo pokytis 45, X, -X, +(10)(q26), +(16)(p13.3), +(18)(p11.2) (C), likusių ląstelių kariotipas buvo normalus 46, XX. Pagal Wang *et al*⁵⁴

Rubio su bendraautoriais⁶⁰ augino žmogaus riebalinio audinio (RA) MKL. Visų išskirtų MKL kariotipas buvo normalus (2n = 46). Po maždaug 2

mėn. visos ląstelės pasiekė senėjimo fazę: ląstelių ciklas buvo sustojęs, ląstelėse nustatytas β -galaktozidazės aktyvumas. Ląstelės buvo augintos *in vitro* toliau. Praėjus 4–5 mėn. nuo išskyrimo ląstelės spontaniškai tapo nemirtingos: vėl ėmė proliferuoti, pakito jų morfologija (ląstelės tapo mažos ir kompaktiškos) bei imunofenotipas (sumažėjo paviršiaus žymenų CD34, CD90 ir CD105 raiška). Galiausiai ląstelės spontaniškai transformavosi: augo ant pusiau kieto agarų nesant kontaktiniam slopinimui. Nustatytas telomerazės aktyvumas ir kariotipo pokyčiai (trisomija, tetraploidija, chromosomų struktūros persitvarkymai). Suleistos imunodeficitinėms pelėms tokios ląstelės po 4–6 sav. suformavo navikus beveik visuose gyvūnų organuose. Apibendrinami tyrimą autoriai akcentavo, kad ilgalaikis auginimas didina MKL spontaninės transformacijos *in vitro* ir navikų formavimo *in vivo* riziką. Panašius rezultatus paskelbė ir Rosland su bendraautoriais⁶¹. Tyrėjai augino žmogaus KČ MKL, kurios senėjimo fazę pasiekė po 25–71 dienos. Šių ląstelių proliferacija ženkliai sulėtėjo, jose nustatytas β -galaktozidazės aktyvumas. Ilgalaikio auginimo (5-106 sav.) *in vitro* metu 46 % kultūrų spontaniškai transformavosi: ženkliai pagreitėjo proliferacija (normalių MKL PP buvo 60 val., transformuotų ląstelių PP – 12 val.), pakito morfologija (iš verpstės formos į apvalias), pakito imunofenotipas (padidėjo CD44 ir CD166 raiška, CD105 raiškos sumažėjo, o CD73 ir CD90 raiška neaptikta), pakitusiose ląstelėse nustatytas telomerazės aktyvumas. Suleistos imunodeficitinėms pelėms tokios ląstelės suformavo navikus šių gyvūnų plaučiuose. Tyrėjai priėjo prie išvados, kad didelė dalis gausinamų *in vitro* žmogaus MKL patiria spontaninę piktybinę transformaciją ir tai kelia rimtų klausimų dėl saugumo MKL naudoti terapijoje ir regeneracinėje medicinoje.

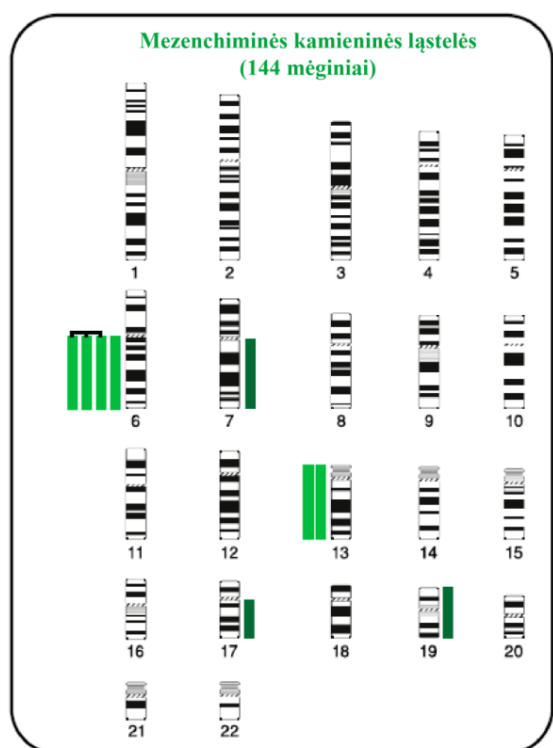
Tarte su bendraautoriais²⁶ augino žmogaus KČ MKL Geros gamybos praktikos sąlygomis panaudoti klinikoje. Kariotipuodami R metodu dažytas (angl. *reverse heat Giemsa-banded*) chromosomas jau trijose iš 20-ies 1 pasažo kultūrų nustatė 5-tos chromosomos trisomiją, dviejose iš šių trijų – dar ir 8-tos bei 20-tos chromosomų trisomijas. Tačiau šių pokyčių nebeaptiko 2 pasažo ląstelėse. Išimtis – viena kultūra, kurioje išliko 5-tos chromosomos

trisomija. Nepaisant to, visų mėginių ląstelės – tiek normalios, tiek aneuploidinės – po 35–52 PP perėjo į senėjimo fazę nesant transformacijos požymių *in vitro* ir *in vivo*: ląstelės nebeaugo minkštame agare, neformavo navikų pelių ir žmonių organizmuose. Tyrėjai padarė išvadą, kad žmogaus KČ MKL chromosomų nestabilumas nelemia ląstelių spontaninės piktybinės transformacijos ir, ko gero, yra ląstelių senėjimo požymis.

Bernardo su bendraautoriais⁶² augino žmogaus KČ MKL iki senėjimo fazės arba iki P25 (iki 44 sav.). Tirtos kas trečio pasažo ląstelės. Telomeros laipsniškai trumpėjo, tačiau telomerazė išliko neaktyvi. Genomo stabilumas buvo tirtas 3 metodais: tradicinio kariotipavimo, FISH (angl. *fluorescent in situ hybridization*) ir lyginamosios genomines hibridizacijos (angl. *array comparative genomic hybridization*). Jokių chromosomų aberacijų nebuvo nustatyta. Apibendrinus tyrimą konstatuota, kad žmogaus KČ MKL gali būti saugiai padaugintos *in vitro* ir yra tinkamos ląstelių terapijoje. *Kim* su bendraautoriais²⁰ žmogaus KČ MKL augino *in vitro* maždaug 150 dienų, per kurias ląstelių populiacija pasidalijo 60 kartų. Per pirmąsias 6 savaites (iki PP 30) ląstelių augimo greitis nekito, ląstelės išliko verpstės formos. Vėliau augimas lėtėjo, ląstelių forma ir dydis ėmė kisti, kol galiausiai ląstelių augimas visiškai sustojo – ląstelės perėjo į senėjimo fazę. Viso auginimo metu telomeros trumpėjo, telomerazės aktyvumas išliko labai nedidelis ir ląstelės (tirtos esant PP 10, PP 30, PP 55) išlaikė normalų kariotipą (46, XX). Suleidus PP 10, PP 30 bei PP 55 žmogaus KČ MKL pelėms, nenustatyta jokių ligų ar navikų formavimosi. Tokius pat rezultatus gavo ir *Jones* su bendraautoriais⁴⁷, auginę žmogaus KČ MKL lygiagrečiai flakonuose ir bioreaktoriuje *Quantum System* (*Terumo BCT*, JAV). Tyrėjai spektrinio kariotipavimo metodu nenustatė jokių kloninių chromosomų pokyčių, o suleidę ląstelių pelėms piktybinės neoplazinės transformacijos nenustatė.

Ben-David su bendraautoriais⁵⁵ surinko 22 nepriklausomų tyrimų, kurių metu buvo auginamos MKL, išskirtos iš 144 mėginių, MKL visuminės genų raiškos duomenis. Atlikę šių duomenų metaanalizę, nustatė, kad MKL būdingos pakankamai retos (~4 % mėginių), tačiau MKL specifinės didelio

masto chromosomų aberacijos: ~67 % aberacijų buvo monosomijos, dažniausiai 6q ir 13-tos chromosomos (10 pav.). 13-tos chromosomos monosomija yra stipriai susijusi su mezenchiminės kilmės (kaulų ir minkštųjų audinių) navikais. Šios aberacijos suteikia ląstelėms augimo pranašumą ir pakitusios ląstelės gali įsivyrauti jau 7 pasažo kultūroje.



10 pav. Ideograma, kurioje parodytos nustatytos chromosomų aberacijos auginamose *in vitro* žmogaus MKL

Stulpeliai, esantys chromosomų dešinėje, rodo papildomas chromosomas (ar jų dalis), o esantys kairėje – chromosomų delecijas. Chromosomų aberacijos, nustatytos to paties tyrimo mėginiuose, sujungtos juoda linija ir atliekant statistinę analizę laikytos viena aberacija. Pagal *Ben-David et al*⁵⁵

Nors dalis šokiruojančių publikacijų apie piktybinę žmogaus riebalinio audinio MKL⁶⁰ ir kaulų čiulpų MKL⁶¹ transformaciją vėliau buvo atšauktos^{63,64}, tačiau diskusijos apie žmogaus MKL genetinį stabilumą ir panaudojimo klinikinėje praktikoje saugumą išlieka aktualios^{55,65,66}. Siekiant išvengti MKL, kurių genetinės savybės pakitusios, panaudojimo klinikinėje praktikoje, MKL saugumas turi būti kruopščiai ištirtas⁶². Todėl reikia daugiau tyrimų, norint įvertinti MKL genomo stabilumą ilgalaikio auginimo *in vitro* metu⁵³. Tirti kamieninių ląstelių genomo stabilumą yra būtina siekiant tiksliai interpretuoti mokslinių tyrimų rezultatus ir saugiai panaudoti MKL terapijoje⁵⁵. Žmogaus MKL, skirtų panaudoti klinikinėje praktikoje, chromosomų stabilumą ištirti rekomenduoja Europos medicinos agentūra⁵² bei JAV maisto ir vaistų administracija (angl. *the U.S. Food and Drug Administration*)⁶⁷.

2.3.2 Žmogaus audinio šaldymo įtaka mezenchiminių kamieninių ląstelių genetiniam stabilumui

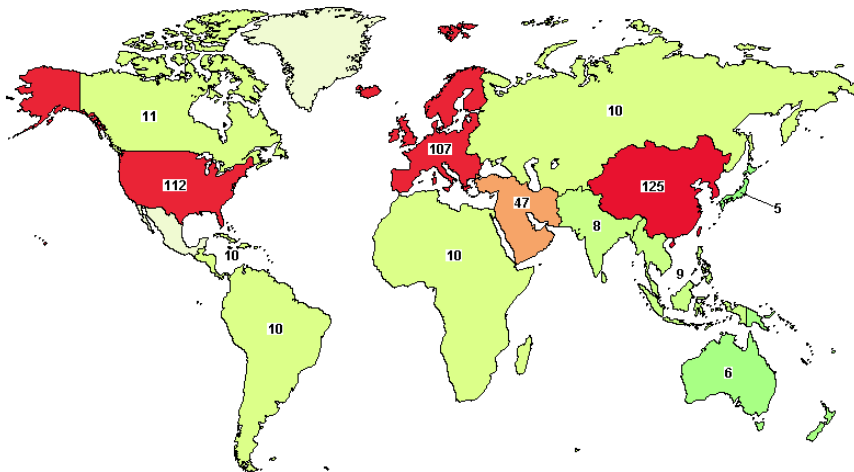
Virkštelės drebutiniame jungiamajame audinyje (VDJA) (angl. *Wharton's jelly*) yra gausu mezenchiminių kamieninių ląstelių (MKL)⁶⁸. Pats virkštelės audinys laikomas medicinine atlieka, o VDJA MKL išskyrimas yra neinvazinė procedūra⁶⁹. Virkštelės kraujo saugojimas valstybiniuose ar privačiuose biobankuose ateities klinikiniam pritaikymams yra plačiai pasaulyje paplitusi paslauga. Kai kuriuose iš šių biobankų jau yra saugojamos ir VDJA MKL⁷⁰.

Kriokonservavimas yra vienintelis gyvybingų ląstelių, naudojamų ląstelių terapijoje, ilgalaikio saugojimo būdas. Tačiau šaldymo–atšildymo procesas gali pažeisti ląsteles⁷¹. Kol kas nedaugelis tyrėjų geba išskirti MKL iš šaldyto virkštelės audinio – dažniausiai tai atliekama iš šviežio audinio fragmentų⁷⁰. Tačiau praktiniu požiūriu yra naudinga iš pradžių užšaldyti patį audinį, o ląsteles išskirti ir pagausinti vėliau, tik jų prireikus. Šiuo metu žinoma vos keletas bandymų išskirti gyvybingas VDJA MKL iš šaldyto virkštelės audinio: dalis jų buvo nesėkmingi, kitų bandymų metu išskirtų ląstelių savybės buvo pakitusios⁷². Todėl nepaprastai svarbu sukurti saugų, efektyvų ir GGP reikalavimus atitinkantį kriokonservavimo protokolą⁷³.

Pirmasis ir kol kas vienintelis žmogaus virkštelės audinio šaldymo įtaką MKL genomo stabilumui tyrė ir 2013 metais rezultatus paskelbė Da-Croce su bendraautoriais⁷⁴. VDJA nedidelių fragmentų kriokonservacija buvo atlikta 2 metodais: lėto šaldymo (angl. *slow cooling*) ir ypač greito (vitifikacija). Po 5–78 dienų mėginiai buvo atšildyti, MKL išskirtos ir, ląstelių tankiui pasiekus 80 %, atlikta kariotipo analizė. Visų 9 nešaldytų mėginių (kontrolė) VDJA MKL kariotipas buvo normalus, o 1 iš 8 lėtai šaldyto mėginio ląstelės buvo tetraploidinės (92, XXYY). Po vitifikacijos neužaugo nė viena iš 10 pasėtų ląstelių kultūrų. Tyrėjai mano, kad šaldymo metu naudotas DMSO galėjo paveikti ląstelių membranas, nulemti ląstelių susiliejamą ir galiausiai tetraploidijos išsivystymą.

2.4 Žmogaus mezenchiminių kamieninių ląstelių panaudojimas klinikinėje praktikoje

Žmogaus mezenchiminės kamieninės ląstelės (MKL) yra pagrindinės kamieninės ląstelės, naudojamos klinikiniuose tyrimuose. Šios ląstelės tyrinėjamos jau daugiau nei 10 metų⁷⁵, siekiant įvertinti jų potencialą skatinti imuninės sistemos reguliaciją ir audinių regeneraciją⁷⁶. Šiuo metu viešai prieinamoje klinikinių tyrimų duomenų bazėje www.clinicaltrials.gov yra užregistruoti 478 žinomos būklės MKL klinikiniai tyrimai (2016 m. gegužės 5 d. duomenimis). Daugiausia tyrimų atliekama Kinijoje (125), Jungtinėse Amerikos Valstijose (112) bei Europoje (107) (11 pav.). Europoje pagal didžiausią atliktų tyrimų kiekį (42) pirmauja Ispanija.

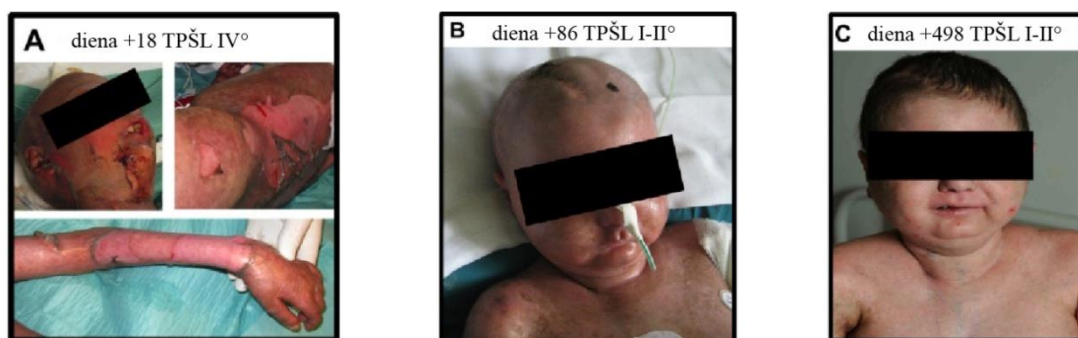


11 pav. Žmogaus MKL klinikinių tyrimų, atliekamų visame pasaulyje, skaičius

Paieška vykdyta viešojo duomenų bazėje www.clinicaltrials.gov 2016 m. gegužės 5 dieną, raktiniai žodžiai „mesenchymal stem cells“. Tyrimai, kurių būklė nežinoma, buvo atmesti

Šiuo metu kaulų čiulpai yra pagrindinis klinikiniam panaudojimui skirtų MKL šaltinis²⁰. Žmogaus KČ MKL yra daug žadančios gydant degeneracines ligas, vėžį bei atkuriant pažeistus audinius – tokiai terapijai šiuo metu nėra efektyvių gydymo priemonių⁷⁷. Daugiausia MKL klinikinių tyrimų atliekama gydant širdies ir kraujagyslių ligas, nuo kurių pasaulyje miršta daugiausia žmonių (dažniausiai nuo miokardo infarkto)⁷⁸, transplantato prieš šeimininką ligą (TPŠL) (angl. *Graft versus host disease*)^{79,80}, kepenų ligas (pvz., kepenų

cirozė)^{81,82}, osteoartritą⁸³, diabetą⁸⁴, Krono ligą⁸⁵ bei neurodegeneracines ligas⁸⁶. Ūmi steroidų terapijai atspari TPŠL yra gyvybei pavojinga komplikacija, išsivystanti 20–70 % atvejų po kaulų čiulpų transplantacijos⁸⁷. Ši komplikacija pasireiškia tuo, pažeidžiama oda, virškinimo traktas, kepenys ir limfohemopoetinė sistema⁸⁸. Klinikinių tyrimų metaanalizės parodė, kad gydant sunkios formos TPŠL pacientų bendrasis atsakas į MKL terapiją siekia net 73,8 %⁷⁹ (12 pav.), o 6 mėnesių išgyvenamumas siekia 63 %⁸⁹.



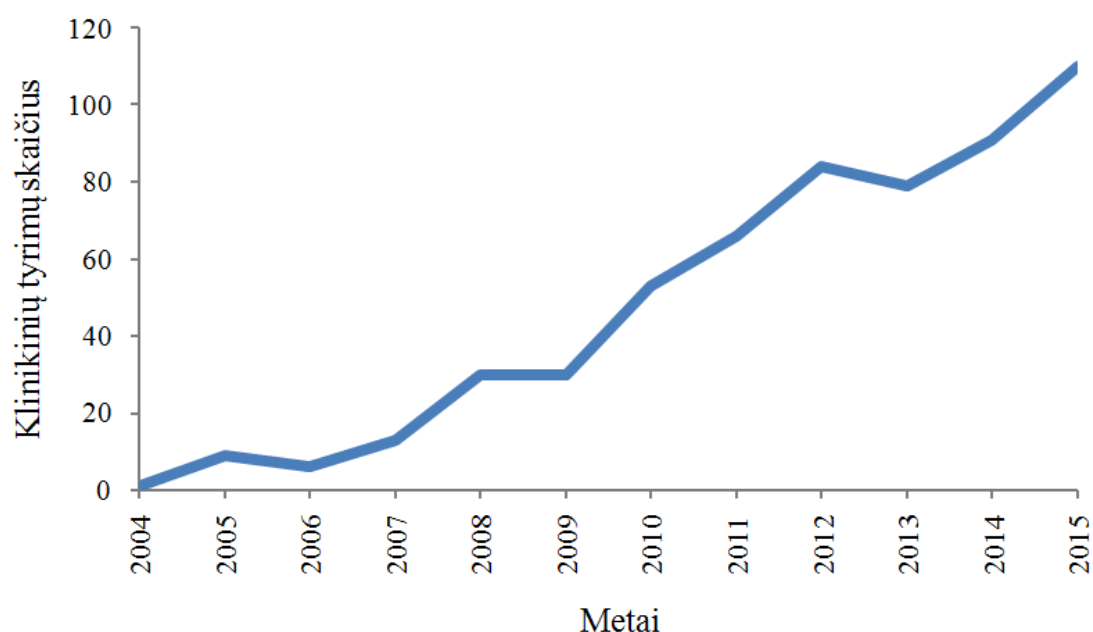
12 pav. Transplantato prieš šeiminką ligos (TPŠL), paveikusios odą, gydymo MKL eiga

A – sunkios ūmios TPŠL (IV laipsnio) pažeistas veidas, nugaros apačia ir kairysis dilbis praėjus 18 dienų po kraujodaros kamieninių ląstelių transplantacijos (KKLT) (4 dienas prieš MKL suleidimą). **B** – 86 diena po KKLT (60 dienų po MKL transplantacijos): oda sveika, TPŠL susilpnėjusi iki I–II laipsnio. **C** – veidas ir krūtinės viršus 498 dieną po KKLT (482 diena po MKL transplantacijos). Pagal *Wernicke et al*⁷⁹

Dabartinėmis žiniomis, MKL imunosupresinis ir regeneracinis poveikis pasireiškia šioms ląstelėms audinių pažeidimų vietose išskiriant bioaktyvias molekules, kurios pirmiausia nuslopina per daug agresyvias imuninės sistemos ląsteles. Tai apsaugo pažeistą audinį nuo autoimuninių reakcijų. Koordinuotai su šia apsaugine funkcija MKL sintetina molekules, kurios padeda susiformuoti regeneracinei mikroaplinkai, kurioje: 1) slopinama išemijos sužadinta apoptozė, 2) neleidžiama formotis randams, 3) skatinama angiogenezė ir kraujagyslių stabilumas, 4) skatinama audinio endogeninių ląstelių-pradininkų mitozė⁹⁰.

Susidomėjimas MKL vis labiau auga – kasmet užregistruojamų vis daugiau MKL klinikinių tyrimų (13 pav.). Iki šiol atlikti klinikiniai tyrimai

parodė, kad MKL terapija yra saugi⁷⁵: nenustatyta jokie ūmaus toksiškumo ir jokių ektopinių audinių formavimosi židinių⁸⁸. Šiuo metu vyksta 39 III bei IV fazių klinikiniai tyrimai (www.clinicaltrials.gov). Visa tai rodo, kad MKL klinikinių tyrimų progresas tikriausiai nulems tai, kad MKL terapija ilgainiui taps plačiai prieinama. 2012 metais Kanados sveikatos apsaugos reguliacinės tarnybos pirmą kartą pasaulyje suteikė leidimą MKL taikyti terapijoje, leisdamos žmogaus kaulų čiulpų MKL produktą *Prochymal* (*Osiris Therapeutics, Inc.*, JAV) naudoti vaikų TPŠL gydyti.



13 pav. Kiekvienais metais užregistruotų MKL klinikinių tyrimų skaičius
Duomenys iš duomenų bazės www.clinicaltrials.gov, paieška vykdyta 2016 m. kovo 29 d.

2.5 Žmogaus mezenchiminių kamieninių ląstelių tyrinėjimai Lietuvoje

Lietuvoje daugiausia tyrimų su žmogaus mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis (MKL) atliekama Inovatyvios medicinos centre. Aldonytė su bendraautorais⁹¹ tyrinėjo uždegimo aplinkos įtaką danties pulpos (DP) MKL funkcinėms savybėms. Tyrėjai nustatė, kad baltymas α -1-antitripsinas (AAT), priklausomai nuo koncentracijos, skatina DP MKL

prolifraciją ir judrumą *in vitro*. Autoriai priėjo prie išvados, kad AAT koncentracija uždegimo židiniuose gali būti pagrindinis veiksnys, veikiantis ląsteles-pradininkes *in vivo* ir nulemiantis audinio gebėjimą regeneruotis. Tunaitis su bendraautorais⁹² kūrė ir tyrė naujas žmogaus riebalinio audinio (RA) MKL auginimo technologijas. Tyrėjai ląsteles augino standartinėje DME terpėje su skirtingais terpės priedais. Autoriai nustatė, kad terpėje su skirtingais serumais augintų RA MKL savybės (tokios kaip augimas, diferenciacija, imunofenotipas ir proteomas) yra panašios, tačiau skiriasi nuo ląstelių, augintų pranašesnėje – kurioje nėra serumo – terpėje. Jarmalavičiūtė su bendraautorais⁹³ sukūrė naują trijų etapų DP MKL nervinės diferenciacijos protokolą, apimančią ląstelių adaptaciją prie beseruminės aplinkos. Pagal šį protokolą išauginamos nervinių ir glijos ląstelių mišrios kultūros. Jarmalavičiūtė su bendraautorais taip pat tyrė DP MKL sekretomo įtaką nervinių ląstelių apoptozei *in vitro*⁹⁴. Tyrėjai nustatė, kad DP MKL išskiriamos egzosomos pasižymi nervinių ląstelių apsauginėmis savybėmis: jos slopina dopaminerginių nervinių ląstelių, patyrusių oksidacinį stresą, apoptozę. Mokslininkai tikisi, kad šiuos atradimus galima bus pritaikyti gydant Parkinsono ligą. Pivoraitė su bendraautorais⁹⁵ tyrinėjo DA MKL slopinamąjį poveikį ūmaus uždegimo *in vivo* atveju. Tyrėjai pirmą kartą parodė, kad šių ląstelių išskiriamos egzosomos reikšmingai nuslopina karageno sukeltą uždegimą laboratoriniuose gyvūnuose. *Denkovskij* su bendraautorais⁹⁶ ieškojo reumatoidiniu artritu ir osteoartritu sergančių pacientų sinovijos MKL (S MKL) žymenų. Ištyrę 24 paviršiaus žymenų, susijusių su ląstelių kamieniškumu ir agresyvumu, raišką, tyrėjai nustatė, kad statistiškai reikšmingai skyrėsi 3 žymenų raiška: CD47 bei CD271 raiška buvo mažesnė ir CD10 raiška buvo didesnė reumatoidiniu artritu sergančių pacientų S MKL, palyginti su minėtų žymenų raiška osteoartritu sergančių pacientų S MKL. O protoporfirino IX, naudojamo ląstelių metaboliniam aktyvumui įvertinti, fluorescencijos vidutinis intensyvumas tarp reumatoidinio artrito ir osteoartrito grupių statistiškai nesiskyrė.

Vilniaus universitete Daniūnaitė su bendraautoriais⁹⁷ vykdė žmogaus RA MKL osteogeninės diferenciacijos epigenetinės reguliacijos tyrimus. Pirmą kartą buvo parodyti, kad RA MKL osteogeninės diferenciacijos metu viso genomo mastu daugiausia vyksta DNR citozinių 5C pozicijos metilo grupės (5mC) praradimas bei hidrosimetilo grupių (5hmC) gausėjimas. Šie pokyčiai koreliavo su epigenetinio regulatoriaus *TET1* raiškos stiprėjimu. Taip pat pirmą kartą parodyta, kad abu – 5mC ir 5hmC – žymenys būdingi RA MKL pluripotentiškumo geno *POU5F1* lokusui, kuris metilintas tiek nediferencijuotose, tiek diferencijuotose RA MKL. Tyrėjai priėjo prie išvados, kad tik 5hmC nulemia nedidelę *POU5F1* raišką ląstelėse. Savickienė su bendraautoriais⁹⁸ charakterizavo žmogaus amniono vandenų MKL (AV MKL) savybes. Nustatė, kad šioms ląstelėms būdinga MKL tipiška morfologija, imunofenotipas ir diferenciacijos potencialas. Tyrėjai pirmą kartą atliko nediferencijuotų ir diferencijuotų AV MKL palyginamąją proteomo analizę ir parodė, kad diferencijuotų ir nediferencijuotų AV MKL proteomai apskritai yra panašūs ir kad apie 215 baltymų raiška kinta diferenciacijos į skirtingas ląstelių linijas (miocitus, adipocitus, osteocitus ir neuronus) metu. Tyrėjai priėjo prie išvados, kad nėštumo II ir III trimestro amniono vandenyse yra klinicinei praktikai reikšmingų kamieninių ląstelių, o tyrimo metu nustatyti specifiniai baltymai gali padėti ieškant diferencijuotų ląstelių žymenų.

Įmonė *Teva Pharmaceutical Industries* remia klinikinį tyrimą, kurio metu tyrinėjamas preparato CEP-41750, pagaminto iš žmogaus kaulų čiulpų alogeninių mezenchiminių ląstelių-pradininkių, saugumas ir efektyvumas gydant lėtinį širdies nepakankamumą. Duomenų bazės www.clinicaltrials.gov duomenimis Lietuva į šį tyrimą buvo įtraukta 2016 m. balandžio mėn. Tai yra pirmasis MKL klinikinis tyrimas Lietuvoje.

3. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

3.1 Biomedicininį tyrimų etikos komiteto leidimas

Tyrimas, laikantis visų asmens duomenų apsaugos bei bioetikos reikalavimų, buvo vykdomas 2011 – 2015 metais Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakultete (VU GMF) ir Nacionaliniame vėžio institute (NVI). Leidimą atlikti biomedicininį tyrimą išdavė Vilniaus regioninis biomedicininį tyrimų etikos komitetas (leidimo numeris 158200-09-381-104). Visi ląstelių donorai pasirašė Asmens informavimo ir Informuoto paciento sutikimo formas.

3.2 Medžiagos ir reagentai

Reagentai KČ MKL išskirti ir pagausinti:

- Mitybinė terpė RPMI 1640 (*Gibco*, Didžioji Britanija, kataloge nr. 21875-034)
- Mitybinė terpė DME (*Lonza*, Belgija, kataloge nr. BE12-707F)
- Fikolio tirpalas *Ficoll-Paque™ Plus* (*GE Healthcare Bio-Sciences AB*, Švedija, kataloge nr. 17-1440-03)
- Eritrocitų lizės buferinis tirpalas (iš rinkinio *QIAamp RNA Blood Mini Kit*, *Qiagen*, Vokietija, kataloge nr. 52304)
- Žmogaus MKL bazinė terpė *MesenCult®* (*StemCell Technologies*, Kanada, kataloge nr. 05401)
- FVS, skirtas žmogaus MKL auginti (*StemCell Technologies*, Kanada, kataloge nr. 06471)
- Karščiu inaktyvintas FVS (*Invitrogen*, Jungtinė Karalystė, kataloge nr. 10500064)
- Antibiotikų – penicilino (10,000 U/ml), streptomicino (10,000 µg/ml) ir amfotericino B (25 µl/ml) – tirpalas (*Lonza*, JAV, kataloge nr. 17-745E)

- 0,25 % (1X) tripsino tirpalas su EDTA 4Na (*Life Technologies*, JAV, kataloge nr. 25200-072)
- fiziologinis (0,9 % NaCl) tirpalas (*B. Braun Melsungen AG*, Vokietija, kataloge nr. R99/6578/4).

KČ MKL auginimo terpės galutinė sudėtis:

- *MesenCult*® bazinė terpė +10 % (v/v) FVS +1 % (v/v) antibiotikų mišinio.

Plastikinės priemonės KČ MKL išskirti, auginti ir šaldyti:

- Vakuuminiai mėgintuvėliai, 10 ml, su heparinu (antikoaguliantu) (*BD Vacutainer*TM, Jungtinė Karalystė, kataloge nr. 368480)
- Plastikiniai plokščiadugniai auginimo flakonai su užsukamais ventiliuojamais kamšteliais *Falcon*TM (*BD Biosciences*, JAV): T25 (kataloge nr.353109), T75 (kataloge nr. 353136) ir T175 (kataloge nr. 353112)
- Kūginiai mėgintuvėliai *Falcon*® (*BD Biosciences*, JAV): 15 ml (kataloge nr. 352097) ir 50 ml (kataloge nr. 352098)
- 2 ml tūrio kriomėgintuvėliai (*Crioval*, Kanada, kataloge nr. T311-2)
- Sterilios vienkartinės plastikinės pipetės (*APS*, Prancūzija): 10 ml (kataloge nr. PN10E1) ir 25 ml (kataloge nr. PN25E1)
- 3 ml tūrio vienkartinės sterilios Pastero pipetės (*Aptaca*, Italija, kataloge nr. 1502/SG/CS)
- Sandarinimo juostelė *Parafilm*® (*Bemis*, JAV, kataloge nr. 9170002).

Reagentai KČ MKL šaldyti:

- MKL šaldymo terpė (*Biological Industries*, Izraelis, kataloge nr. 05-712-1E).

Rinkinys KČ MKL imunofenotipui tirti:

- *Stemflow™ Human MSC Analysis Kit* (BD Biosciences, JAV, kataloge nr. 562245).

Reagentai KČ MKL senėjimui tirti:

- Komercinis senstančių ląstelių histocheminio dažymo rinkinys *Senescence Cells Histochemical Staining Kit* (Sigma-Aldrich, JAV, kataloge nr. CS0030-1KT).

Medžiagos MKL kariotipui tirti G–dažymo metodu:

- Kolchicinas (*Sigma-Aldrich*, JAV, kataloge nr. C9754-100MG). Darbinis kolchicino tirpalas - 1 mg/ml dist. H₂O
- Fosfatinis buferinis tirpalas: 0,497 % (w/v) Na₂HPO₄ (*Honeywell Rieder-deHaën*, Vokietija, kataloge nr. 30427), 0,476 % (w/v) KH₂PO₄ (*Honeywell Rieder-deHaën*, Vokietija, kataloge nr. 04243), pH 6,8
- 0,55 % KCl hipotoninis tirpalas (*Honeywell Rieder-deHaën*, Vokietija, kataloge nr. 12638)
- Fiksacijos tirpalas: metanolis (*Carl Roth*, Vokietija, kataloge nr. 4627.5) ir acto rūgštis (*Honeywell Rieder-deHaën*, kataloge nr. 27221), sumaišyti santykiu 3:1
- 0,25 % (1X) tripsino tirpalas su EDTA 4Na (*Life Technologies*, JAV, kataloge nr. 25200-072)
- 0,4 % (w/v) Giemsa dažai, pH 6,8 (*Sigma-Aldrich*, JAV, kataloge nr. GS500-500ML). Darbinis Giemsa dažų tirpalas: pradiniai Giemsa dažai skiedžiami fosfatinio buferinio tirpalu (pH 6,8) santykiu 1:19
- Stiklinės 230 mm ilgio Pastero pipetės (*Carl Roth*, Vokietija, kataloge nr. 4522.1)
- Standartiniai 26x76x1 mm objektiniai stikleliai (*ThermoScientific*, JAV, kataloge nr. 10143562CE)
- 96 % etanolis (*AB Vilniaus degtinė*).

PGR gardelės. MKL genų raiška tirta, naudojant komercines 100 šulinėlių formato kiekybinės PGR gardeles:

- *RT² Profiler™ PCR Array Human Mesenchymal Stem Cells* (Qiagen, JAV, kataloge nr. PAHS-082Z)
- *RT² Profiler™ PCR Array Human Cellular Senescence* (Qiagen, JAV, kataloge nr. PAHS-050Z)
- *miScript miRNA PCR Array Human miRNome* (Qiagen, JAV, kataloge nr. MIHS-216Z).

PGR gardeles *RT² Profiler* sudaro 84 tiriamieji genai, 12 kontrolių šulinėlių ir 4 tušti šulinėliai. Gardeles *miScript miRNA* sudaro 84 tiriamosios subrendusios miRNR, 12 kontrolinių šulinėlių ir 4 tušti šulinėliai. Tyrime gardelių *miScript miRNA* panaudotos 5 dalys iš 12 (tirta iš viso 420 subrendusių miRNR).

PGR gardelių *RT² Profiler* kontrolės:

1. Penki „namų ruošos“ (angl. *housekeeping*) genai – pagal juos normalizuojami gardelių duomenys
2. Trys teigiamos PGR kontrolės (angl. *positive PCR control*) – tikrinamas PGR reakcijos efektyvumas. Kontrolę sudaro gamintojo dirbtinai sukurta DNR seka ir ją aptinkantys veiksniai
3. Trys atvirkštinės transkripcijos kontrolės (angl. *reverse-transcription control*) – tikrinamas atliktos atvirkštinės transkripcijos efektyvumas, aptinkant matricą, kuri susintetinama atvirkštinę transkripciją atlikus rinkiniu *RT² First Strand Kit*
4. Viena užterštumo genomine DNR kontrolė (angl. *genomic DNA control*) – specifiskai ir labai jautriai aptinkama netranskribuojama genomine DNR.

PGR gardelių *miScript miRNA* kontrolės:

1. Dvi *C. elegans* miR-39
2. Šešios snoRNR/snRNR

3. Dvi atvirkštinės transkripcijos kontrolės
4. Dvi teigiamos PGR kontrolės.

Rinkiniai, naudoti atliekant genų raiškos tyrimą:

- Visuminės RNR išskyrimo rinkinys *RNeasy Plus Mini Kit* (*Qiagen*, Vokietija, kataloge nr. 74134)
- *RNase-free DNase Set* (*Qiagen*, Vokietija, kataloge nr. 79254)
- Komplementarios DNR (kDNR) sintezės rinkinys *RT² First Strand Kit* (*Qiagen*, JAV, kataloge nr. 330401)
- Mišinys *RT² FAST SYBR Green/ROX PCR Mastermix* (*Qiagen*, JAV, kataloge nr. 330623), skirtas PGR gardelėms RT² Profiler™
- miRNR kDRN sintezės rinkinys *miScript II RT Kit* (*Qiagen*, Vokietija, kataloge nr. 218161)
- Mišinys *miScript SYBR Green PCR Kit* (*Qiagen*, Vokietija, kataloge nr. 218076), skirtas PGR gardelėms *miScript miRNA*.

Plastikinės priemonės, naudotos atliekant genų raiškos tyrimą:

- 1,5 ml mėgintuvėliai *Biopur*® (*Eppendorf*, Vokietija, kataloge nr. 0030121.589)
- Sterilūs, su filtrais, PGR reakcijoms skirti vienkartiniai pipečių antgaliai *Eppendorf*: 1000 µl (kataloge nr. 022491253, JAV), 200 µl (kataloge nr. 022491296), 10 µl (kataloge nr. 022491211, JAV); *Rainin* 20 µl (JAV, kataloge nr. 17007957).

Papildomos medžiagos ir priemonės, naudotos atliekant genų raiškos tyrimą:

- Chloroformas (*Carl Roth*, Vokietija, kataloge nr. 3313.1)
- 96 % etanolis (*AB Vilniaus degtinė*)
- Šaldomas gardelių užpildymo blokas *Rotor-Disc 100* (*Qiagen*, Vokietija, kataloge nr. 9018909).

3.3 Įranga

Tyrimo metu naudota įranga:

- II saugumo klasės laminarinė traukos spinta *Kojair* (Singapūras)
- Invertuoti mikroskopai *Nikon* (modeliai *Eclipse Ti-S* ir *Eclipse TS100*, Japonija). Vaizdinimo ir fotografavimo programinė įranga *NIS-Elements, F Package*, 3.22.00 versija (*Nikon*, Japonija)
- Mikroskopas *Leica* (modelis DM6000B, Vokietija). Programinė įranga *Cytovision*, 7 versija (*Genetix*, JAV)
- Ląstelių skaičiuoklis ir analizotius *Casy* (modelis *TT*, *Roche*, Vokietija)
- Pipetės *Eppendorf* (1000/ 200/10 µl, Vokietija), *Rainin* (20 µl, JAV)
- Automatinė pipetė *Pipet-X* (*Rainin*, Vokietija)
- Centrifugos *Eppendorf* (modeliai 5702, 5430 ir 5424, Vokietija)
- +37 °C, 95% drėgmės, 5 % CO₂ inkubatoriai *Thermo Fisher Scientific* (modelis *RCC5000T-5-VBC*, JAV) ir *Nuair* (modelis *NU-5800*, JAV)
- +37 °C vandens vonelė *BWT-U* (*Biosan*, Latvija)
- Tėkmės citometras *LSR II* (*BD Biosciences*, JAV), duomenys apdoroti *FlowJo X* programine įranga
- Spektrofotometras *NanoDrop 2000c* (*Thermo Fisher Scientific*, JAV)
- Bioanalizatorius *Agilent 2100* (*Agilent Technologies*, JAV)
- Termocikleris *Labcycler* (*Senso Quest GmbH*, Vokietija)
- Termocikleris *Rotor-Gene Q* (*Qiagen*, Vokietija) su programine įranga *Rotor-Gene Q* (2.1.0.9. versija)
- PGR gardelių užsandaravimo prietaisas (*Qiagen*, Vokietija)
- Smulkaus ledo gaminimo prietaisas *AF80* (*Scotsman*, Jungtinė Karalystė)
- +4 °C šaldytuvas (*Snaigė*, Lietuva)
- Šaldymo dėžė *Mr. Frosty* (*Thermo Fisher Scientific*, JAV)

- Šaldikliai: $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*Whirlpool*, JAV), $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*Arctiko*, Danija), $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ (*Sanyo*, Japonija)
- Šaldiklis *Ice Cube* (*SY-LAB Cryobiology*, Austrija)
- Kriokonservavimo sistema (*Worthington Industries*, JAV).

3.4 Tyrimo objektas

Mokslinio darbo metu tirtos šios MKL:

- 1) išskirtos iš 8 sveikų suaugusių donorų (amžius 18-38 metai) kaulų čiulpų, likusių po transplantacijos. Likutinė kaulų čiulpų medžiaga gauta iš VU ligoninės Santariškių klinikų filialo Vaikų ligoninės Vaikų onkohematologijos centro Vaikų onkohematologijos skyriaus.
- 2) Išskirtos iš 8 naujagimių virkštelės drebutinio jungiamojo audinio. MKL išskirtos ir paruoštos tyrimams įmonėje *The Cell Factory* (Belgija).

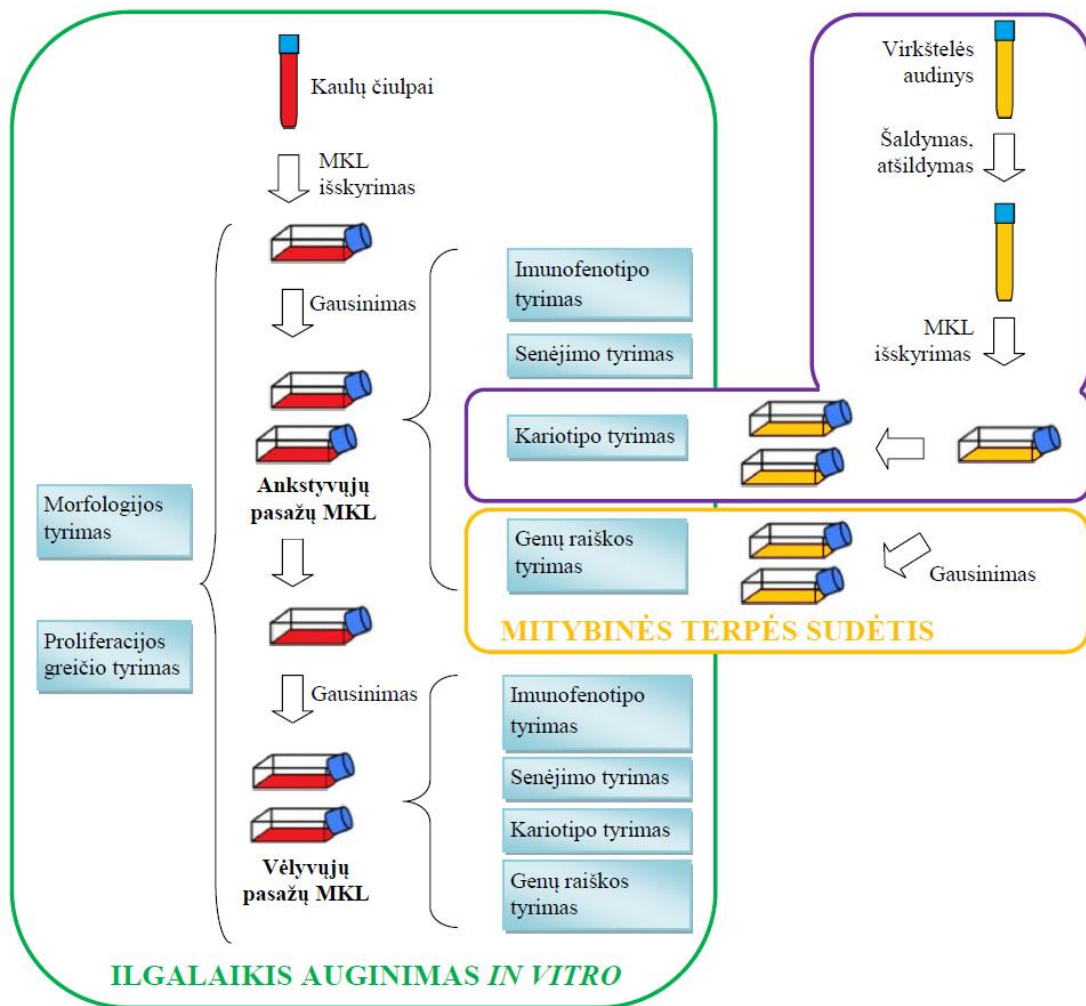
3.5 Tyrimo eiga

Šio tyrimo metu mes tyrėme trijų poveikių – ilgalaikio auginimo *in vitro*, audinio šaldymo ir mitybinės terpės sudėties – įtaką žmogaus MKL genetinėms savybėms. Tyrimą apibendrinanti schema pateikta 14 pav.

Pirmiausia kūrėme naują MKL išskyrimo iš likutinės žmogaus kaulų čiulpų transplantacijos medžiagos ($n = 4$) metodiką, paremtą raudonųjų kraujo ląstelių lizės principu. Tada vertinome išskirtų ir padaugintų *in vitro* iki terapijai tinkamo kiekio (2 pasažo) ląstelių savybes: morfologiją, proliferacijos kinetiką. Kad išskirtos ir pagausintos ląstelės tikrai yra MKL įsitikinome atlikę imunofenotipo analizę.

Vėliau ląstelių savybes vertinome išsamiau. Tam metodikos kūrimo etape užšaldytas P1 KČ MKL ($n = 3$) atšildėme ir gausinome *in vitro*, kol užaugo 3–4 pasažai, siekdami užtikrintai turėti terapijai tinkamą ląstelių kiekį ($>1 \cdot 10^8$). Dalį ankstyvųjų pasažų ląstelių užšaldėme, po 6 mėn. atšildėme ir auginome papildomus 3 pasažus, kol užaugo vėlyvųjų 6–7 pasažų ląstelės,

AUDINIO ŠALDYMAS



14 pav. *In vitro* atliekamų manipuliacijų įtakos žmogaus MKL genetinėms savybėms tyrimo apibendrinanti schema

Šio tyrimo metu tirta trijų poveikių – ilgalaikio auginimo *in vitro*, audinio šaldymo ir mitybinės terpės sudėties – įtaka žmogaus MKL genetinėms savybėms

siekdami nustatyti galimo papildomo terapijai tinkamo kiekio MKL savybes. Remdamiesi Tarptautinės ląstelių terapijos draugijos¹⁰, Europos medicinos agentūros^{52,99} bei JAV maisto ir vaistų administracijos⁶⁷ rekomendacijomis tyrinėjome šias MKL savybes: proliferacijos greitį, tvirtinimąsi prie plastiko, morfologiją, imunofenotipą, senėjimo būklę, chromosomų stabilumą ir su ląstelės ciklu siejamų genų raišką pritaikydami gardelių technologiją. Palyginę vėlyvųjų ir ankstyvųjų pasažų KČ MKL charakteristikas, vertinome ilgalaikio auginimo *in vitro* įtaką žmogaus KČ MKL savybėms, ypač didelį dėmesį skirdami genetinėms savybėms.

Pradinio audinio šaldymo įtaką MKL genetinėms savybėms vertinome, tirdami iš kontroliuotai šaldyto ir vėliau atšildyto virkštelės audinio išskirtų VDJA MKL (n = 5) kariotipą.

Mitybinės terpės sudėties įtaką MKL genetinėms savybėms vertinome, tirdami su ląstelės ciklu siejamų genų visuminę raišką VDJA MKL (n = 3), augintose rekombinantiniais baltymais papildytoje mitybinėje terpėje ir įprastoje DME terpėje, papildytoje 10 % FVS.

3.6 Metodai

3.6.1 Išskyrimas ir auginimas

KČ MKL išskyrimo taikant centrifugavimo per fikolio gradientą metodus (NVI):

1. Visos manipuliacijos su ląstelėmis atliktos II saugumo klasės laminarinėje traukos spintoje.
2. 60 ml kaulų čiulpų (10 vakuuminių mėgintuvėlių po 6 ml) skiesti standartine RPMI 1640 terpe.
3. Turinys atsargiai užsluoksniuotas ant fikolio tirpalo 50 ml kūginiame mėgintuvėlyje. Fikolio ir praskiestų kaulų čiulpų santykis 1:3.
4. Centrifuguota 20 min. esant 300 g.
5. Po centrifugavimo nusiurbtas balkšvos spalvos sluoksnis, susiformavęs tarp fikolio sluoksnio ir RPMI terpės su kraujo plazma sluoksnio, ir perpiltas į naują 50 ml kūginį mėgintuvėlį.
6. Praplauta 2 kartus, tam naudojant 20 ml DME terpės, savo sudėtyje turinčios 10 % karščiu inaktyvinto FVS.
7. Suskaičiuotos ląstelės ir $1 \cdot 10^8$ jų užsėta į T175 flakoną su DME terpe, savo sudėtyje turinčioje 10 % karščiu inaktyvinto FVS.
8. Flakonas laikytas inkubatoriuje 24 val. esant standartinėms aplinkos sąlygoms: 37 °C temperatūra, 95 % drėgmė, 5 % CO₂.

KČ MKL išskyrimo taikant raudonųjų kraujo ląstelių lizę metodas (NVI):

1. Visos manipuliacijos su ląstelėmis atliktos II saugumo klasės laminarinėje traukos spintoje.
2. 6 ml kaulų čiulpų (1 vakuuminis mėgintuvėlis) perpilta į 50 ml kūginį mėgintuvėlį.
3. Įpilta eritrocitų lizės buferinio tirpalo santykiu 1:5.
4. Mėgintuvėlis švelniai pavartytas rankose 1 min. ir iškart centrifuguotas 5 min. esant 480 g.
5. Supernatantas pašalintas, ląstelės plautos jas suspenduojant 5 ml RPMI 1640 terpės.
6. Centrifuguota 5 min. esant 480 g.
7. Praplovimas kartotas tomis pačiomis sąlygomis.
8. Po antrojo praplovimo ląstelės suspenduotos ir visas turinys perpiltas į T175 flakoną su DME terpe, savo sudėtyje turinčioje 10 % karščiu inaktyvuoto FVS.
9. Flakonas laikytas inkubatoriuje 24 val. esant standartinėms aplinkos sąlygoms: 37 °C temperatūra, 95 % drėgmė, 5 % CO₂.

KČ MKL auginimas (VU GMF, NVI):

1. MKL augintos komercinėje *MesenCult*® terpėje, savo sudėtyje turinčioje 10 % FVS. Ląstelės augintos plastikiniuose flakonuose T25, T75 arba T175.
2. Flakonai laikyti inkubatoriuje, kuriame aplinkos sąlygos: temperatūra 37 °C, drėgmė, 5 % CO₂.
3. Terpė keista kas 3–4 dienas.

KČ MKL persėjimas (VU GMF, NVI):

1. Ląstelėms padengus 80–100 % flakonų paviršiaus ploto, mitybinė terpė nusiurbta, flakonas praplautas fiziologiniu tirpalu.
2. Fiziologinis tirpalas nusiurbtas ir užpilta 1 ml (T25 flakonas), 3 ml (T75 flakonas) arba 7 ml (T175 flakonas) 0,25 % tripsino tirpalo.

3. Flakonai laikyti 5 min. inkubatoriuje, kuriame +37 °C temperatūra, 95 % drėgmė ir 5 % CO₂.
4. Tikrinta naudojant mikroskopą: jei ląstelės dar neatlipo, flakonas laikytas inkubatoriuje dar keletą min.
5. Atlipus daugumai ląstelių, įpilta 0,5 tūrio karščiu inaktyvinto FVS.
6. Visas turinys perpiltas į 15 ml kūginius mėgintuvėlius.
7. Centrifuguota 5 min. esant 400 g.
8. Supernatantas pašalintas. Ląstelės suspenduotos 1 ml mitybinės terpės.
9. Apskaičiuota ląstelių koncentracija.
10. Ląstelės pasėtos į naujus flakonus 4000 ląstelių/cm² tankiu.

VDJA MKL išskyrimas ir auginimas. VDJA MKL išskirtos iš kontroliuotai šaldyto virkštelės audinio ir pagausintos *in vitro* įmonėje *The Cell Factory* (Belgija). Ląstelės augintos dviejose skirtingose mitybinėse terpėse: 1) terpėje su rekombinantiniais baltymais ir atitinkančioje GGP reikalavimus, 2) DME terpėje, papildytoje 10 % FVS.

3.6.2 Proliferacijos tyrimas

KČ MKL kiekio nustatymas (VU GMF, NVI):

- MKL išskyrimo iš likutinės kaulų čiulpų medžiagos metodikos kūrimo metu ląstelių kiekis nustatytas, panaudojus skaičiavimo kamerą *Bürker* (*LO-Laboroptik GmbH*, Jungtinė Karalystė).
- Ilgą laiką kultivuotų *in vitro* MKL kiekis ir gyvybingumas analizuoti ląstelių skaičiuokliu ir analizatoriumi *Casy* pagal gamintojo rekomendacijas: 10 µl MKL suspensijos sumaišyta 10 ml *Casy* izotoniniame buferiniame tirpale, naudotas 150 µm kapiliaras ir specialiai MKL analizei sukurtas programos šablonas.
- P3/P4 ir P6/P7 ląstelių kiekis ir gyvybingumas papildomai vertinti ląsteles 5 min. dažant 7-AAD ir matuojant tėkmės citometru.

KČ MKL proliferacijos kinetikos įvertinimas (VU GMF):

- Ląstelių kiekio populiacijoje didėjimas ilgalaikio auginimo *in vitro* metu buvo išreikštas bendru populiacijos padvigubėjimu (BPP), kai konkretaus pasažo populiacijos padvigubėjimas (PP) pridedamas prie ankstesnių pasažų PP sumos.
- Populiacijos padvigubėjimas – dydis, kuris parodo, kiek kartų padvigubėjo ląstelių kiekis kultūroje. Apskaičiuotas pagal formulę

$$PP = \log\left(\frac{X_b}{X_a}\right) \cdot 3,3, \text{ kur } X_a - \text{ląstelių kiekis auginimo pradžioje, } X_b -$$

ląstelių kiekis auginimo pabaigoje, 3,3 – koeficientas.

3.6.3 Morfologijos tyrimas

Augintų žmogaus KČ MKL morfologija buvo tirta *Nikon* invertuotu fazės kontrasto mikroskopu, naudojant vaizdinimo ir fotografavimo programinę įrangą *NIS-Elements*. Ląstelių užimamo ploto analizė atlikta, naudojant programinę įrangą *ImageJ* (1.50e versija). Morfologijos tyrimas atliktas VU GMF ir NVI. Ląstelių užimamo ploto analizę atliko j. m. d. Jan Krasko (NVI).

3.6.4 Šaldymas ir atšildymas

KČ MKL šaldymas ir saugojimas (NVI):

1. Ląstelės šaldytos kriomėgintuvėliuose su šaldymo terpe, po $1-5 \cdot 10^6$ ląstelių/ml.
2. Į šaldiklį, kuriame buvo -80 °C temperatūra, perkelta šaldymo dėžė *Mr. Frosty* su kriomėgintuvėliais viduje. Kriomėgintuvėliuose temperatūra mažėjo 1 °C kas minutę.
3. Po 24 val. kriomėgintuvėliai perkelti ir saugoti -150 °C šaldiklyje.
4. Užšaldytos saugoti buvo P1 ir P3–P4 KČ MKL.

KČ MKL atšildymas (NVI):

1. Po 6 mėn. kriomėgintuvėliai staigiai atitirpinti +37 °C vandens vonioje, kol likdavo nedidelis ledo gabaliukas.
2. Turinys perpiltas į 15 ml kūginį mėgintuvėlį.
3. Į mėgintuvėlį lėtai lašintas dvigubas tūris pašildytos mitybinės terpės, savo sudėtyje turinčioje 15 % FVS.
4. Centrifuguota 10 min. esant 150 g.
5. Supernatantas pašalintas. Ląstelės suspenduots 1 ml galutinės sudėties mitybinės terpės.
6. Nustatytas ląstelių skaičius.
7. Ląstelės pasėtos į atitinkamus auginimo indus 4000 MKL/cm² tankiu ir auginamos standartinėmis sąlygomis.

Virkštelės audinio šaldymas. VDJA buvo paruošti šaldymui, užšaldyti iki –45° C šaldiklyje *Ice Cube* pagal šaldymo temperatūrinį režimą ir vėliau saugoti kriokonservavimo sistemoje įmonėje *The Cell Factory* (Belgija).

VDJA MKL šaldymas. Pagausintos *in vitro* VDJA MKL buvo užšaldytos iki –45° C šaldiklyje *Ice Cube* pagal šaldymo temperatūrinį režimą įmonėje *The Cell Factory* (Belgija) ir per 24 val. buvo atsiųstos genų raiškos tyrimui transportavimo dėžėje, kurioje buvo sauso ledo.

3.6.5 Imunofenotipo tyrimas

- KČ MKL imunofenotipas tirtas, naudojant komercinį MKL standartinių paviršiaus žymenų rinkinį *Stemflow™ Human MSC Analysis Kit* pagal gamintojo protokolą.
- Rinkinį sudaro antikūnai prieš ląstelių paviršiaus žymenis CD44, CD73, CD90, CD105 bei antikūnų mišinys prieš ląstelių paviršiaus žymenis CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA–DR.
- MKL mėginių gyvybingumas įvertintas dažant ląsteles 5 min. 7-AAD.

- Ląstelių granuliuotumas nustatytas įvertinus šviesos šoninę sklaidą.
- Citometriniai matavimai atlikti LSR II tėkmės citometru.
- Kiekvieno mėginio išanalizuota 10 000 ląstelių, duomenys apdoroti naudojant programinę įrangą *FlowJo X*. Kuriant KČ MKL išskyrimo metodiką, analizę atliko j. m. d. Jaroslav Denkovskij (Valstybinio mokslinių tyrimų instituto Inovatyvios medicinos centras). Charakterizuojant KČ MKL ilgalaikio auginimo *in vitro* metu analizę atliko j. m. d. Jan Krasko (NVI).

3.6.6 Senėjimo tyrimas

- KČ MKL augintos flakonuose T25.
- MKL senėjimas tirtas, naudojant komercinį rinkinį *Senescence Cells Histochemical Staining Kit* pagal gamintojo rekomendacijas.
- Tyrimo metu ląstelės dažytos ir taip aptiktas β -galaktozidazės aktyvumas, būdingas senstančioms ląstelėms. Šis fermentas skaldo dažą X-gal ir ląstelių viduje aplink branduolį susiformuoja žalsvai mėlynos spalvos skilimo produktai.
- Augintos MKL populiacijos senėjimas įvertintas atsitiktine tvarka nufotografavus 10 auginimo indo vietų ir jose suskaičiavus bendrą ląstelių skaičių bei žalsvai mėlynai nusidažiusių ląstelių skaičių. Nusidažiusių ląstelių skaičius vėliau išreikštas procentais.
- Tyrimas atliktas VU GMF.

3.6.7 Kariotipo tyrimas chromosomų dažymo G metodu

1. KČ MKL augintos flakonuose T75.
2. Į mitybinę terpę įlašinta kolchicino tirpalo (galutinė koncentracija 0,2 $\mu\text{g/ml}$).

3. Flakonas laikytas inkubatoriuje 4 val. esant standartinėms aplinkos sąlygoms: 37 °C temperatūra, 95 % drėgmė, 5 % CO₂.
4. Mitybinė terpė pašalinta. Flakonai praplauti 0,9 % NaCl tirpalu. Fiziologinis tirpalas pašalintas.
5. Ant ląstelių užpilta 3 ml 0,25 % tripsino tirpalo ir flakonai laikyti 5 min. inkubatoriuje, kuriame buvo +37 °C temperatūra.
6. Tripsinas neutralizuotas 1,5 ml karščiu inaktyvintu FVS.
7. Visas turinys perpiltas į 15 ml kūginius mėgintuvėlius ir centrifuguota 5 min. esant 400 g.
8. Supernatantas pašalintas. Ląstelės praplautos fiziologiniu tirpalu.
9. Centrifuguota 5 min. esant 400 g. Supernatantas pašalintas.
10. Atlikta hipotonizacija: į mėgintuvėlį pilta 7 ml 0,55 % KCl tirpalo ir laikyta 20 min. inkubatoriuje, kuriame buvo +37 °C temperatūra.
11. Į mėgintuvėlį įpilta 1 ml fiksacijos tirpalo.
12. Centrifuguota 5 min. esant 400 g. Supernatantas pašalintas.
13. Atlikta pirmoji fiksacija: ant ląstelių pilta 5 ml atšaldyto fiksacijos tirpalo, ląstelės suspenduotos ir laikytos 1 val. šaldiklyje, kuriame buvo –20 °C temperatūra.
14. Centrifuguota 5 min. esant 500 g. Supernatantas pašalintas.
15. Fiksacija kartota, užfiksuotos ląstelės laikytos per naktį šaldiklyje, kuriame buvo –20 °C temperatūra.
16. Kitą rytą ląstelės fiksuotos dar kartą.
17. Po 1 val. centrifuguota 5 min. esant 500 g. Supernatantas pašalintas.
18. Užfiksuotos ląstelės suspenduotos likusiame tūryje ir išlašintos ant objektinių stikliukų.
19. Stikliukams išdžiūvus, preparatai sendinti: stikliukai laikyti kambario temperatūroje sausoje dėžėje 3 paras.
20. Stikliukai pamerkti į 0,025 % tripsino tirpalą 10–60 sek. (laikas kiekvieną kartą parinktas eksperimentiškai), praplauti distiliuotu vandeniu.

21. Stikliukai pamerkti į Giemsa dažus (skiesti fosfatinu buferiu santykiu 1:19) 10–60 sek. (laikas kiekvieną kartą parinktas eksperimentiškai), praplauti distiliuotu vandeniu.
22. Išdžiovinti stikliukai skenuotmi, rastos metafazės fotografuotos ir analizuotos automatizuota sistema *Leica CytoVision*.
23. Kariotipai apibūdinti pagal Tarptautinės žmogaus citogenetikos nomenklatūros sistemos (angl. *the International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) rekomendacijas¹⁰⁰.
24. Tyrimas atliktas VU GMF.

VDJA MKL ląstelės kariotipo tyrimui buvo paruoštos įmonėje *The Cell Factory* pagal analogišką protokolą, 15 ml tūrio mėgintuvėliuose sumaišytos su šaltu (–20 °C) fiksatoriaus tirpalu ir per 24 val. atsiųstos kariotipo tyrimui transportavimo dėžėje, kurioje buvo sauso ledo.

3.6.8 Genų raiškos tyrimas naudojant PGR gardeles

Visuminės RNR išskyrimas, gryninimas ir kokybės vertinimas (NVI):

1. Visuminė RNR iš žmogaus KČ MKL ir VDJA MKL išskirta ir išgryninta, naudojant komercinį rinkinį *miRNeasy Mini Kit* pagal gamintojo rekomendacijas. Išplovimo tūris 40 µl.
2. Išskirtos RNR kiekis ir kokybė įvertinti, naudojant spektrofotometrą *NanoDrop 2000c* ir bioanalizatorių *Agilent 2100* su plokštelėmis *RNA 6000 Nano LabChip* pagal gamintojų rekomendacijas.

Komplementarios DNR sintezė (NVI):

1. PGR gardelėms *Human Mesenchymal Stem Cell RT² Profiler™* ir *Human Cellular Senescence RT² Profiler™* reikalinga komplementari DNR (kDNR) buvo susintetinta, naudojant komercinį rinkinį *RT² First Strand Kit* pagal gamintojo rekomendacijas. Vienai gardelei (96

reakcijoms) panaudotas rekomenduotas 800 ng išgrynintos visuminės RNR kiekis.

2. PGR gardelėms *miRNome miScript miRNA* reikalinga kDNR susintetinta, naudojant komercinį rinkinį *miScript II RT Kit* pagal gamintojo rekomendacijas. 1 gardelei (96 reakcijos) panaudotas rekomenduotas 125 ng išgrynintos visuminės RNR kiekis.

Kiekybinės PGR, atliktos naudojant gardeles *RT² Profiler* (NVI):

1. kPGR atlikti gardelėse *RT² Profiler PCR Array Human Mesenchymal Stem Cells* ir *RT² Profiler PCR Array Human Cellular Senescence Cells* panaudotas rinkinys *2x RT² SYBR Green ROX FAST Mastermix*.
2. Mišiniai paruošti pagal gamintojo rekomendacijas ir supilstyti į gardeles (į kiekvieną šulinėlį po 20 µl).
3. kPGR atlikta termocikleryje *Rotor-Gene Q* pagal gamintojo sukurtą temperatūrinio režimo programą (1 lentelė).
4. Kiekvieno biologinio mėginio atlikta po 2 techninius pakartojimus.
5. Pirminių duomenų analizė atlikta naudojantis programa *RT² Profiler PCR Array Data Analysis v3.5 software* (Qiagen).
6. Pagausinimo kreivės sankirta su foninės fluorescencijos slenksčiu (dirbant su *Rotor-Gene Q* rekomenduojamas 0,02) apibrėžiama kaip pagausinimo ciklas (C_T), kuriuo remiantis apskaičiuota santykinė geno raiška.
7. Pagal *Qiagen* rekomendacijas genų raiškos pokyčiai vertinti naudojant $\Delta\Delta C_T$ metodą ir normalizuoti pagal 5 „namų ruošos“ (angl. *housekeeping*) genų (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1* ir *RPLP0*) raiškos geometrinį vidurkį.
8. Genų raiškos pokytis 2 ir daugiau kartų buvo vertinamas kaip padidėjusi ar sumažėjusi specifinio geno raiška.
9. Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai p reikšmė $< 0,05$.
10. PGR gardelių duomenys buvo įdėti į viešą duomenų bazę *Gene Expression Omnibus* (prieigos numeris GSE68933).

Kiekybinės PGR, atliktos naudojant gardeles *miScript miRNA* (NVI):

1. kPGR atlikti gardelėse *miScript miRNA PCR Array Human miRNome* panaudotas rinkinys *miScript SYBR Green PCR*.
2. Mišiniai paruošti pagal gamintojo rekomendacijas ir supilstyti į gardeles (į kiekvieną šulinėlį po 20 µl).
3. kPGR atliktos termocikleryje *Rotor-Gene Q* pagal gamintojo sukurtą temperatūrinio režimo programą (1 lentelė).
4. Kiekvieno biologinio mėginio atlikta po 2 techninius pakartojimus.
5. Pirminių duomenų analizė atlikta naudojantis programa *miScript miRNA PCR Array Data Analysis* (Qiagen).
6. Pagausinimo kreivės sankirta su foninės fluorescencijos slenksčiu (dirbant su *Rotor-Gene Q* rekomenduojamas 0,02) apibrėžiama kaip pagausinimo ciklas (C_T), kuriuo remiantis apskaičiuota santykinė geno raiška.
7. Pagal *Qiagen* rekomendacijas, miRNR raiškos pokyčiai buvo vertinti naudojant $\Delta\Delta C_T$ metodą ir normalizuoti pagal 6 mažųjų RNR (*SNORD61*, *SNORD68*, *SNORD72*, *SNORD95*, *SNORD96A* ir *RNU6-2*) raiškos geometrinį vidurkį.
8. miRNR raiškos pokytis 2 ir daugiau kartų buvo vertinamas kaip padidėjusi ar sumažėjusi specifinės miRNR raiška.
9. Skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai p reikšmė $< 0,05$.
10. PGR gardelių duomenys buvo įdėti į viešą duomenų bazę *Gene Expression Omnibus* (prieigos numeris GSE68933).

1 lentelė. Temperatūrinio režimo programos, taikytos tiriant genų raišką naudojant PGR gardeles

PGR gardelės	<i>RT² Profiler</i>			<i>miScript miRNA</i>		
	Trukmė	Temperatūra	Ciklų sk.	Trukmė	Temperatūra	Ciklų sk.
DNR polimerazės aktyvinimas	10 min.	95 °C	1	15 min.	95 °C	1
DNR grandžių atskyrimas	15 sek.	95 °C	40	15 sek.	94 °C	40
Pradmenų prisijungimas	30 sek.	60 °C		30 sek.	55 °C	
Pradmenų ilginimas				30 sek.	70 °C	

3.6.9 Funkcinė genų ontologijos analizė

Žmogaus MKL reikšmingai pakitusios raiškos funkcinė genų ontologijos analizė atlikta, panaudojus Genų ontologijos konsorciumo projektą (<http://geneontology.org/>)^{101,102} ir duomenų bazę bei klasifikacijos sistemą PANTHER (<http://pantherdb.org/>)¹⁰³. Analizės metu tiriamieji genai (jų produktai) buvo priskirti duomenų bazėje esantiems *Homo sapiens* genų ontologijos (GO) terminams. GO terminai grupuoti pagal tris kategorijas: molekulinės funkcijos (apibūdina geno koduojamo baltymo molekulinį aktyvumą biocheminiu lygmeniu), ląstelės komponentai (apibūdina vietą ląstelėje, kurioje geno produktas atlieka savo molekulinę funkciją) ir biologiniai procesai (apibūdina platesnį geno ląstelinį ar fiziologinį vaidmenį). Atliekant analizę naudoti rekomenduoti nustatymai: analizės tipas – *PANTHER Overrepresentation Test* (išleistas 2016 03 21), anotacijos versija – *GO Ontology database* (išleista 2015 08 06), atliekant statistinę analizę panaudota *Bonferroni* korekcija. Analizė atlikta VU GMF ir NVI.

3.6.10 Duomenų statistinė analizė

Duomenų statistinei analizei atlikti naudota SPSS programa (21 versija). Atliekant statistinę analizę gauti duomenys pateikti kaip aritmetinis vidurkis \pm standartinis nuokrypis. Skirtumų tikimybė tarp lyginamų grupių apskaičiuota pasitelkus *Mann-Whitney U* kriterijų (vertinant nepriklausomas imtis) ir *Student* porinį t–kriterijų (vertinant priklausomas imtis). Statistiniai skirtumai reikšmingais laikyti tie, kurių $p < 0,05$. Statistinė analizė atlikta VU GMF, NVI.

4. REZULTATAI

4.1 Mezenchiminių kamieninių ląstelių išskyrimo iš likutinės kaulų čiulpų medžiagos ir pagausinimo iki terapijai tinkamo kiekio metodikos sukūrimas

Šio tyrimo metu mezenchimines kamienines ląsteles (MKL) iš žmogaus kaulų čiulpų išskyrėme 2 metodais: centrifuguodami per fikolio gradientą (CFG) (4 donorų mėginiai po 60 ml) ir raudonųjų kraujo ląstelių lizės (RKLL) metodu (kitų 4 donorų mėginiai po 6 ml). Išskirtas MKL auginome T175 flakonuose su FVS turinčia terpe, kol ląstelės padengė ~100 % flakono dugno ploto. Tyrimo metu vertinome abiem metodais išskirtų ląstelių proliferacijos kinetiką, morfologiją ir imunofenotipą.

Laikas iki pirmojo monosluoksnio (0 pasažas, P0) susiformavimo. MKL, išskirtos iš 60 ml kaulų čiulpų tūrio CFG metodu, pirmąjį monosluoksnį suformavo po $13 \pm 2,16$ dienų, per kurias užaugo $(16,125 \pm 6,79) \cdot 10^6$ ląstelių. OMKL, išskirtos iš 6 ml kaulų čiulpų tūrio RKLL metodu, monosluoksnį suformavo po $11 \pm 3,3$ dienų, per kurias užaugo $(3,75 \pm 6,29) \cdot 10^6$ ląstelių. Skirtumai tarp šių grupių statistiškai nereikšmingi ($p = 0,7728$).

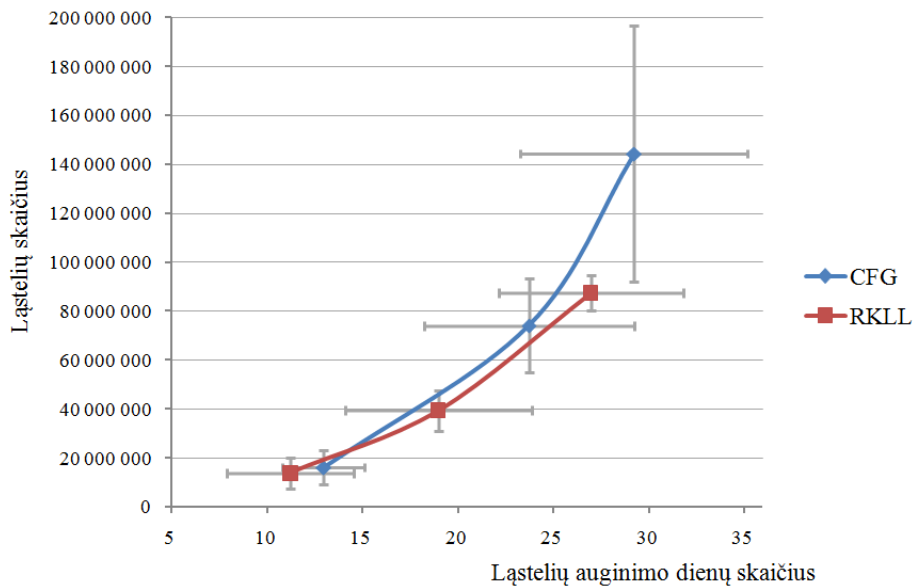
Bendras užaugintų ląstelių skaičius. CFG metodu išskirtų P1 MKL užaugo $(74,0 \pm 19,6) \cdot 10^6$ per $24 \pm 5,5$ dienas, o P2 užaugo $(144,23 \pm 52,41) \cdot 10^6$ per $29 \pm 5,97$ dienas. RKLL metodu išskirtų P1 MKL užaugo $(39,375 \pm 8,26) \cdot 10^6$ per $19 \pm 4,9$ dienų, o P2 užaugo $(87,375 \pm 7,36) \cdot 10^6$ per $27 \pm 4,83$ dienas. Skirtumai tarp CFG ir RLKK metodais išskirtų ir priaugintų MKL statistiškai nereikšmingi tiek P1 ($p = 0,1489$), tiek P2 ($p = 0,5637$) atveju. Skirtumai tarp CFG metodu išskirtų ir priaugintų P1 MKL ir RKLL metodu išskirtų ir priaugintų P2 MKL taip pat nereikšmingi ($p = 1$).

CFG ir RLKK metodais išskirtų MKL augimo kreivės pateiktos 15 pav.

Morfologijos analizė. Visos MKL buvo prisitvirtinusios prie flakonų dugno ir tipiškos verpstės formos (16 pav. B). Morfologijos skirtumų tarp skirtingais metodais išskirtų MKL ir tarp skirtingų pasažų MKL nenustatėme.

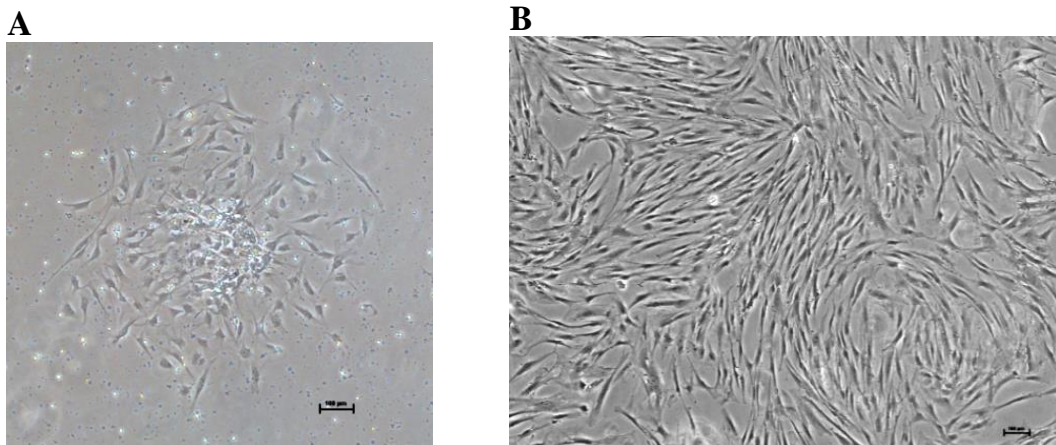
Pastebėjome, kad RKLL metodu išskirtos MKL kolonijos suformuoja anksčiau, kai kurios matomos jau kitą dieną po išskyrimo (16 pav. A).

Imunofenotipo analizė. Ištyrę abejais metodais išskirtų MKL paviršiaus žymenų raišką, nustatėme, kad dauguma (>95 %) P2 ląstelių buvo teigiamos pagal CD105, CD73, CD90 žymenis ir neigiamos pagal CD14, CD34, CD45 ir HLA-DR žymenis (šiuos ekspresavo <2 % populiacijos ląstelių).



15 pav. Žmogaus KČ MKL, išskirtų CFG ir RLKK metodais, kiekis, gautas auginant skirtingus pasažus (P0, P1, P2)

Pateikti rezultatai suvidurkinti, nurodytas standartinis nuokrypis. CFG – centrifugavimo per fikolio gradientą metodas, RKLL – raudonųjų kraujo ląstelių lizės metodas



16 pav. Žmogaus KČ MKL, išskirtų raudonųjų kraujo ląstelių lizės metodu, morfologija

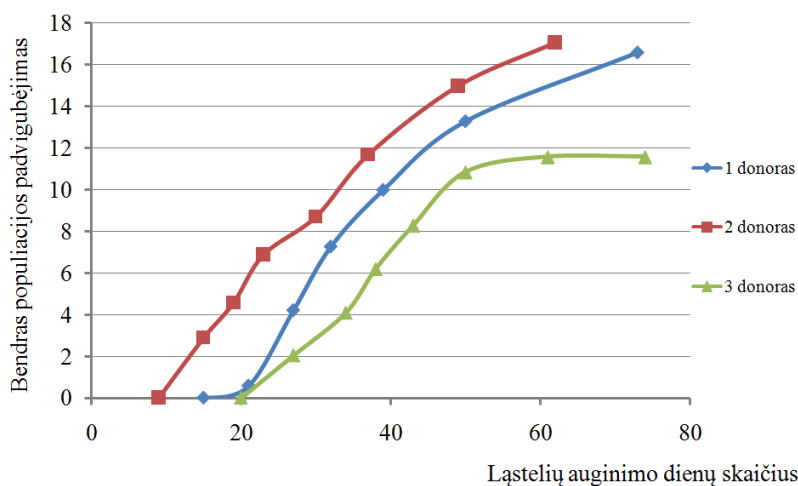
A – MKL kolonija, susiformavusi kitą dieną po išskyrimo. **B** – tipiškos verpstės formos MKL kultūra praėjus 11 dienų nuo išskyrimo. Pradinis padidinimas 100x, skalė 100 µm

4.2 Ilgalaikio auginimo *in vitro* įtakos MKL savybėms tyrimas

Siekdami ištirti ilgalaikio auginimo įtaką MKL savybėms, ląstelių išskyrimo metodikos kūrimo etape (4.1 skyrius) užšaldytas P1 KČ MKL ($n = 3$) atšildėme, gausinome *in vitro*, kol užaugo ankstyvieji 3–4 pasažai ir vėlyvieji 6–7 pasažai. MKL persėjome, kai ląstelės padengdavo ~80 % flakono dugno ploto. Kiekvieno užaugusio pasažo tyrėme morfologiją ir proliferacijos greitį. 3–4 ir 6–7 užaugusius pasažus papildomai tyrėme, analizuodami imunofenotipą, senėjimą būklę, kariotipą, genų ir miRNR raišką.

4.2.1 Proliferacijos greičio analizė

KČ MKL ($n = 3$) gausinome *in vitro* $69,67 \pm 6,66$ dienas. Kiekviename susiformavusiame pasaže nustatėme ląstelių skaičių. MKL proliferacijos greitį ilgalaikio auginimo metu įvertinome skaičiuodami bendrą populiacijos padvigubėjimą (BPP). Ląstelių augimo kreivėse galima išskirti 3 stadijas. Po išskyrimo RKLL metodu MKL augo lėčiau ir P1 užaugo per 21 ± 6 dieną. P1–P3–P4 KČ MKL augo greičiau ir po papildomų $14 \pm 2,65$ dienų BPP buvo $8,08 \pm 0,74$. Vėlesnieji pasažai augo vėl lėčiau ir po kitų $34,67 \pm 5,51$ dienų P6–P7 BPP buvo $15,08 \pm 3,04$ (17 pav.).

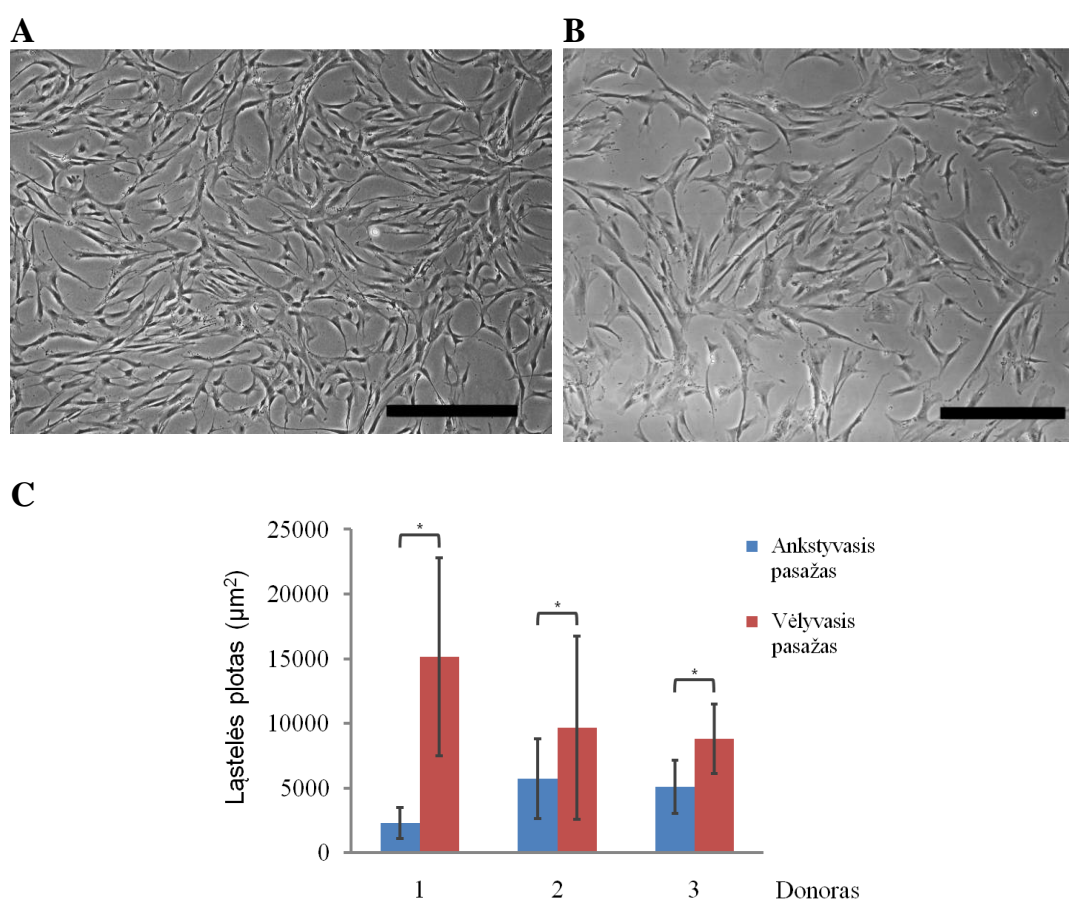


17 pav. Žmogaus KČ MKL augimo greitis ilgalaikio auginimo *in vitro* metu

Y ašyje – bendras populiacijos padvigubėjimas, X ašyje – ląstelių augimo *in vitro* dienų skaičius. Simboliai rodo atitinkamų donorų KČ MKL persėjimo laiką

4.2.2 Morfologijos analizė

KČ MKL ($n = 3$) morfologiją stebėjome naudodami invertuotą mikroskopą kiekvieno pasažo augimo metu. Nustatėme, kad P3–P4 MKL morfologija išliko nepakitusi: dauguma ląstelių buvo tipiškos verpstės arba fibroblastoidinės formos ir jų dydis nepasikeitęs (18 pav. A), palyginti su P0 ląstelių forma ir dydžiu (16 pav. B). Vėlesniuose pasažuose palaiptai daugėjo padidėjusių, suplokštėjusių ir netaisyklingos formos ląstelių, kurių ypač gausiai nustatėme P6–P7 (18 pav. B). Atlikę ląstelių užimamo ploto analizę, parodėme, kad vėlyvųjų pasažų ląstelės užima statistiškai reikšmingai didesnę paviršiaus plotą (18 pav. C).



18 pav. Žmogaus KČ MKL morfologija ilgalaikio auginimo *in vitro* metu
A – tipiškos verpstės arba fibroblastoidinės formos ankstyvojo (4) pasažo MKL. B – padidėjusios ir netaisyklingos formos vėlyvojo (7) pasažo MKL. Pradinis padidinimas 40x, mastelis 500 μm . C – vidutinis ląstelių užimamas plotas ankstyvųjų (P3–P4) ir vėlyvųjų (P6–P7) pasažų metu (* $p < 0,05$)

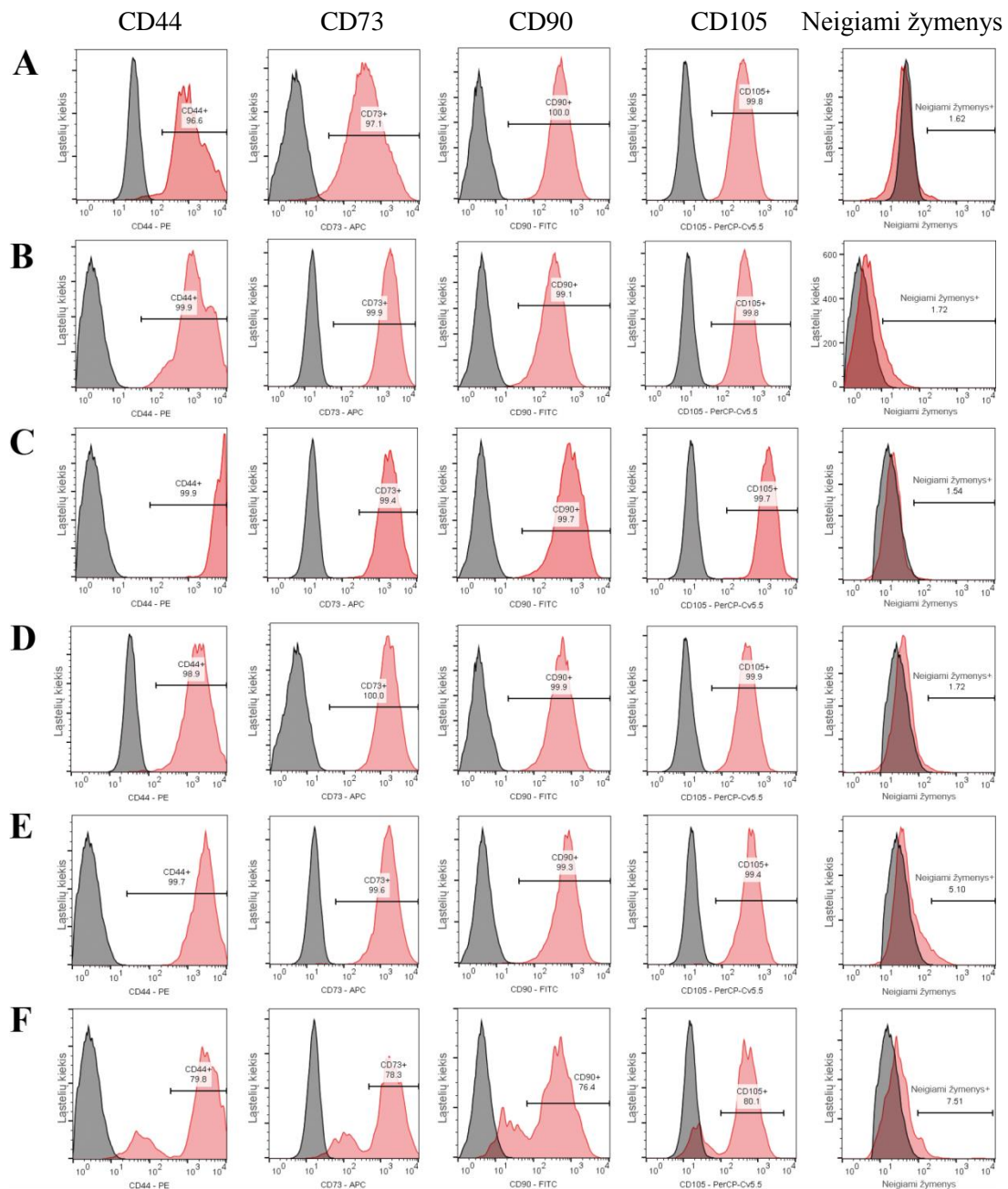
4.2.3 Imunofenotipo analizė

Tyrėme P3–P4 ir P6–P7 KČ MKL (n=3) standartinių paviršiaus žymenų raišką. Daugiau nei 99 % ankstyvųjų pasažų ląstelių buvo teigiamos pagal žymenis CD73, CD90 ir CD105 ir mažiau nei 2 % ląstelių buvo neigiamos pagal žymenis CD11b, CD19, CD34, CD45 bei HLA-DR (19 pav. A–C). Dalis 3 mėginio P7 MKL populiacijos prarado teigiamų žymenų raišką bei dalis populiacijos ėmė ekspresuoti neigiamus žymenis (19 pav. F, 20 pav.). Neigiamų žymenų raiška padidėjo iki 5,10 % antro mėginio P7 populiacijoje, o teigiamų žymenų raiška nepakito (19 pav. E). Pirmo mėginio MKL paviršiaus žymenų raiška išliko stabili viso auginimo *in vitro* metu (19 pav. D).

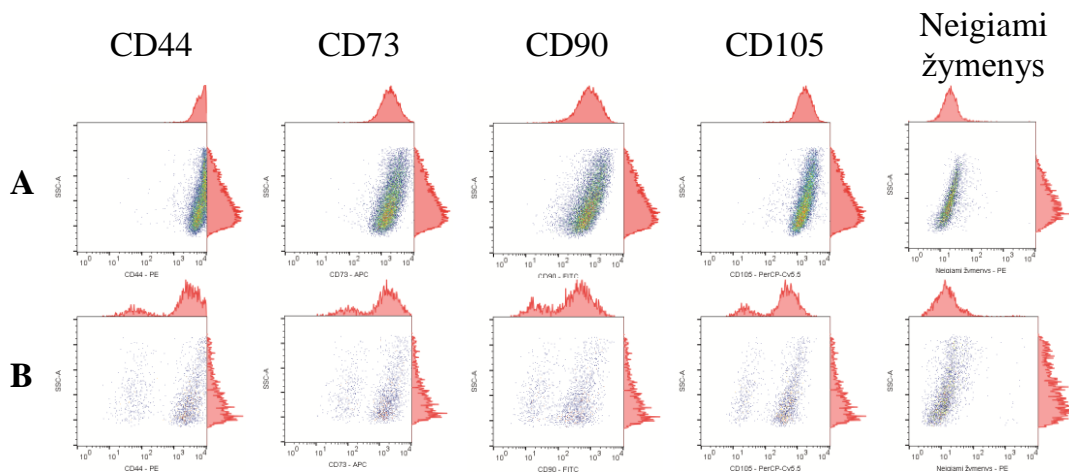
Ankstyvųjų pasažų MKL (n=3) gyvybingumas buvo $94,02 \pm 2,92$ %, o vėlyvųjų pasažų – $93,47 \pm 5,61$ %. Ankstyvųjų pasažų ląstelių šoninė sklaida (angl. *the side-scatter*) buvo $337 \pm 55,44$ vienetai, o vėlyvųjų pasažų – $391,67 \pm 27,00$ vienetas, tačiau šoninės sklaidos skirtumas tarp šių grupių statistiškai nebuvo reikšmingas ($p = 0,085$).

4.2.4 Senėjimo analizė

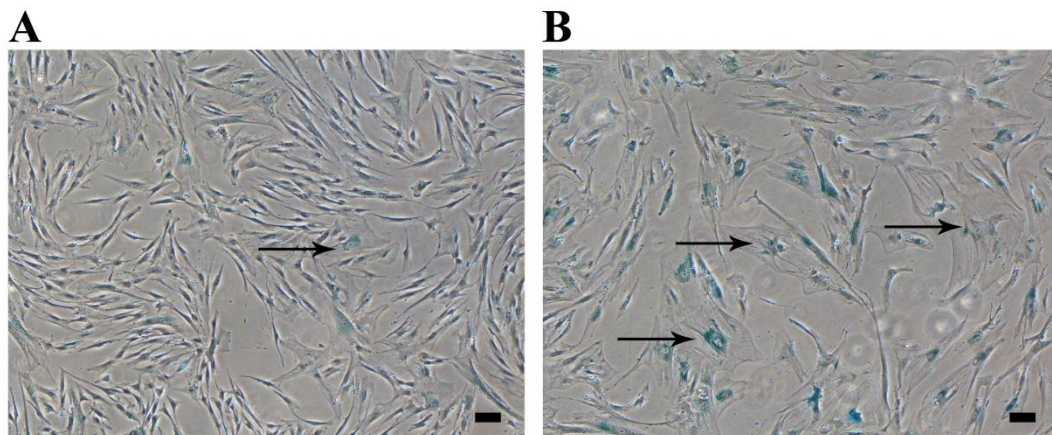
P3–P4 ir P6–P7 KČ MKL (n=3) senėjimą tyrėme naudodami komercinį ląstelių dažymo rinkinį. Įsitikinome, kad padidėjusios „kepto kiaušinio“ formos ląstelės (18 pav. B) iš tikrųjų yra senstančios – būtent tokios morfologijos ląstelės nusidažė šio tyrimo metu. Apskaičiavome, kad ankstyvuosiuose pasažuose senstančios ląstelės sudarė tik $1,59 \pm 0,94$ % populiacijų (21 pav. A), o vėlyvuosiuose pasažuose senstančių ląstelių dalis reikšmingai ($p = 0,004$) padidėjo iki $41,97 \pm 4,57$ % (21 pav. B).



19 pav. Ankstyvųjų ir vėlyvųjų pasažų žmogaus KČ MKL imunofenotipas
A – 1 donoro 3 pasažo MKL imunofenotipas. **B** – 2 donoro 4 pasažo MKL imunofenotipas. **C** – 3 donoro 4 pasažo MKL imunofenotipas. **D** – 1 donoro 6 pasažo MKL imunofenotipas. **E** – 2 donoro 7 pasažo MKL imunofenotipas. **F** – 3 donoro 7 pasažo MKL imunofenotipas. Histogramos kairėje (pilkos spalvos) rodo izotipo kontroles, histogramos dešinėje (raudonos spalvos) – dažytas ląsteles. Neigiami žymenys: CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR



20 pav. 3 donoro ankstyvojo ir vėlyvojo pasažų KČ MKL imunofenotipas
A – ankstyvojo 4 pasažo MKL imunofenotipas. **B** – vėlyvojo 7 pasažo MKL imunofenotipas.
 Y ašyje – šoninė sklaida. X ašyje – signalo intensyvumas. Neigiami žymenys: CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR



21 pav. Ankstyvųjų ir vėlyvųjų pasažų žmogaus KČ MKL senėjimas
 Ankstyvojo (3) pasažo (**A**) ir vėlyvojo (6) pasažo (**B**) padidėjusios, pakitusios morfologijos, dėl β-galaktozidazės aktyvumo žalsvai mėlynai nusidažiusios ląstelės (nurodytos juodomis rodyklėmis) praėjus 5 dienoms po pasėjimo. Pradinis padidinimas 40x, mastelis 100 μm

4.2.5 Kariotipo stabilumo analizė

Siekdami įvertinti ilgalaikio auginimo įtaką KČ MKL genomo stabilumui, ankstyvųjų ir vėlyvųjų pasažų ląstelių kariotipą (n=3) tyrėme G metodu. Kiekvieno pasažo ištyrėme 7–17 analizei tinkamas kokybės metafazių (2 lentelė). Maždaug 87 % P3–P4 ląstelių ir maždaug 88 % P6–P7 ląstelių turėjo normalų diploidinį kariotipą (2n = 46). Jokių chromosomų skaičiaus ar struktūros kloninių pokyčių (tokių kaip delecijos, inversijos, translokacijos ar

žiedinės chromosomos) neaptikome (22 A pav.). Ankstyvuosiuose pasažuose aptikome atsitiktinių aneuploidijų 45, XX, -10; 47, XX, +15; 47, XX, +22 (pirmas mėginys); 44, XY, -20, -21 (22 B pav.); 45, XY, -22 (antras mėginys) ir 47, XX, +22 (trečias mėginys). Vėlyvuosiuose pasažuose aptikome aneuploidijų 44, XX, -X, -20 (pirmas mėginys) ir 45, XY, -20 (antras mėginys). Trečio mėginio vėlyvojo pasažo kariotipo analizės atlikti negalėjome, nes ląstelių augimas buvo visiškai sustojęs (17 pav.).

2 lentelė. Ankstyvųjų ir vėlyvųjų pasažų žmogaus KČ MKL kariotipo tyrimo rezultatai

Mėginys	1		2		3	
	P3	P6	P4	P7	P4	P7
Metafazių, turinčių normalų diploidinį kariotipą, skaičius	14	6	14	9	10	-
Metafazių, turinčių chromosomų aberacijų, skaičius	3	1	2	1	1	-
Iš viso tirtų metafazių skaičius	17	7	16	10	11	-

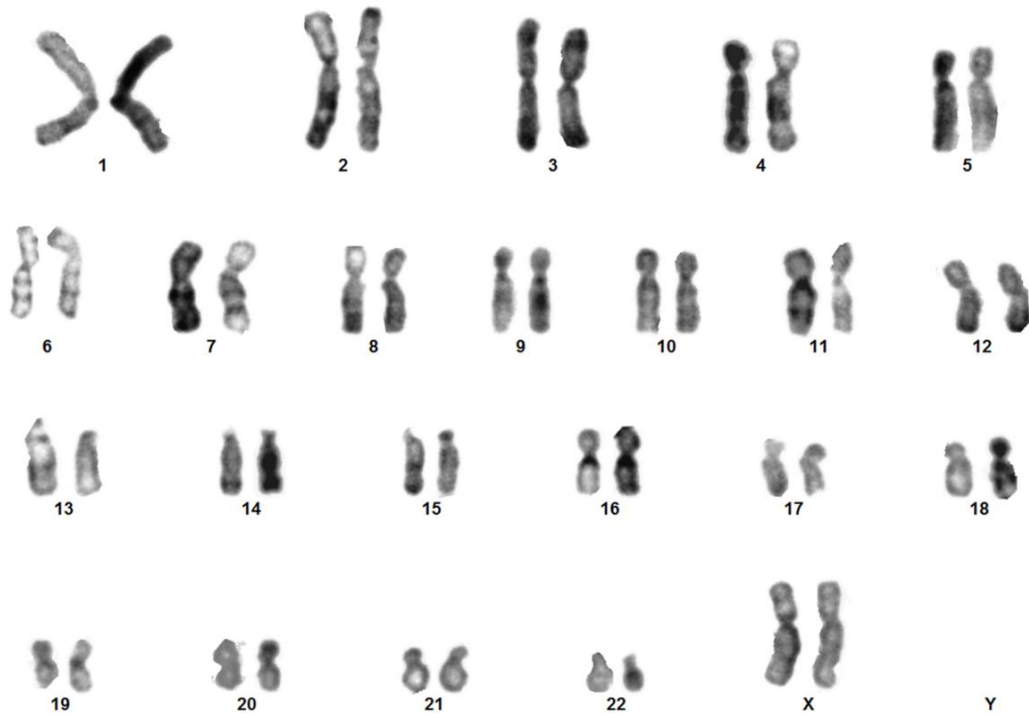
4.2.6 Genų raiškos analizė

Visuminės RNR išskyrimas ir kokybės vertinimas. Iš ankstyvųjų ir vėlyvųjų pasažų KČ MKL ($n = 3$) išskirtos visuminės RNR kiekis ir kokybė nurodyti 3 lentelėje. Šie rodikliai atitiko PGR gardelių gamintojo keliamus reikalavimus: matuojant spektrofotometru, esant 260 nm ir 280 nm bangos ilgiams, sugerties reikšmių santykis ($A_{260/280}$) turi būti 1,8–2,0. RNR vientisumo skaičius (angl. *RNA Integrity Number*, *RIN*) turi būti ≥ 7 .

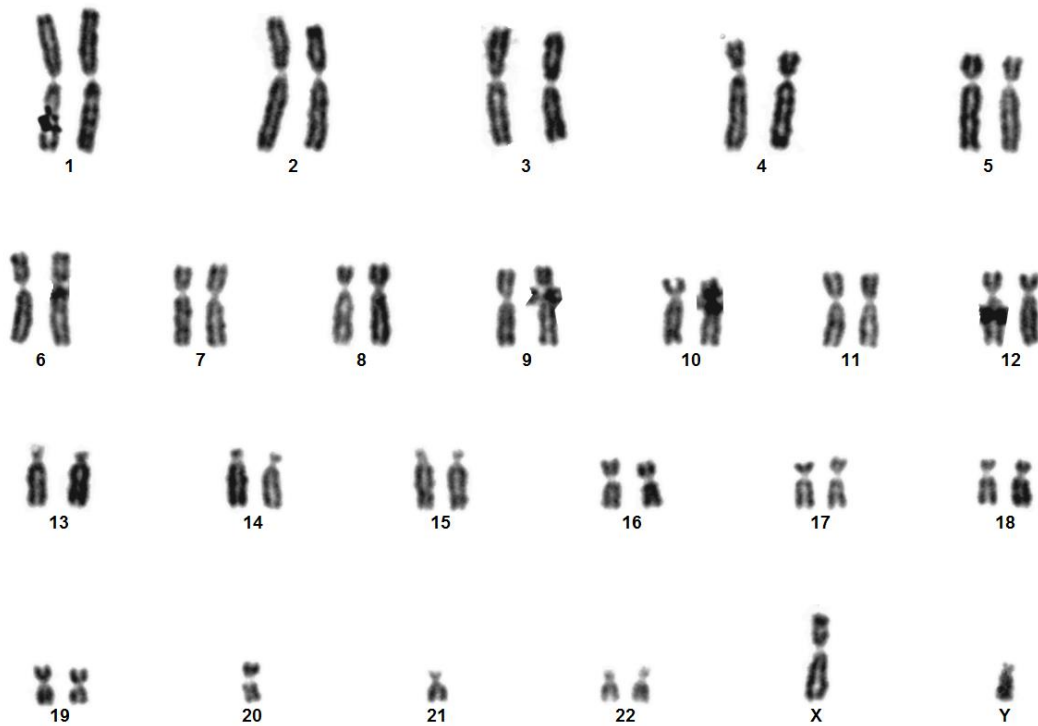
3 lentelė. Iš KČ MKL išskirtos visuminės RNR kiekio ir kokybės įvertinimo rezultatai

Mėginys, pasažas	RNR koncentracija		RNR kokybė	
	<i>NanoDrop</i>	<i>Agilent Bioanalyzer</i>	<i>NanoDrop</i>	<i>Agilent Bioanalyzer</i>
1, P3	240,0 ng/ μ l	406 ng/ μ l	260/280 = 2,03	RIN = 8,8
1, P6	261,8 ng/ μ l	330 ng/ μ l	260/280 = 2,02	RIN = 10
2, P4	310,0 ng/ μ l	363 ng/ μ l	260/280 = 2,01	RIN = 10
2, P7	298,4 ng/ μ l	345 ng/ μ l	260/280 = 2,04	RIN = 10
3, P4	386,8 ng/ μ l	430 ng/ μ l	260/280 = 2,00	RIN = 9,7
3, P7	276,2 ng/ μ l	301 ng/ μ l	260/280 = 2,03	RIN = 9,3

A



B



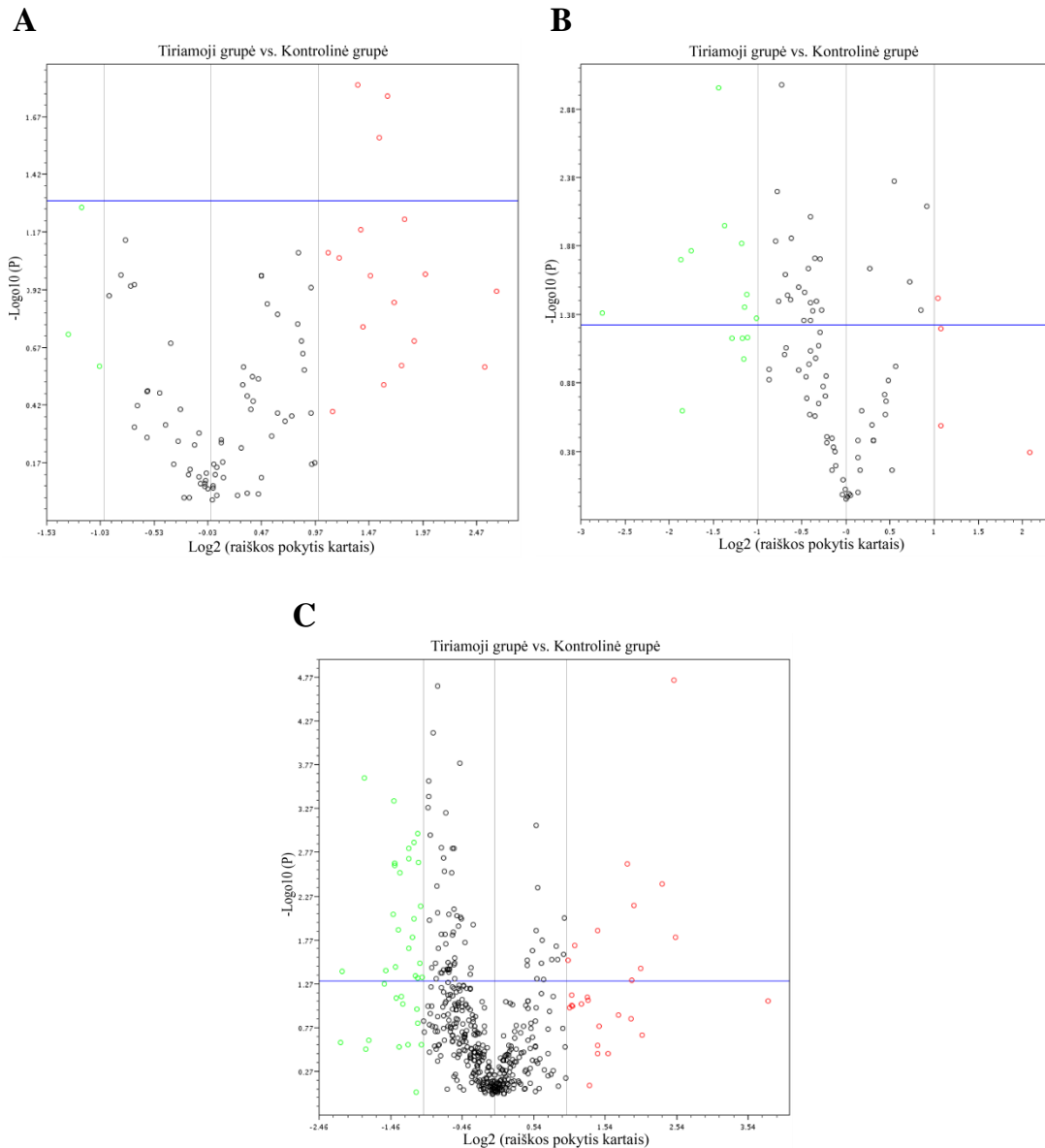
22 pav. Ilgalaikio auginimo įtaka žmogaus KČ MKL kariotipo stabilumui

A – pavyzdinė normalaus diploidinio kariotipo ($2n = 46, XX$) kariograma. Tiek ankstyvųjų (3, 4), tiek vėlyvųjų pasažų (6, 7) MKL kariotipas buvo normalus. B – 4 pasažo ląstelėje nustatytos atsitiktinės aneuploidijos 44, XY, -20, -21 kariograma. Pradinis padidėjimas 1000x

PGR gardelių kontrolių įvertinimas. Visų gardelių *RT² ProfilerTM PCR Array Human Mesenchymal Stem Cells*, *RT² ProfilerTM PCR Array Human Cellular Senescence* ir *miScript miRNA PCR Array Human miRNome* C_T įverčiai neperžengė rekomenduojamų normų ribų. Kiekvienos PGR gardelės teigiamos PGR kontrolės vid. $C_T = 14 \pm 2$ (gardelių *RT² ProfilerTM*) arba 15 ± 2 (gardelių *miScript miRNA*), atvirkštinės transkripcijos kontrolės $\Delta C_T = \text{vid.}C_T^{\text{RTC}} - \text{vid.}C_T^{\text{PPC}} < 5$ (gardelių *RT² ProfilerTM*) arba < 7 (gardelių *miScript miRNA*), genominės DNR kontrolės $C_T > 33$ (gardelių *RT² ProfilerTM*).

Genų raiškos tyrimas, panaudojant PGR gardeles. Siekdami išsamiau įvertinti KČ MKL, tyrėme 162 skirtingų genų, susijusių su kamieniškumu ir ląstelės senėjimu, raišką, panaudodami komercines kiekybinės PGR gardeles. Ankstyvųjų pasažų MKL iš viso aptikome 154 genų raišką ($C_T < 33$), o vėlyvųjų pasažų MKL – 156 genų raišką. Palyginę vėlyvojo pasažo MKL genų raišką su ankstyvojo pasažo MKL genų raiška (kontrolė), nustatėme, kad iš tirtų skirtingų 162 genų reikšmingai ($P < 0,05$) padidėjo ≥ 2 kartus 4 genų raiška, o reikšmingai ($P < 0,05$) sumažėjo ≥ 2 kartus 9 genų raiška (23 pav. A, B, 4 lentelė). Tai sudaro 8,02 % visų tirtų genų.

Ankstyvųjų ir vėlyvųjų pasažų MKL miRNR raišką tyrėme taip pat naudodami komercines kiekybinės PGR gardeles. Ankstyvųjų pasažų MKL iš viso aptikome 358 miRNR raišką ($C_T < 33$), o vėlyvųjų pasažų MKL – 365 miRNR raišką. Palyginę vėlyvojo pasažo MKL miRNR raišką su ankstyvojo pasažo MKL miRNR raiška (kontrolė), nustatėme, kad iš 420 tirtų miRNR reikšmingai ($p < 0,05$) padidėjo ≥ 2 kartus 10 miRNR raiška, o reikšmingai ($p < 0,05$) sumažėjo ≥ 2 kartus 23 miRNR raiška (23 pav. C, 4 lentelė). Tai sudaro 7,86 % visų tirtų miRNR.



23 pav. Žmogaus KČ MKL genų ir miRNR raiškos pokyčiai ilgalaikio auginimo *in vitro* metu

Diagramose pavaizduoti kamieniškumo genų (A), senėjimo genų (B) ir miRNR (C) raiškos pokyčiai vėlyvųjų pasažų MKL (tiriamoji grupė), palyginti su genų raiška ankstyvųjų pasažų MKL (kontrolinė grupė). Raudonos spalvos taškai rodo genus, kurių raiška padidėjo ≥ 2 kartus. Žalios spalvos taškai rodo genus, kurių raiška sumažėjo ≥ 2 kartus. Vertikalios šoninės pilkos spalvos linijos rodo raiškos pokyčio kartais (angl. *fold change*) ribą (≥ 2 kartai), o horizontali mėlynos spalvos linija – p reikšmės ribą ($p < 0,05$). Genai ir miRNR, kurių raiškos pokyčiai ir p reikšmės atitiko šias ribas, nurodyti 4 lentelėje

4 lentelė. Genai ir miRNR, kurių raiška reikšmingai pakito vėlyvųjų pasažų žmogaus KČ MKL, palyginti su ankstyvųjų pasažų žmogaus KČ MKL

Genas/miRNR	Raiškos pokytis kartais*	<i>p</i>	miRNR	Raiškos pokytis kartais*	<i>p</i>
ACTA2	3,12	0,018	<i>hsa-miR-7-5p</i>	-4,41	0,039
POU5F1	2,96	0,027	<i>hsa-miR-29b-1-5p</i>	-3,55	0,000
PTPRC	2,58	0,016	<i>hsa-miR-15b-3p</i>	-2,88	0,038
THBS1	2,06	0,032	<i>hsa-miR-576-5p</i>	-2,68	0,009
PCNA	-6,77	0,041	<i>hsa-miR-660-5p</i>	-2,67	0,000
E2F1	-3,66	0,067	<i>hsa-miR-25-5p</i>	-2,64	0,002
CDC25C	-3,36	0,014	<i>hsa-miR-29a-5p</i>	-2,64	0,002
TBX3	-2,72	0,001	<i>hsa-miR-224-5p</i>	-2,62	0,035
TBX2	-2,59	0,010	<i>hsa-miR-875-3p</i>	-2,55	0,013
PLAU	-2,27	0,013	<i>hsa-miR-188-3p</i>	-2,52	0,003
CHEK1	-2,22	0,037	<i>hsa-miR-455-5p</i>	-2,31	0,021
CCNB1	-2,17	0,030	<i>hsa-miR-139-5p</i>	-2,31	0,002
E2F3	-2,02	0,045	<i>hsa-miR-106b-3p</i>	-2,30	0,002
<i>hsa-miR-422a</i>	5,74	0,016	<i>hsa-miR-337-3p</i>	-2,23	0,016
<i>hsa-miR-376b-3p</i>	5,66	0,000	<i>hsa-miR-877-5p</i>	-2,19	0,010
<i>hsa-miR-200a-5p</i>	5,06	0,004	<i>hsa-miR-92a-1-5p</i>	-2,19	0,001
<i>hsa-miR-219a-2-3p</i>	4,10	0,036	<i>hsa-miR-218-5p</i>	-2,16	0,044
<i>hsa-miR-639</i>	3,86	0,007	<i>hsa-miR-130b-5p</i>	-2,12	0,046
<i>hsa-miR-223-3p</i>	3,76	0,049	<i>hsa-miR-192-5p</i>	-2,11	0,001
<i>hsa-miR-608</i>	3,60	0,002	<i>hsa-miR-187-3p</i>	-2,10	0,002
<i>hsa-miR-429</i>	2,70	0,013	<i>hsa-miR-200a-3p</i>	-2,07	0,032
<i>hsa-miR-210-3p</i>	2,17	0,020	<i>hsa-miR-193a-3p</i>	-2,05	0,007
<i>hsa-miR-335-5p</i>	2,03	0,029	<i>hsa-miR-935</i>	-2,02	0,045

*Raiškos pokytis kartais išreikštas kaip *FG* (angl. *fold regulation*), kuris biologiniu požiūriu prasmingiau atspindi raiškos pokytį kartais *FC* (angl. *fold change*). *FC* >1 rodo raiškos padidėjimą ir yra lygus *FG*. *FC* <1 rodo raiškos sumažėjimą ir *FG* yra atvirkščiai neigiamas *FC* (t.y. *FG* apskaičiuojamas pagal formulę $1/FC$)

Funkcinė genų ontologijos analizė. Norėdami geriau suprasti vėlyvojo pasažo ląstelėse vykstančius procesus, atlikome 13 genų, kurių raiška pakito reikšmingai, funkcinę ontologijos analizę. Genų ontologija (GO) apibrėžia sąvokas/klases, naudojamas apibūdinant genų funkcijas bei ryšius tarp šių sąvokų. GO klasifikuoja genų funkcijas pagal tris aspektus: biologinius procesus, ląstelinę funkciją bei molekulinę funkciją. Tiriant biologines funkcijas, genai buvo reikšmingai ($p < 0,05$) priskirti 36 skirtingiems GO terminams (5 lentelė). 75 % GO terminų susiję su metabolizmu, ląstelės ciklu bei atsaku į dirgiklį/stresą (24 pav.). Tiriant genų koduojamų produktų ląstelinę funkciją, 4 iš 13 genų buvo reikšmingai ($p < 0,05$) priskirti GO terminui, susijusiam su transkripcijos reguliacija. Molekulinių funkcijų analizės metu 6 iš 13 genų buvo reikšmingai ($p < 0,05$) priskirti GO terminui, susijusiam su sąveika su fermentais proteino kinazėmis (5 lentelė).

5 lentelė. Vėlyvųjų pasažų KČ MKL, palyginti su ankstyvųjų pasažų KČ MKL, reikšmingai ($p < 0,05$) ≥ 2 kartus pakitusios raiškos 13 genų funkcinė ontologijos analizė

GO ¹ kategorija	Biologinis procesas	Genų sk. duomenų bazėje ²	Atitikusių genų sk. ³	Atitikę genai	p^4
GO:0019222	Metabolinio proceso reguliacija	6588	13	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, CDC25C, TBX2, PLAU, E2F3, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, E2F1, ACTA2</i>	2,49E-03
GO:0050896	Atsakas į dirgiklį	7621	13	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, CDC25C, TBX2, PLAU, E2F3, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, E2F1, ACTA2</i>	1,65E-02
GO:0060255	Makromolekulių metabolinio proceso reguliacija	5607	12	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, CDC25C, TBX2, E2F3, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, E2F1, ACTA2</i>	1,11E-02
GO:0051716	Ląstelės atsakas į dirgiklį	6227	12	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, CDC25C, TBX2, PLAU, E2F3, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, E2F1</i>	3,76E-02
GO:0048518	Biologinių procesų teigiama reguliacija	5302	12	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, TBX2, PLAU, E2F3, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, E2F1, ACTA2</i>	5,77E-03
GO:0031323	Ląstelės metabolinio proceso reguliacija	5814	12	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, CDC25C, TBX2, PLAU, E2F3, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, E2F1</i>	1,69E-02
GO:0006950	Atsakas į stresą	3648	11	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, TBX2, PLAU, E2F3, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, E2F1</i>	2,05E-03
GO:0009893	Metabolinio proceso teigiama reguliacija	3529	11	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, PLAU, E2F3, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, E2F1, ACTA2</i>	1,44E-03
GO:0048522	Ląstelės proceso teigiama reguliacija	4586	11	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, TBX2, PLAU, E2F3, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, E2F1</i>	2,30E-02
GO:0031325	Ląstelės metabolinio proceso teigiama reguliacija	2904	10	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, PLAU, E2F3, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, E2F1</i>	4,14E-03
GO:0009059	Makromolekulių biosintezės procesas	3651	10	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, CDC25C, TBX2, E2F3, THBS1, POU5F1, TBX3, E2F1</i>	3,65E-02
GO:0010604	Makromolekulių metabolinio proceso teigiama reguliacija	2741	10	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, E2F3, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, E2F1, ACTA2</i>	2,38E-03
GO:0033554	Ląstelės atsakas į stresą	1718	9	<i>PCNA, CHEK1, TBX2, PLAU, E2F3, THBS1, CCNB1, TBX3, E2F1</i>	7,26E-04
GO:0009888	Audinių vystymasis	1601	9	<i>PCNA, PTPRC, TBX2, PLAU, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, ACTA2</i>	3,93E-04
GO:0048513	Organų vystymasis	2784	9	<i>PCNA, PTPRC, TBX2, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, E2F1, ACTA2</i>	4,57E-02

tęsinys

GO¹ kategorija	Biologinis procesas	Genų sk. duomenų bazėje²	Atitikusių genų sk.³	Atitikę genai	p⁴
GO:0051173	Azoto junginių metabolinio proceso teigiama reguliacija	1726	9	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, E2F3, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, E2F1</i>	7,56E-04
GO:0042127	Ląstelės proliferacijos reguliacija	1475	9	<i>CHEK1, PTPRC, TBX2, PLAU, E2F3, THBS1, CCNB1, TBX3, E2F1</i>	1,93E-04
GO:0072359	Cirkuliacinės sistemos vystymasis	779	8	<i>PCNA, TBX2, PLAU, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, ACTA2</i>	3,25E-05
GO:0072358	Širdies ir kraujagyslių sistemos vystymasis	779	8	<i>PCNA, TBX2, PLAU, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, ACTA2</i>	3,25E-05
GO:0007049	Ląstelės ciklas	1322	8	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, CDC25C, E2F3, THBS1, CCNB1, E2F1</i>	1,98E-03
GO:0010628	Genų raiškos teigiama reguliacija	1664	8	<i>CHEK1, E2F3, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3, E2F1, ACTA2</i>	1,16E-02
GO:0045935	Nukleobazių turinčių junginių metabolizmo procesas teigiama reguliacija	1649	8	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, E2F3, CCNB1, POU5F1, TBX3, E2F1</i>	1,08E-02
GO:0051726	Ląstelės ciklo reguliacija	946	7	<i>CHEK1, PTPRC, CDC25C, THBS1, CCNB1, TBX3, E2F1</i>	4,19E-03
GO:0009628	Atsakas į abiotinį dirgiklį	1119	7	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, PLAU, THBS1, CCNB1, E2F1</i>	1,30E-02
GO:0008284	Ląstelės proliferacijos teigiama reguliacija	813	7	<i>PTPRC, TBX2, PLAU, E2F3, CCNB1, TBX3, E2F1</i>	1,50E-03
GO:0022402	Ląstelės ciklo procesas	1068	7	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, E2F1, CDC25C, THBS1, CCNB1,</i>	9,49E-03
GO:0044770	Ląstelės ciklo fazės perėjimas	311	6	<i>PCNA, CHEK1, PTPRC, CDC25C, CCNB1, E2F1</i>	1,36E-04
GO:0000278	Mitozinis ląstelės ciklas	791	6	<i>PCNA, CHEK1, CDC25C, E2F3, CCNB1, E2F1</i>	3,19E-02
GO:0007507	Širdies vystymasis	441	6	<i>PCNA, TBX2, THBS1, CCNB1, POU5F1, TBX3</i>	1,06E-03
GO:0044772	Ląstelės ciklo mitozės fazės perėjimas	307	5	<i>PCNA, CHEK1, CDC25C, CCNB1, E2F1</i>	6,33E-03
GO:0001568	Kraujagyslių vystymasis	446	5	<i>TBX2, PLAU, THBS1, TBX3, ACTA2</i>	3,92E-02
GO:0035051	Kardiomiocitų diferenciacija	101	4	<i>TBX2, CCNB1, POU5F1, TBX3</i>	2,98E-03
GO:0003151	Išstumiamojo trakto morfogenezė	57	3	<i>TBX2, THBS1, TBX3</i>	4,47E-02
GO:0051319	G2 fazė	5	2	<i>E2F3, E2F1</i>	3,49E-02
GO:0000085	G2-mitozės fazė	3	2	<i>E2F3, E2F1</i>	1,26E-02
GO:0060596	Krūties liaukos formavimasis	3	2	<i>TBX2, TBX3</i>	1,26E-02

tęsinys

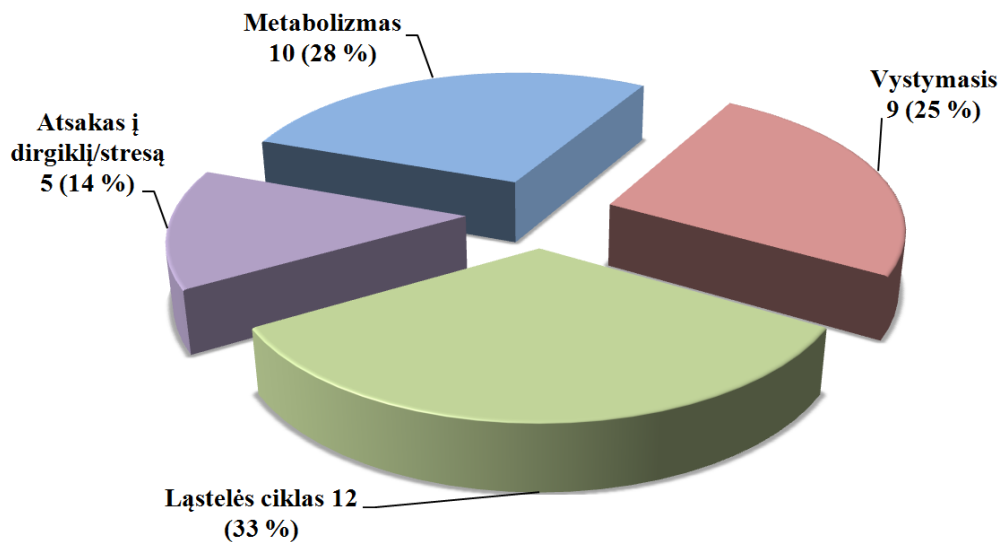
GO ¹ kategorija	Ląstelinė funkcija	Genų sk. duomenų bazėje ²	Atitikusių genų sk. ³	Atitikę genai	p ⁴
GO:0005667	Transkripcijos veiksnių kompleksas	291	4	<i>E2F1, E2F3, TBX2, POU5F1</i>	2,93E-02
GO ¹ kategorija	Molekulinė funkcija	Genų sk. duomenų bazėje ²	Atitikusių genų sk. ³	Atitikę genai	p ⁴
GO:0019899	Sąveikaujantis su fermentu	1604	7	<i>PCNA, PTPRC, CDC25C, CCNB1, E2F1, POU5F1, ACTA2</i>	4,47E-02
GO:0019900	Sąveikaujantis su kinaze	568	6	<i>PCNA, PTPRC, CDC25C, CCNB1, E2F1, ACTA2</i>	1,47E-03
GO:0019901	Sąveikaujantis su proteino kinaze	504	6	<i>PCNA, PTPRC, CDC25C, CCNB1, E2F1, ACTA2</i>	7,31E-04

¹ GO – Genų ontologija.

² Genų, priskirtų konkrečiai GO kategorijai, skaičius duomenų bazėje. Iš viso 2016 03 25 PANTHER duomenų bazėje žmogaus genomą sudarė 20814 genai.

³ Tiriamųjų genų skaičius, atitikęs esančius duomenų bazėje konkrečioje GO kategorijoje. Iš viso tirtas 13 genų rinkinys.

⁴ Tikimybė, kad tiriamųjų genų skaičius konkrečioje GO kategorijoje atitiko duomenų bazės duomenis atsitiktinai. Jei $P < 0,05$, atitikusių genų skaičius yra statistiškai reikšmingas.



24 pav. Žmogaus vėlyvųjų pasąžų KČ MKL reikšmingai pakitusios raiškos genų funkcinė ontologijos analizė biologinių procesų kategorijoje

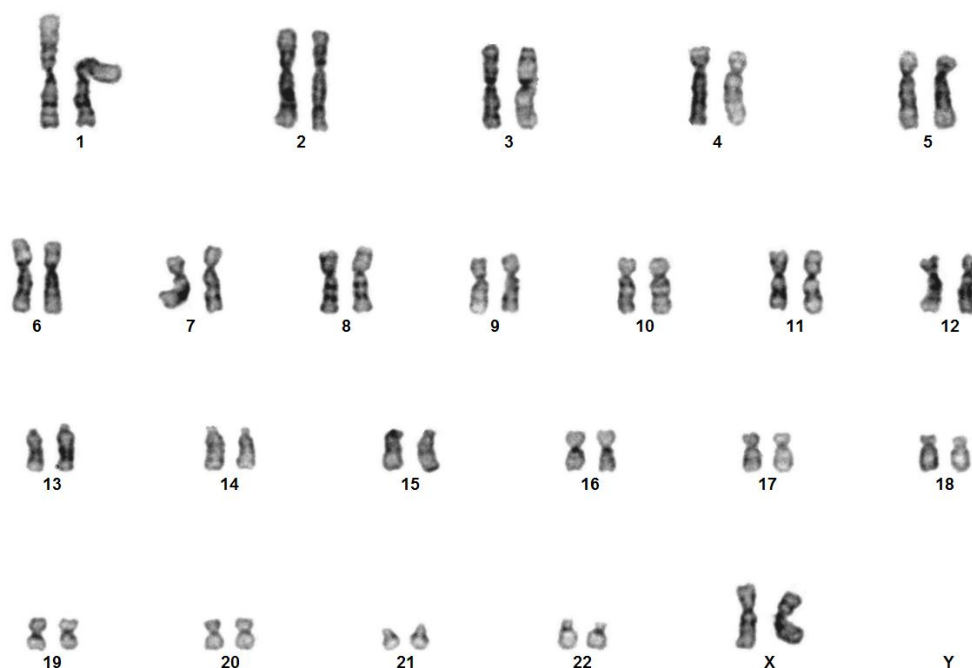
13 reikšmingai pakitusios raiškos genų buvo priskirti 36 genų ontologijos (GO) biologinių procesų terminams, kurie vėliau buvo sugrupuoti pagal aukštesnės hierarchijos ląstelės biologinius procesus. Pirmasis skaičius nurodo GO terminų skaičių, antrasis skaičius – procentinę dalį tarp visų 36 GO terminų

4.3 Audinio šaldymo įtakos MKL kariotipo stabilumui tyrimas

Siekdami ištirti po užšaldymo atšildyto žmogaus virkštelės drebutinio jungiamojo audinio (VDJA) ankstyvųjų (1–2) pasažų MKL genomo stabilumą, atlikome įmonėje *The Cell Factory* (Belgija) užfiksuotų ląstelių ($n = 5$) citogenetinį tyrimą. Dviejų donorų mėginių geros kokybės metafazių skaičius analizei buvo nepakankamas (6 lentelė). Kitų trijų donorų mėginių kariotipai buvo normalūs, turintys diploidinį chromosomų skaičių ($2n = 46, XX$). Jokių chromosomų struktūros pokyčių (tokių kaip delecijos, inversijos, translokacijos ar žiedinės chromosomos) neaptikome (25 pav.).

6 lentelė. Ankstyvųjų pasažų žmogaus VDJA MKL kariotipo tyrimo rezultatai

Mėginys	Pasažas	Metafazių skaičius
1	P2	19
2	P1	25
3	P1	25
4	P1	nepakankamas analizei
5	P1	nepakankamas analizei



25 pav. MKL, išskirtų iš užšaldyto virkštelės audinio, kariograma

Visų tirtų donorų ląstelių kariotipai buvo normalūs ($2n = 46, XX$). Pradinis padidinimas 1000x

4.4 Mitybinės terpės sudėties įtakos MKL genų raiškai tyrimas

Visuminės RNR išskyrimas ir kokybės vertinimas. Iš VDJA MKL, augintų rekombinantiniais baltymais ir FVS papildytose mitybinėse terpėse, išskirtos visuminės RNR kiekis ir kokybė nurodyti 7 lentelėje. Šie rodikliai atitiko PGR gardelių gamintojo keliamus reikalavimus: matuojant spektrofotometru, esant 260 nm ir 280 nm bangos ilgiams, sugerties reikšmių santykis ($A_{260/280}$) turi būti 1,8–2,0.

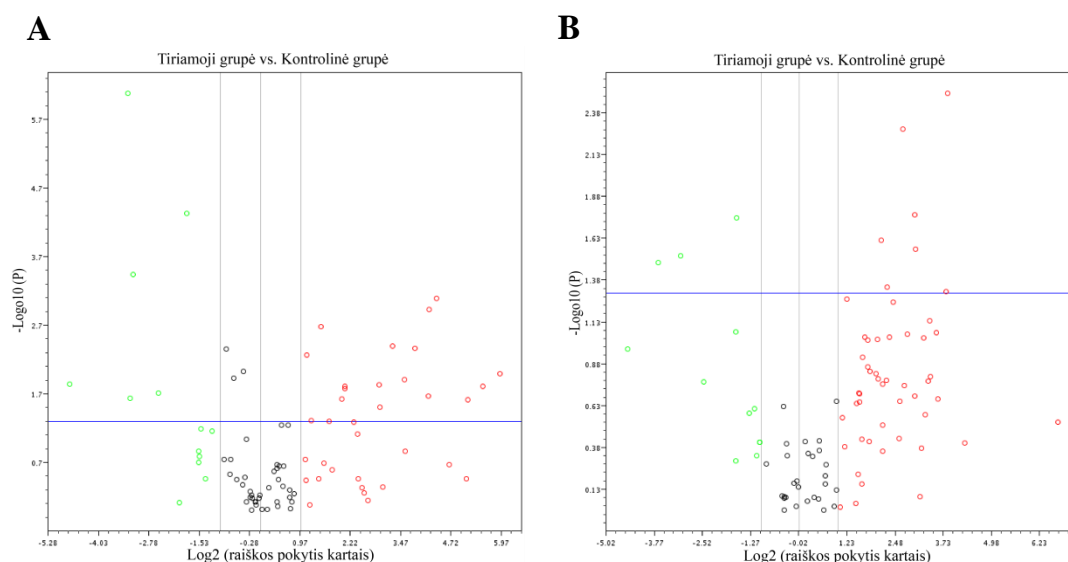
7 lentelė. Iš virkštelės audinio MKL išskirtos visuminės RNR kiekio ir kokybės įvertinimo rezultatai

Mėginys, pasažas	RNR koncentracija	RNR kokybė
#1, P2	869,1 ng/μl	260/280 = 2,01
#1-S, P3	2438,6 ng/μl	260/280 = 1,99
#2, P2	1168,3 ng/μl	260/280 = 1,99
#2-S, P3	2207,5 ng/μl	260/280 = 2,01
#3, P2	1026,2 ng/μl	260/280 = 2,00
#3-S, P3	3482,7 ng/μl	260/280 = 2,02

PGR gardelių kontrolių įvertinimas. Analizėje panaudotų gardelių *RT² ProfilerTM PCR Array Human Mesenchymal Stem Cells* ir *RT² ProfilerTM PCR Array Human Cellular Senescence* kontrolinių matavimų C_T įverčiai neperžengė rekomenduojamų normų ribų: teigiamos PGR kontrolės vid. C_T 14 ± 2 , atvirkštinės transkripcijos kontrolės $\Delta C_T = \text{vid.}C_T^{\text{RTC}} - \text{vid.}C_T^{\text{PPC}} < 5$, genominės DNR kontrolės $C_T > 33$. Dalies mėginių atvirkštinės transkripcijos kontrolės įverčiai nežymiai viršijo rekomenduojamų normų ribas. Iš visų tirtų 24 mėginių (įskaitant pakartotinius) 3 mėginių užterštumo genomine DNR įvertis buvo < 33 , todėl šie mėginiai į analizę nebuvo įtraukti.

Genų raiškos tyrimas, naudojant PGR gardeles. Siekdami išsamiau įvertinti VDJA MKL, tyrėme 162 skirtingų genų, susijusių su kamieniškumu ir ląstelės senėjimu, raišką, naudodami komercines kiekybinės PGR gardeles. Iš viso aptikome 155 genų raišką ($C_T < 33$) VDJA MKL, augintose rekombinantiniais baltymais papildytoje mitybinėje terpėje. VDJA MKL, augintose DME mitybinėje terpėje, papildytoje 10 % FVS, aptikome 158 genų

raišką. Nustatėme, kad iš 162 tirtų genų reikšmingai ($p < 0,05$) padidėjo ≥ 2 kartus 24 genų raiška, o reikšmingai ($p < 0,05$) sumažėjo ≥ 2 kartus 9 genų raiška VDJA MKL, augintose mitybinėje terpėje su rekombinantiniais baltymais, palyginti su ląstelėmis, augintomis su FVS (26 pav. A, B, 8 lentelė). Tai sudaro 20,37 % visų tirtų genų.



26 pav. Žmogaus VDJA MKL, augintų skirtingose mitybinėse terpėse, genų raiškos pokyčiai

Diagramose pavaizduoti kamieniškumo genų (**A**) ir senėjimo genų (**B**) raiškos pokyčiai VDJA MKL, augintose rekombinantiniais baltymais papildytoje mitybinėje terpėje (tiriamaoji grupė), palyginti su VDJA MKL, augintose FVS turinčioje mitybinėje terpėje, genų raiška (kontrolinė grupė). Raudonos spalvos taškai rodo genus, kurių raiška padidėjo ≥ 2 kartus. Žalios spalvos taškai rodo genus, kurių raiška sumažėjo ≥ 2 kartus. Vertikalios šoninės pilkos spalvos linijos rodo raiškos pokyčio kartais (angl. *fold change*) ribą (≥ 2 kartai), o horizontali mėlynos spalvos linija – p reikšmės ribą ($p < 0,05$). Genai, kurių raiškos pokyčiai ir p reikšmės atitiko šias ribas, nurodyti 8 lentelėje

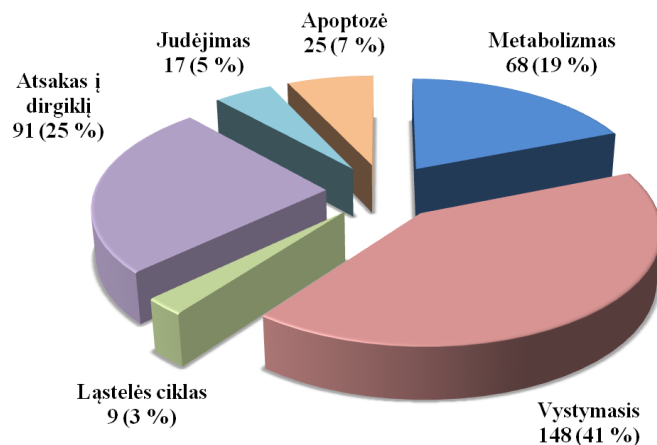
Genų ontologijos analizė. Atlikome 33 genų, kurių raiška reikšmingai pakito, funkcinę ontologijos analizę, siekdami geriau suprasti VDJA MKL vykstančius procesus. Tiriant biologines funkcijas, genai buvo reikšmingai ($p < 0,05$) priskirti skirtingiems 358-iesiems genų ontologijos (GO) terminams. Dauguma terminų susiję su vystymusi (daugiausia ląstelės diferenciacija bei morfogeneze), metabolizmu (daugiausia DNR replikacija, RNR transkripcija bei baltymų modifikacijomis) ir atsaku į dirgiklį (daugiausia augimo veiksniai bei hipoksiją) (27 pav.). Tiriant genų koduojamų produktų ląstelinę funkciją,

genai buvo reikšmingai ($p < 0,05$) priskirti 15-ai GO terminų (9 lentelė). Tiriant genų koduojamų produktų molekulinę funkciją, genai buvo reikšmingai ($p < 0,05$) priskirti 16-ai GO terminų (10 lentelė).

8 lentelė. Genų raiška, kuri reikšmingai pakito žmogaus VDJA MKL, augintose rekombinantiniais baltymais papildytoje mitybinėje terpėje, palyginti su VDJA MKL, augintų serumo turinčioje mitybinėje terpėje, genų raiška

Genas	Raiškos pokytis kartais*	<i>p</i>	Genas	Raiškos pokytis kartais*	<i>p</i>
<i>NT5E</i>	61,41	0,010	<i>THBS1</i>	4,36	0,024
<i>PTK2</i>	45,64	0,016	<i>SMAD4</i>	4,25	0,017
<i>BGLAP</i>	35,22	0,024	<i>TGFB3</i>	4,23	0,016
<i>NES</i>	20,57	0,001	<i>ANPEP</i>	4,05	0,024
<i>BMP4</i>	18,23	0,001	<i>HDAC1</i>	2,81	0,002
<i>RHOA</i>	17,83	0,022	<i>HAT1</i>	2,39	0,049
<i>CDKN2C</i>	14,34	0,003	<i>CD44</i>	2,22	0,005
<i>CTNNB1</i>	14,15	0,004	<i>IGFBP3</i>	-3,10	0,018
<i>CHEK1</i>	14,03	0,049	<i>VEGFA</i>	-3,58	0,000
<i>NUDT6</i>	11,86	0,013	<i>GDF15</i>	-5,80	0,019
<i>ENG</i>	9,65	0,004	<i>CREG1</i>	-8,45	0,030
<i>CCNA2</i>	8,10	0,027	<i>IL6</i>	-9,02	0,000
<i>CDKN1C</i>	7,91	0,017	<i>JAG1</i>	-9,50	0,023
<i>GDF5</i>	7,74	0,031	<i>ICAM1</i>	-9,83	0,000
<i>HGF</i>	7,64	0,015	<i>CDKN2B</i>	-12,67	0,033
<i>EGR1</i>	6,45	0,005	<i>CSF3</i>	-26,79	0,014
<i>CITED2</i>	4,84	0,046			

*Raiškos pokytis kartais išreikštas kaip *FG* (angl. *fold regulation*), kuris biologiniu požiūriu prasmingiau atspindi raiškos pokytį kartais *FC* (angl. *fold change*). $FC > 1$ rodo raiškos padidėjimą ir yra lygus *FG*. $FC < 1$ rodo raiškos sumažėjimą ir *FG* yra atvirkščiai neigiamas *FC* (t.y. *FG* apskaičiuojamas pagal formulę $1/-FC$).



27 pav. Žmogaus VDJA MKL, augintose skirtingose mitybinėse terpėse, reikšmingai pakitusios raiškos genų funkcinė ontologinė analizė biologinių procesų kategorijoje

33 reikšmingai pakitusios raiškos genai buvo priskirti 358-iems genų ontologijos (GO) biologinių procesų terminams, kurie vėliau buvo sugrupuoti pagal aukštesnės hierarchijos ląstelės biologinius procesus. Pirmasis skaičius nurodo GO terminų skaičių, antrasis skaičius – procentinę dalį tarp visų 358 GO terminų

9 lentelė. Mitybinėje terpėje su rekombinantiniais baltymais augintų VDJA MKL, palyginti su FVS turinčioje mitybinėje terpėje augintomis VDJA MKL, reikšmingai ($p < 0,05$) ≥ 2 kartus pakitusios raiškos 33 genų funkcinė ontologijos analizė lokalizacijos ląstelėje kategorijoje

GO ¹ kategorija	lokalinizacija ląstelėje	Genų sk. duomenų bazėje ²	Atitikusių genų sk. ³	Atitikę genai	P ⁴
GO:0005576	Užląstelinis regionas	4416	21	<i>ANPEP, THBS1, TGFB3, RHOA, BGLAP, ICAM1, VEGFA, CD44, CTNNB1, CSF3, JAG1, NT5E, ENG, IGFBP3, BMP4, HGF, GDF15, GDF5, CREG1, CHEK1, IL6</i>	2,04E-04
GO:0044421	Užląstelinio regiono dalis	3692	20	<i>ANPEP, THBS1, TGFB3, RHOA, BGLAP, ICAM1, VEGFA, CD44, CTNNB1, CSF3, NT5E, ENG, IGFBP3, BMP4, HGF, GDF15, GDF5, CREG1, CHEK1, IL6</i>	5,87E-05
GO:0005615	Užląstelinė erdvė	1299	16	<i>ANPEP, THBS1, TGFB3, BGLAP, ICAM1, VEGFA, CSF3, ENG, IGFBP3, BMP4, HGF, GDF15, GDF5, CREG1, CHEK1, IL6</i>	2,62E-08
GO:0009986	Ląstelės paviršius	720	10	<i>ANPEP, THBS1, TGFB3, RHOA, ICAM1, VEGFA, CD44, NT5E, ENG, IL6</i>	1,29E-04
GO:0098552	Membranos pusė	419	7	<i>PTK2, ANPEP, THBS1, ICAM1, CD44, ENG, IL6</i>	4,28E-03
GO:0005925	Sutelktinis sąlytis	383	6	<i>PTK2, RHOA, ICAM1, CD44, CTNNB1, ENG</i>	3,32E-02
GO:0005924	Ląstelės-substrato sąlyčio jungtis	388	6	<i>PTK2, RHOA, ICAM1, CD44, CTNNB1, ENG</i>	3,57E-02
GO:0000785	Chromatinas	404	6	<i>HAT1, SMAD4, CTNNB1, HDAC1, CITED2, CHEK1</i>	4,47E-02
GO:0030055	Ląstelės-substrato jungtis	392	6	<i>PTK2, RHOA, ICAM1, CD44, CTNNB1, ENG</i>	3,78E-02
GO:0009897	Plazminės membranos išorinė pusė	232	6	<i>ANPEP, THBS1, ICAM1, CD44, ENG, IL6</i>	1,94E-03
GO:0034774	Sekrecinės granulės vidus	62	4	<i>THBS1, TGFB3, VEGFA, HGF</i>	3,56E-03
GO:0060205	Pūslelės, susiformavusios iš citoplazminės membranos, vidus	79	4	<i>THBS1, TGFB3, VEGFA, HGF</i>	9,22E-03
GO:0031093	Trombocitų α -granulės vidus	48	4	<i>THBS1, TGFB3, VEGFA, HGF</i>	1,30E-03
GO:0031091	Trombocitų α -granulė	63	4	<i>THBS1, TGFB3, VEGFA, HGF</i>	3,79E-03
GO:0031983	Pūslelės vidus	80	4	<i>THBS1, TGFB3, VEGFA, HGF</i>	9,68E-03

¹ GO – Genų ontologija.

² Genų, priskirtų konkrečiai GO kategorijai, skaičius duomenų bazėje. Iš viso 2016 03 25 PANTHER duomenų bazėje žmogaus genomą sudarė 20814 genai.

³ Tiriamųjų genų skaičius, atitikęs esančius duomenų bazėje konkrečioje GO kategorijoje. Iš viso tirtas 33 genų rinkinys.

⁴ Tikimybė, kad tiriamųjų genų skaičius konkrečioje GO kategorijoje atitiko duomenų bazės duomenis atsitiktinai. Jei $P < 0,05$, atitikusių genų skaičius yra statistiškai reikšmingas.

10 lentelė. Mitybinėje terpėje su rekombinantiniais baltymais augintų VDJA MKL, palyginti su FVS turinčioje mitybinėje terpėje augintomis VDJA MKL, reikšmingai ($p < 0,05$) ≥ 2 kartus pakitusios raiškos 33 genų funkcinė ontologijos analizė molekulinų funkcijų kategorijoje

GO ¹ kategorija	Molekulinė funkcija	Genų sk. duomenų bazėje ²	Atitikusių genų sk. ³	Atitikę genai	P ⁴
GO:0005488	Jungimasis	13955	30	<i>HATI, PTK2, ANPEP, THBS1, TGFB3, RHOA, BGLAP, ICAM1, VEGFA, CD44, SMAD4, NUDT6, CTNNB1, CSF3, HDAC1, CDKN2C, JAG1, NT5E, ENG, IGFBP3, CITED2, BMP4, HGF, GDF15, CDKN2B, GDF5, CCNA2, CREG1, CHEK1, IL6</i>	4,56E-03
GO:0005515	Jungimasis prie baltymo	10420	30	<i>HATI, PTK2, THBS1, TGFB3, RHOA, ICAM1, VEGFA, CD44, SMAD4, NUDT6, CTNNB1, CSF3, HDAC1, CDKN2C, JAG1, ENG, IGFBP3, CITED2, BMP4, HGF, GDF15, CDKN2B, GDF5, CCNA2, CREG1, CHEK1, IL6, EGR1, CDKN1C, NES</i>	1,77E-03
GO:0005102	Jungimasis prie receptoriaus	1415	15	<i>PTK2, THBS1, TGFB3, ICAM1, VEGFA, NUDT6, CTNNB1, CSF3, JAG1, ENG, BMP4, HGF, GDF15, GDF5, IL6</i>	2,38E-06
GO:0008083	Augimo veiksnio aktyvumas	162	10	<i>TGFB3, VEGFA, NUDT6, CSF3, JAG1, BMP4, HGF, GDF15, GDF5, IL6</i>	1,57E-10
GO:0005126	Jungimasis prie citokinių receptoriaus	262	8	<i>TGFB3, VEGFA, CSF3, ENG, BMP4, GDF15, GDF5, IL6</i>	1,62E-05
GO:0005125	Citokino aktyvumas	217	7	<i>TGFB3, VEGFA, CSF3, BMP4, GDF15, GDF5, IL6</i>	1,10E-04
GO:0005160	Jungimasis prie TGF- β receptoriaus	49	5	<i>TGFB3, ENG, BMP4, GDF15, GDF5</i>	3,98E-05
GO:0005539	Jungimasis prie glikozaminoglikano	197	5	<i>THBS1, VEGFA, CD44, ENG, BMP4</i>	3,54E-02
GO:0001085	Jungimasis prie RNR polimerazės II transkripcijos veiksnio	94	4	<i>SMAD4, CTNNB1, HDAC1, CITED2</i>	3,75E-02
GO:0019955	Jungimasis prie citokino	83	4	<i>THBS1, TGFB3, ENG, GDF5</i>	2,31E-02
GO:0004861	Nuo ciklino priklausomos serino/treonino kinazės slopiklio aktyvumas	12	3	<i>CDKN2C, CDKN2B, CDKN1C</i>	2,53E-03
GO:0030291	serino/treonino kinazės slopiklio aktyvumas	28	3	<i>CDKN2C, CDKN2B, CDKN1C</i>	3,15E-02
GO:0050431	Jungimasis prie TGF- β	16	3	<i>THBS1, TGFB3, ENG</i>	5,96E-03
GO:0001968	Jungimasis prie fibronektino	28	3	<i>THBS1, VEGFA, IGFBP3</i>	3,15E-02
GO:0016538	Nuo ciklino priklausomos serino/treonino kinazės reguliatoriaus aktyvumas	20	3	<i>CDKN2C, CDKN2B, CDKN1C</i>	1,16E-02
GO:0042056	Chemoatraktanto aktyvumas	25	3	<i>VEGFA, BMP4, HGF</i>	2,25E-02

¹ GO – Genų ontologija.

² Genų, priskirtų konkrečiai GO kategorijai, skaičius duomenų bazėje. Iš viso 2016 03 25 PANTHER duomenų bazėje žmogaus genomą sudarė 20814 genai.

³ Tiriamųjų genų skaičius, atitikęs esančius duomenų bazėje konkrečioje GO kategorijoje. Iš viso tirtas 33 genų rinkinys.

⁴ Tikimybė, kad tiriamųjų genų skaičius konkrečioje GO kategorijoje atitiko duomenų bazės duomenis atsitiktinai. Jei $P < 0,05$, atitikusių genų skaičius yra statistiškai reikšmingas.

5. REZULTATŲ APTARIMAS

5.1 MKL išskyrimo iš likutinės kaulų čiulpų medžiagos ir pagausinimo iki terapijai tinkamo kiekio metodika

Šiuo metu kaulų čiulpai yra pagrindinis terapijai skirtų žmogaus mezenchiminių kamieninių ląstelių (MKL) šaltinis²⁰. Naudoti klinikoje MKL paprastai yra išskiriamos iš didelio kaulų čiulpų (KČ) tūrio (50–60 ml) centrifuguojant per tankio gradientą^{16,104-106}. Mažo kaulų čiulpų tūrio (<8 ml) naudoti nerekomenduojama dėl rizikos išskirti per mažai ląstelių¹⁰⁷. Išskirtos MKL daug kartų pagausinamos *in vitro*, kol išauginamas terapinį poveikį sukeliantis MKL kiekis^{104,108}. Tačiau kaulų čiulpų punkcija yra invazinė ir skausminga procedūra pacientui¹⁰⁹. Procedūros metu atliekama premedikacija ir atliekama narkozė¹¹⁰. Dėl to nedaug žmonių sutinka tapti kaulų čiulpų donorais. Be to, sudėtinga standartizuoti centrifugavimo per tankio gradientą procedūrą¹¹¹. Pastaraisiais metais tyrėjai ieško naujų, lengviau standartizuojamų ir mažiau nepatogumų donorams sukeliančių metodų MKL išskirti iš kaulų čiulpų. *Horn* su bendraautoriais KČ MKL išskyrimui pasiūlė taikyti raudonųjų kraujo ląstelių lizės metodą naudojant mažesnį kaulų čiulpų tūrį (10–20 ml)¹¹¹. *Otsuru* su bendraautoriais KČ MKL išskirti pasiūlė naudoti uždarą filtravimo sistemą (*Kaneka Corporation*, Japonija), kurioje branduolį turinčios ląstelės surenkamos filtre nenaudojant centrifugavimo procedūros¹¹².

Šio tyrimo metu mes pirmiausia sėkmingai išskyrėme MKL iš likutinės žmogaus kaulų čiulpų transplantacijos medžiagos pritaikydami raudonųjų kraujo ląstelių lizės (RKLL) metodą. MKL išskyrėme iš vieno vakuuminio mėgintuvėlio, turinčio 6 ml kaulų čiulpų – dar mažesnio tūrio nei rekomendavo *Horn* su bendraautoriais¹¹¹. Kontrolinėje grupėje MKL išskyrėme iš 60 ml kaulų čiulpų tūrio (10 vakuuminių mėgintuvėlių po 6 ml kiekviename) standartiniu centrifugavimo per fikolio gradientą (CFG) metodu. Išskirtas ląsteles persėdavome ir auginome, kol užaugo antrasis pasažas (P2), kai kontrolinėje grupėje ląstelių kiekis pasiekė vadinamąją terapinę dozę ($1-5 \cdot 10^6$

ląstelių/paciento 1 kg)^{76,104,113}. Tiriamosios grupės P2 ląstelių kiekis buvo truputį mažesnis. Įvertinę abiem metodais išskirtų MKL augimo *in vitro* laiką ir užaugusių ląstelių kiekį, nustatėme, kad skirtumai yra statistiškai nereikšmingi (4.1 skyrius). Iš 15 pav. matyti, kad ląstelių augimo kreivės yra beveik lygiagrečios ir RKLL metodu išskirtų MKL terapijai reikšmingą kiekį būtume pasiekę po kito persėjimo keletą dienų. Pagal standartinius kriterijus^{10,110} – gebėjimą prisitvirtinti prie plastikinių paviršių, morfologiją (16 pav.) ir paviršiaus žymenų raišką – įsitikinome, kad P2 ląstelės tikrai yra MKL. Tuo remdamiesi padarėme išvadą, kad RKLL metodu MKL galima išskirti iš nedidelio kaulų čiulpų tūrio ir pagausinti iki terapijai reikalingo kiekio per panašų laiko tarpą, kaip ir naudojant įprastą CFG MKL išskyrimo iš didelių kaulų čiulpų tūrių metodą.

Galimi keli RKLL metodo efektyvumo paaiškinimai. Visų pirma taikant RKLL metodą naudojamos visos vienabranduolės ląstelės, o taikant CFG metodą dalis ląstelių yra prarandamos, nes naudojamos tik plazmos frakcijoje sukonzentruotos vienabranduolės ląstelės¹¹⁴. Antra vertus, ląstelių lizės metu išsiskiria įvairūs augimą skatinantys veiksniai. Žinoma, kad trombocitų lizate gausu įvairių citokinų ir augimo veiksnių, tokių kaip pagrindinis fibroblastų augimo veiksnys (angl. *basic fibroblast growth factor, bFGF*) bei trombocitų augimo veiksnys (angl. *platelet-derived growth factor, PDGF*)¹¹⁵, kurie skatina MKL augimą¹¹¹. Kadangi trombocitų yra kaulų čiulpuose¹¹⁶, šių lizatas gali panašiai skatinti MKL augimą *in vitro*. Be to, dalis CFG metodu išskirtų ląstelių galėjo būti negyvybingos. Labai tikėtina, kad dėl šių priežasčių RKLL metodu išskirtos MKL pirmąjį monosluoksnį (P0) suformavo anksčiau nei MKL, išskirtos CFG metodu (15 pav.).

Kadangi RKLL metodas toks pat efektyvus kaip ir CFG metodas, verta pasinaudoti RKLL metodo privalumais. Visų pirma nebereikia atlikti kaulų čiulpų biopsijos specialiai MKL gauti – MKL galima išskirti iš nedidelės dalies kaulų čiulpų, skirtų transplantacijai. Taip potencialus MKL donoras išvengia kaulų čiulpų biopsijos ir su ja susijusių galimų komplikacijų – hemoragijų, kaulinio audinio trauminių pažeidimų ir skausmo¹¹⁷ – rizikos. Antra, RKLL

metodas yra greitesnis ir paprastesnis, nes metujį taikant atliekama žymiai mažiau manipuliacijų su ląstelėmis nei taikant CFG metoda¹¹¹. Trečia, RKLL technologija palengvina naudoti klinikoje skirtų MKL išskyrimo metodo standartizavimą ir GGP reikalavimų laikymąsi, kadangi yra panaudojamos visos vienabranduolės ląstelės ir dėl to yra mažiau paveikiama heterogeninė kaulų čiulpų sudėtis. Remiantis RKLL metodu, gali būti kuriami ir gaminami nauji uždaros sistemos automatizuoti klinikinio lygmens MKL išskyrimo prietaisai. Tokie standartizuoti metodai sumažintų užkrato tikimybę ir padidintų MKL rezultatų atsikartojamumą^{111,118}. Galiausiai iki šiol nėra tiksliai žinoma, kokie augimo veiksniai yra būtini MKL augti¹¹⁹. Todėl remiantis mūsų ir kitų tyrėjų rezultatais, verta tyrinėti lizato sudėtį ir identifikuoti veiksnius, kurie reikšmingi MKL proliferacijai. Šie ateities tyrimai būtų svarbūs biotechnologijos kompanijoms, kurios gamina apibrėžtos sudėties gyvūninės kilmės komponentų neturinčias mitybines terpes.

5.2 Ilgalaikio auginimo *in vitro* įtaka MKL savybėms

Sėkmingai sukūrę MKL išskyrimo iš likutinės kaulų čiulpų medžiagos metodiką, toliau siekėme išsamiau įvertinti dauginamų *in vitro* MKL savybes. Labai tikėtina, kad gausinamų *in vitro* MKL fundamentalios biologinės savybės gali pakisti¹²⁰. Todėl remdamiesi Tarptautinės ląstelių terapijos draugijos¹⁰, Europos medicinos agentūros^{99,121} bei JAV maisto ir vaistų administracijos⁶⁷ rekomendacijomis, mes charakterizavome MKL, įvertindami ląstelių morfologiją, prisitvirtinimą prie plastiko, proliferacijos potencialą, imunofenotipą, senėjimo būseną, kariotipo stabilumą bei genų, susijusių su ląstelės ciklu, raišką pritaikę gardelių technologiją. Žmogaus KČ MKL gyvavimo trukmę *in vitro* suskirstėme į ankstyvuosius pasažus (P3–P4) ir vėlyvuosius pasažus (P6–P7) pagal ląstelių proliferacijos intensyvumą ir senstančių ląstelių dalį populiacijoje¹²².

5.2.1 Ilgalaikio auginimo *in vitro* įtaka MKL fenotipinėms, funkcinėms savybėms ir kariotipo stabilumui

Proliferacija yra kamieninių ląstelių fundamentinė savybė, būtina atsinaujinti ir pasidauginti. Proliferacija apibrėžia kamieninių ląstelių kamieniškumo laipsnį¹²³. Šio tyrimo metu parodėme, kad ankstyvųjų pasažų žmogaus KČ MKL yra intensyviai proliferuojančios. Užšaldytos P1 žmogaus KČ MKL gali būti pagausintos *in vitro* iki terapijai tinkamo kiekio per 2 savaites, per kurias susiformuoja P3–P4, bendram populiacijos padvigubėjimui (BPP) pasiekus $8,08 \pm 0,74$ (17 pav.), kuris atitiktų šimtus milijonų ląstelių. P0–P1 KČ MKL lėtesnį augimą aiškiname tuo, kad ląstelėms reikia laiko adaptuotis prie nefiziologinių *in vitro* sąlygų.

Ankstyvųjų pasažų MKL buvo prisitvirtinusios prie paviršių ir išlaikė tipišką suaugusių žmonių KČ MKL verpstės ar fibroblastoidinę morfologiją¹²⁴ (18 pav. A). Paviršiaus žymenų raiška atitiko Tarptautinės ląstelių terapijos bendruomenės pasiūlytą MKL apibrėžimo kriterijų¹⁰. Reiktų pažymėti, kad P3–P4 KČ MKL buvo ypatingai grynos – standartinių teigiamų paviršiaus žymenų raiška viršijo 99 % (19 pav. A–C).

Vienas didžiausių nerimą keliančių aspektų siekiant MKL panaudoti praktikoje yra MKL genomo nestabilumas¹²⁵, nes jis sudaro sąlygas ląstelėms įgyti vėžinių ypatybių⁵⁸. Patikimas MKL genomo stabilumo rodiklis yra normalaus kariotipo išlaikymas¹²⁶. Todėl MKL citogenetinė analizė yra būtina siekiant įvertinti gausinamų *in vitro* ląstelių saugumą¹²⁷. Šio tyrimo metu augintų žmogaus KČ MKL kariotipą analizavome taikydami metafazių chromosomų dažymą G–metodu (angl. *G–banding*), kuris yra aukso standartas tarp visų citogenetinių metodų¹²⁸. Parodėme, kad P3–P4 MKL turėjo normalų kariotipą, nenustatėme jokių chromosomų struktūros kloninių pokyčių (tokių kaip delecijos, inversijos, translokacijos ar žiedinės chromosomos) (22 pav. A). Aptikome keletą atsitiktinių chromosomų skaičiaus pokyčių (22 pav. B), kuriuos, labiausiai tikėtina, nulėmė techninės chromosomų preparatų paruošimo priežastys⁷⁷. Šie ankstyvųjų pasažų MKL genomo stabilumo

rezultatai sutampa su kai kurių kitų tyrėjų rezultatais¹²⁹ ir rodo, kad tokių ląstelių taikymas terapijoje nedidintų MKL supiktybėjimo rizikos.

Klinikiniuose tyrimuose dažniausiai (94 %) naudojamos ankstyvųjų pasažų žmogaus MKL¹³⁰. Yra žinoma, kad žmogaus MKL savybės po truputį kinta auginimo metu, todėl nepatartina auginti daugiau nei 4–5 pasažus¹³¹. Visgi mes nusprendėme vėliau, atšildę užšaldytą nedidelę dalį ankstyvųjų pasažų žmogaus KČ MKL, ląsteles paauginti, kol susiformuos papildomi trys pasažai – iki P6–P7, siekdami iširti galimybę gauti papildomus kliniškai reikšmingus ląstelių kiekius. Tačiau vėlyvųjų pasažų KČ MKL augimas po truputį lėtėjo (17 pav.), daugėjo padidėjusių netaisyklingos morfologijos ląstelių (18 pav. B). Šie požymiai rodė, kad ląstelės galbūt perėjo į senėjimo būklę^{132,133}.

Šio tyrimo metu ilgalaikis auginimas *in vitro* skirtingai paveikė žmogaus KČ MKL imunofenotipą. Tokie rezultatai mums buvo netikėti. 1 donoro MKL paviršiaus žymenų raiška išliko stabili viso auginimo *in vitro* metu (19 pav. A, D). 2 donoro vėlyvųjų pasažų MKL neigiamų žymenų raiška padidėjo iki 5,10 % (19 pav. B, E). 3 donoro vėlyvųjų pasažų ląstelių, kurios visai nustojo dalytis (17 pav.), paviršiaus žymenų raiška labai pakito: dalis ląstelių prarado teigiamus bei dalis ląstelių įgijo neigiamus paviršiaus žymenis (19 pav. C, F, 20 pav.). Prieštarungus rezultatus yra paskelbę ir kiti tyrėjai. *Dmitrieva* su bendraautorais¹³⁴ parodė, kad žmogaus KČ MKL (n = 43) pereina į senėjimo fazę po P3–P4, tačiau visų pasažų metu ląstelės išlieka teigiamos pagal žymenis CD105, CD90, CD166 bei CD73 ir neigiamos pagal žymenis CD34, CD19, CD14 bei CD45. *Somasundaram* su bendraautorais¹³⁵ parodė, kad dauguma (3 iš 4) žmogaus KČ MKL kultūrų nustojo augti po P15, tačiau ilgalaikio auginimo metu >90 % ląstelių ekspresuoja CD73, CD90 bei CD105 ir <10 % ląstelių ekspresuoja CD34, CD45 bei HLA–DR. Tuo tarpu *Wagner* su bendraautorais²⁵ parodė, kad auginimas *in vitro* turi labai didelės įtakos žmogaus KČ MKL (n = 6) imunofenotipui: ankstyvųjų pasažų MKL paviršiaus žymenų raiška buvo daug didesnė nei į senėjimo fazę perėjusių ląstelių. Tačiau tyrėjai nepateikė raiškos kiekybinių rezultatų. Mūsų bei kitų

tyrėjų gauti rezultatai rodo, kad vėlyvųjų pasažų KČ MKL identifikacija pagal paviršiaus žymenų raišką gali būti sudėtinga. Todėl standartinių paviršiaus žymenų raiškos pokyčiai reikalauja tolesnių tyrinėjimų. Taip pat buvo nustatyta koreliacija, nors ir statistiškai nereikšminga, tarp ilgalaikio auginimo ir padidėjusio ląstelių granuliuotumo – tai dar viena su žmogaus KČ MKL senėjimu siejama savybė¹³⁶.

Įdomu tai, kad vėlyvųjų pasažų žmogaus KČ MKL kariotipas išliko normalus (22 pav. A). Šie rezultatai sutampa su kai kurių kitų tyrėjų gautais duomenimis žmogaus KČ MKL ilgalaikio auginimo metu^{32,77,137,138} ir prieštarauja neseniai paskelbtam *Estrada* su bendraautoriais tyrimui, kuriame parodyta, kad ilgalaikio auginimo metu senti linkusios žmogaus riebalinio audinio MKL dažnai yra aneuploidinės²¹.

5.2.2 MKL senėjimas ilgalaikio auginimo *in vitro* metu ir su senėjimu susiję biožymenys

Ištyrę ląstelių β -galaktozidazės, dažniausiai naudojamą senstančių ląstelių biožymenį¹³⁹, aktyvumą patvirtinome, kad beveik pusė vėlyvųjų pasažų žmogaus KČ MKL perėjo į senėjimo būseną, o ankstyvuosiuose pasažuose senstančių ląstelių nustatėme tik pavienių (21 pav.). Jau kuris laikas žinoma, kad ilgalaikis auginimas *in vitro* sukelia suaugusiųjų KČ MKL su senėjimu susijusius pokyčius²⁰. Tačiau labai sudėtinga numatyti, kuriame pasaže ar po kelių populiacijos padvigubėjimų žmogaus KČ MKL pereis į senėjimo būseną. Šio tyrimo metu ląstelės senėjimo būseną pasiekė po $15,08 \pm 3,04$ populiacijos padvigubėjimų (17 pav.). Dalis tyrėjų yra nustatę ankstesnį žmogaus KČ MKL senėjimą – po 6–16 PP²⁵, kiti vėlesnį – po 25–40¹⁷ ar net po 35–52 PP²⁶. Tai rodo, kad žmogaus KČ MKL senėjimas nėra susijęs su konkrečiu populiacijos ląstelių pasidalijimo skaičiumi *in vitro*. Kai kurie autoriai nustatė ryšį tarp KČ MKL proliferacijos potencialo ir donorų amžiaus: 59–75 metų¹³¹ bei 20–50 metų¹³² donorų KČ MKL proliferacijos potencialas, palyginti su nepilnamečių (iki 18 metų) KČ MKL proliferacijos potencialu, buvo mažesnis.

Deja, iki šiol nėra standartizuoto metodo ląstelių senėjimui įvertinti²⁷. Iki šiol nėra molekulinų žymenų, kurie specifiškai atspindėtų MKL populiacijos ląstelių senėjimą¹⁴⁰. Tinkamų molekulinų žymenų (genų) atrinkimas galėtų būti efektyvus įrankis siekiant įvertinti MKL senėjimą ir MKL ilgalaikio auginimo saugumą bei efektyvumą¹³⁹. Kiekybinė PGR (kPGR) yra dažniausiai taikomas metodas genų raiškai tirti¹⁴¹, todėl šio tyrimo metu mes panaudojome kPGR gardeles. Skirtingų 162 genų raiškos analizė parodė, kad P6–P7 ląstelėse, palyginti su P3–P4 ląstelėmis, 4 genų raiška reikšmingai ($p < 0,05$) padidėjo ≥ 2 kartus ir 9 genų raiška reikšmingai ($p < 0,05$) sumažėjo ≥ 2 kartus (23 pav. A, B, 4 lentelė).

Genas *Pou5f1* (*Oct4*) yra gyvybiškai svarbus embrioninių kamieninių ląstelių pluripotentiškumo reguliatorius, kuris somatinėse kamieninėse ląstelėse gali tapti aktyvus dėl auginimo sąlygų¹⁴². Genas *PTPRC* koduoja baltymą tirozino fosfatazę CD45, kuri veikia kaip neigiamas citokinų receptorių signalinio kelio reguliatorius ir kurios padidėjusi raiška slopina citokinų sužadintus signalinius kelius¹⁴³. CD45 raiška nėra būdinga žmogaus MKL¹⁰, ir šiame tyrime padidėjusi geno *PTPRC* raiška iš dalies galėtų paaiškinti padidėjusią bendrąją neigiamų paviršiaus žymenų raišką (19 pav. E–F). Genas *PCNA* koduoja proliferuojančios ląstelės branduolio antigeną, kurio raiška vyksta tik aktyviai proliferuojančiose ląstelėse¹⁴⁴. E2F1–3 sužadina baltymo PCNA raišką¹⁴⁵, o pastarąjį reguliuoja kinazė Chk1¹⁴⁶.

Genas *ACTA2*, kurio raiška senstančiose KČ MKL buvo labiausiai padidėjusi, koduoja miofibroblastams specifinę lygiųjų raumenų α -aktino izoformą¹⁴⁷, kurios raiška taip pat vyksta ir žmogaus KČ MKL¹⁴⁸ ir kurios dėka šios ląstelės geba sutraukti (angl. *contract*) užląstelinio užpildo (ULU) komponentus¹⁴⁹. Genas *THBS1* koduoja trombospondiną-1 – adhezinį glikoproteiną, kuris yra sekretuojamas ir įtraukiamas į ULU^{150,116} ir kuris tarpininkauja ląstelė-ląstelė bei ląstelė-užpildas sąveikose¹⁵¹. Genas *PLAU* koduoja fermentą urokinazės tipo plazminogeno aktyvklį (uPA), kuris reguliuoja ULU degradaciją, ląstelių adheziją, uždegiminį ląstelių aktyvinimą¹⁵² ir kurio aktyvumas priklauso nuo citoskeleto reorganizacijos¹⁵³.

Citoskeleto remodeliacijos ir/arba reorganizacijos sutrikimai siejami su žmogaus KČ MKL senėjimu¹⁵⁴. Pakitusi ULU baltymų sintezė ir ULU moduliacija taip pat yra siejama su ląstelių senėjimu^{155,156}.

Rb-E2F yra pagrindinis signalinis kelias, kuris kontroliuoja ląstelės ciklo eigą iš G0 per G1 į S fazę¹⁵⁷ integruodamas daugybę mitogeninių ir antimitogeninių dirgiklių¹⁵⁸. E2F1 ir E2F3 kontroliuoja daugybės genų, dalyvaujančių DNR replikacijoje ir ląstelės ciklo eigoje, raišką. Šių transkripcijos veiksnių veikimo sutrikimai lemia senėjimo indukciją¹⁵⁹. Genų *E2F1* ir *E2F3* iRNR transliaciją reguliuoja miRNR¹⁶⁰. Veiksnių E2F3, kurio geno raiška buvo labiausiai sumažėjusi šiame tyrime, veikimo sutrikimas lemia ryškiausias pasekmes, palyginti su veiksnių E2F1 ir E2F2 nulemtais sutrikimais¹⁶¹. Genai *TBX2* ir *TBX3* koduoja baltymus T-box, kurie veikia kaip transkripcijos slopikliai¹⁶². Chk1 kinazė yra būtinas žmogaus ląstelės ciklo G2 fazės DNR pažaidų kontrolės taško baltymas¹⁶³, kai G1/S kontrolės taško pagrindinis reguliatorius yra p53¹⁶³. Kinazės CHEK1 nuslopinimas mažina G2/M kontrolės taško aktyvumą¹⁶⁴, o tai didina pirmalaikio perėjimo į mitozę nespėjus ištaisyti DNR pažaidų riziką¹⁶⁵. Žmogaus CDC25C fosfatazė yra pagrindinis aktyviklis ciklino B1-Cdk1 komplekso¹⁶⁶, kuris būtinas ląstelės ciklui pereiti į mitozę¹⁶⁷. CDC25C nuslopinimas skatina ląstelės ciklo sustabdymą G2/M fazėje¹⁶⁸, o G2/M stabdymas yra streso sužadinto pirmalaikio ląstelės senėjimo požymis¹⁶⁹. Ląstelės diferenciacija arba perėjimas į ramybės (angl. *quiescence*) fazę paprastai siejami su ląstelės ciklo stabdymu G0/G1 fazėje^{170,171}.

Atlikę pakitusios raiškos genų funkcinę ontologijos analizę, nustatėme, kad šie genai reikšmingai susiję su biologiniais procesais, tokiais kaip ląstelės ciklas, metabolizmas ir atsakas į stresą (24 pav.), kurie nulemia ląstelių senėjimą¹⁷². Tai dar kartą patvirtino, kad šio tyrimo metu žmogaus KČ MKL ilgą laiką auginamos perėjo į senėjimo fazę. Atliekant analizę nė vienas tiriamasis genas nebuvo susietas su procesais, vykstančiais ląstelių piktybėjimo metu, pvz., poliploidizacija, transformacija ar invazija²¹. Su osteosarkomų vystymusi yra siejamas MKL p53 funkcijos praradimas¹⁷³. Tačiau šio tyrimo

metu geno *p53* raiška beveik nepakito (pokytis 1,01, $p = 0,899$). Tokie duomenys leidžia tikėtis, kad ląstelių preparatas, sukurtas pagal mūsų siūlomą protokolą, būtų saugus vartoti ir nesukeltų piktybinių navikų formavimosi organizme. Tolesnės genų ontologijos analizės metu nustatėme, kad dalis genų koduojamų produktų dalyvauja genų transkripcijos reguliacijoje (5 lentelė). Tai patvirtina žinomą faktą, kad ląstelės senėjimo metu kinta genų raiška¹⁷⁴.

Taigi šio tyrimo rezultatai kartu su literatūros duomenimis akivaizdžiai rodo, kad nustatyti 13 genų, kurių raiška reikšmingai ($p < 0,05$) pakito 2 ir daugiau kartų, yra susiję tarpusavyje ir su žmogaus KČ MKL senėjimu *in vitro*. Tarp jų 8 genus (*POU5F1*, *PTPRC*, *ACTA2*, *E2F1*, *E2F3*, *Tbx3*, *PLAU* ir *CDC25C*) su žmogaus KČ MKL senėjimu ilgalaikio auginimo *in vitro* metu mes susiejome pirmą kartą (11 lentelė).

Netikėti ir įdomūs buvo pagrindinių su ląstelės senėjimu siejamų genų – *p53*, *p21*, *p16*, *RB*²⁸ – raiškos rezultatai. Šių genų raiška pakito iki 2 kartų ir nereikšmingai ($p \geq 0,05$): *p53* raiška padidėjo itin nežymiai – 1,01 karto ($p = 0,899$), *p21* raiška padidėjo 1,435 karto ($p = 0,574$), *p16* raiška padidėjo 1,098 karto ($p = 0,834$), *RB* raiška sumažėjo 1,269 karto ($p = 0,088$). Šie rezultatai išsiskiria tarp ir taip prieštaringų kitose laboratorijose gautų duomenų^{26,32,30,31} (2.2 skyrius). Atrodo, kad nė vieno iš šių genų raiškos pokytis nėra griežtai būtinas žmogaus KČ MKL senėjimui vykti ir, ko gero, ląstelės pereina į senėjimo būseną veikiant kitiems mechanizms. Vis dėlto negalime atmesti tikimybės, kad genai, kurių raiška pakinta <2 kartus, taip pat yra svarbūs senėjimui¹⁷⁵.

MikroRNR (arba miRNR) yra 19–22 nukleotidų ilgio nekoduojančios RNR sekos, kurios funkcionuoja kaip pagrindiniai endogeniniai genų raiškos reguliatoriai¹⁷⁶. Tik visai neseniai buvo išsiaiškinta, kad miRNR, dar vadinamos su senėjimu susijusiomis miRNR (angl. *senescence-associated miRNA*), yra svarbūs ląstelės senėjimo efektoriai⁴¹. Efektorinės molekulės (angl. *effector molecules*) – tai mažos molekulės, kurios jungiasi prie slopinančiųjų (angl. *repressor*) molekulių ir taip nuslopina arba suaktyvina slopinančiąsias molekules priklausomai nuo šių gebėjimo jungtis prie geno

taikinio (<http://www.oxfordreference.com>). Todėl šio darbo metu nusprendėme iširti miRNR galimas sąsajas su žmogaus KČ MKL senėjimu. Panaudodami miRNR kPGR gardeles, P6–P7 ląstelėse, palyginę su P3–P4 ląstelėmis, nustatėme 33 miRNR, kurių raiška reikšmingai ($p < 0,05$) padidėjo ar sumažėjo ≥ 2 kartus (23 pav. C, 5 lentelė). Iki šiol tik 3 iš jų yra susietos su žmogaus KČ MKL senėjimu ilgalaikio auginimo *in vitro* metu. Kaip ir mes šiame tyrime, *Tome* su bendraautoriais⁴⁴ parodė, kad *miR-335* raiška senstančiose žmogaus KČ MKL didėja. *Yoo* su bendraautoriais⁴³ parodė, kad *miR-29b* raiška taip pat mažėja, tačiau (priešingai nei mūsų tyrime) *miR-455-3p* raiška didėja. Likusių 30-ties miRNR sąsajų su žmogaus KČ MKL senėjimu *in vitro* nebuvo žinoma. Iš jų 24-ios miRNR buvo susietos su kitų žmogaus ląstelių tipų, amžiumi ar kitų gyvūnų ląstelių senėjimu ir daugumos tirtų atvejų raiškos pokytis (padidėjimas ar sumažėjimas) sutampa su pokyčiais nustatytais mūsų tyrimo metu (12 lentelė).

Taigi šio tyrimo rezultatai kartu su literatūros duomenimis rodo, kad nustatytos 33 miRNR, kurių raiška reikšmingai ($p < 0,05$) pakito ≥ 2 kartus, yra susijusios su žmogaus KČ MKL senėjimu *in vitro*. Iš jų net 30 miRNR su žmogaus KČ MKL senėjimu ilgalaikio auginimo *in vitro* metu mes susiejome pirmą kartą.

MKL savybių pokyčiams didžiausią įtaką, manoma, turi auginimo sąlygos¹⁷⁷. Neseniai parodyta, kad žmogaus fibroblastų pirmalaikis senėjimas yra susijęs su ląstelės pagrindinių metabolinių signalinių kelių pokyčiais. Jų metu aktyvinamas mitochondrijų vienas pagrindinių fermentų – piruvato dehidrogenazė (PDH), vyksta perėjimas nuo glikolizės prie oksidacinio fosforilavimo, dėl ko susidaro senėjimą sužadinantis oksidacinis stresas¹⁷⁸. Iš 36 biologinių procesų, nustatytų šio tyrimo metu, net 47 % tiesiogiai susiję su metabolizmo pokyčiais ir atsaku į stresą/dirgiklį (23 pav.). Manoma, kad viduląstelinio superoksido kaupimasis gali būti pagrindinė žmogaus KČ MKL pirmalaikio senėjimo auginimo *in vitro* metu priežastis¹⁷⁹. Atlikdami šį darbą mes tyrėme *SOD* genų, kurių koduojami fermentai katalizuoja superoksidų radikalų metabolizmą¹⁸⁰, raišką, tačiau ji nekito arba pokytis nebuvo

11 lentelė. Žmogaus KČ MKL ilgalaikio auginimo metu reikšmingai pakitusios raiškos genų palyginimas su literatūros duomenimis

Genas ir raiškos pokytis mūsų tyrime		Literatūra	
		Genų raiška KČ MKL <i>in vitro</i>	Kitos sąsajos su senėjimu
<i>ACTA2</i>	↑	Duomenų nerasta	α -SMA raiška didėja pelių KČ MKL ilgalaikio auginimo metu ¹⁸¹ . Aktino kaupimasis yra žiurkių KČ MKL pirmalaikio senėjimo požymis ¹⁸² .
<i>POU5F1</i>	↑	Duomenų nerasta	Oct-4 raiška nesiskiria tarp vaikų ir suaugusiųjų ankstyvųjų pasažų KČ MKL ir nekoreliuoja su proliferacijos potencialu ¹⁸³ . Egzogeninio <i>OCT4</i> padidėjusi raiška indukuoja žmogaus KČ MKL ankstyvąjį senėjimą ¹⁸⁴ .
<i>PTPRC</i>	↑	Duomenų nerasta	Duomenų nerasta
<i>THBS1</i>	↑	↑ senstančiose žmogaus KČ MKL ³⁷	Duomenų nerasta
<i>E2F3</i>	↓	Duomenų nerasta	E2F1 ir E2F3 veikimo sutrikimai sužadina ląstelės senėjimą ¹⁵⁹ .
<i>CCNB1</i>	↓	↓ senstančiose žmogaus KČ MKL ³⁶	Duomenų nerasta
<i>CHEK1</i>	↓	↓ senstančiose žmogaus KČ MKL ³⁶	Duomenų nerasta
<i>PLAU</i>	↓	Duomenų nerasta	<i>PLAU</i> raiška mažėja žmogaus amnioninio skysčio kamieninių ląstelių auginimo metu ¹⁸⁵ . uPA slopiklio raiška didėja senstančiose žmogaus KČ MKL ²⁵ .
<i>TBX2</i>	↓	↑ vėlyvųjų pasažų senstančiose žmogaus KČ MKL ³⁸	TBX2 ir TBX3 nuslopinimas lemia ląstelių senėjimą ¹⁸⁶ .
<i>TBX3</i>	↓	Duomenų nerasta	TBX2 ir TBX3 nuslopinimas lemia ląstelių senėjimą ¹⁸⁶ .
<i>CDC25C</i>	↓	Duomenų nerasta	CDC25C nuslopinimas skatina ląstelės ciklo sustabdymą ¹⁶⁸ .
<i>E2F1</i>	↓	Duomenų nerasta	E2F1 ir E2F3 veikimo sutrikimai sužadina ląstelės senėjimą ¹⁵⁹
<i>PCNA</i>	↓	↓ vėlyvųjų pasažų senstančiose žmogaus KČ MKL ³⁸	Duomenų nerasta

↑ rodo geno raiškos padidėjimą, ↓ - sumažėjimą.

reikšmingas: *SOD1* raiška padidėjo 1,001 karto ($p = 0,936$), o *SOD2* raiška sumažėjo 2,248 karto ($p = 0,062$). Yra parodyta, kad fetalinis veršelio serumas lemia reaktyvių deguonies junginių padaugėjimą ir žmogaus KČ MKL pirmalaikį senėjimą, palyginti su autologinio serumo turinčioje mitybinėje terpėje augintomis ląstelėmis¹⁸⁷. O hipoksija gali padėti išvengti pirmalaikio senėjimo ir išsaugoti žmogaus KČ MKL ilgalaikį atsinaujinimą^{188,189}.

12 lentelė. Žmogaus KČ MKL ilgalaikio auginimo metu reikšmingai pakitusios raiškos miRNR palyginimas su literatūros duomenimis

miRNR raiškos pokytis mūsų tyrime		Literatūros duomenys apie sąsajas su senėjimu
<i>hsa-miR-376b-3p</i>	↑	<i>miR-376b</i> raiška skiriasi vaikų KČ MKL, palyginti su <i>miR-376b</i> raiška suaugusiųjų KČ MKL ¹⁹⁰ .
<i>hsa-miR-200a-5p</i>	↑	miR-200a siejama su oksidaciniu stresu ¹⁹¹ . miR-200a ↑ streso aktyvintose senstančiose ląstelėse ¹⁹² .
<i>hsa-miR-223-3p</i>	↑	<i>miR-223</i> raiška padidėjusi sergančiųjų daugine mieloma senstančiose KČ MKL, palyginti su raiška sveikų donorų ląstelėse ¹⁹³ .
<i>hsa-miR-608</i>	↑	CD44 3'-UTR raiška reguliuoja miR-608 funkcijas ¹⁹⁴ .
<i>hsa-miR-429</i>	↑	miR-429 slopina ląstelių augimą ^{195,196} .
<i>has-miR-210-3p</i>	↑	Hipoksija sužadina <i>miR-210</i> raišką ir žmogaus MKL išgyvenimą ¹⁹⁷ , tačiau raiškos padidėjimas lemia žmogaus fibroblastų senėjimo požymių išryškėjimą ¹⁹⁸ . ROS sužadina <i>miR-210</i> raišką, kuri skatina žmogaus riebalinio audinio kamieninių ląstelių proliferaciją ¹⁹⁹ . miR-210 raiškos padidėjimas skatina žiurkių MKL išgyvenimą oksidacinio streso aplinkoje ²⁰⁰ bei pelių KČ MKL proliferaciją ²⁰¹ .
<i>hsa-miR-335-5p</i>	↑	Manoma, kad miR-335 yra kamieniškumo žymuo ²⁰² . <i>miR-335</i> reguliuoja žmogaus MKL proliferaciją ²⁰³ .
<i>hsa-miR-935</i>	↓	Raiška sumažėjusi vyresnio amžiaus žmonių KČ MKL ²⁰⁴ .
<i>hsa-miR-193a-3p</i>	↓	Reguliuoja uPA ²⁰⁵ ir siejama su oksidaciniu stresu ²⁰⁶ . Nenuslopinta normaliose kaulų čiulpų ląstelėse, kitaip negu ūmios mieloidinės leukemijos ląstelėse ²⁰⁷ .
<i>hsa-miR-200a-3p</i>	↓	miR-200a siejama su oksidaciniu stresu ¹⁹¹ . <i>miR-200a</i> raiška padidėjusi streso aktyvintuose senstančiuose žmogaus fibroblastuose ¹⁹² .
<i>hsa-miR-192-5p</i>	↓	<i>miR-192</i> aktyvinimas nulemia žmogaus kolorektalinio vėžio ląstelių ciklo sustabdymą G1 fazėje ²⁰⁸ .
<i>hsa-miR-130b-5p</i>	↓	<i>miR-130b</i> raiškos padidėjimas apsaugo žmogaus krūties epitelines ląsteles nuo onkogenų (Ras) sužadinamo senėjimo ²⁰⁹ . miR-130b nuslopinimas susijęs su didelės gliukozės koncentracijos sužadintu žiurkių KČ MKL senėjimu ²¹⁰ . <i>mir-130b</i> raiška mažėja žmogaus virkštelės venos endotelio ląstelių replikacinio senėjimo metu ²¹¹ .
<i>hsa-miR-218-5p</i>	↓	miR-218 raiška mažėja vėlyvųjų pasažų pelių fibroblastuose ²¹² .
<i>hsa-miR-92a-1-5p</i>	↓	miR-92a-1 koduoja miR-17~92 klasteris, kuris dalyvauja ULU baltymo trombospondino-1 (TSP-1) reguliacijoje, esant su amžiumi susijusiam širdies nepakankamumui ²¹³ .
<i>hsa-miR-337-3p</i>	↓	<i>miR-337-5p</i> raiška skiriasi vaikų KČ MKL, palyginti su suaugusiųjų KČ MKL ¹⁹⁰ . <i>miR-337-3p</i> sužadina žmogaus gaubtinės žarnos navikų ląstelių senėjimą ²¹⁴ .
<i>hsa-miR-106b-3p</i>	↓	miR-106b šeimos miRNR: <ul style="list-style-type: none"> • reguliuoja p21/CDKN1A ir skatina ląstelės ciklo eigą²¹⁵ • susijusios su įvairių audinių ląstelių senėjimu²¹⁶ • raiškos padidėjimas apsaugo ląsteles nuo onkogenų indukuoto senėjimo²⁰⁹. <i>miR-106b-3p</i> raiška mažėja senstant žmogaus endotelio ląstelėms ²¹⁷ .

↑ rodo miRNR raiškos padidėjimą, ↓ - sumažėjimą.

tešiny

miRNR raiškos pokytis šiame tyrime		Literatūros duomenys apie sąsajas su senėjimu
<i>hsa-miR-139-5p</i>	↓	<i>miR-139</i> raiška padidėja žmogaus fibroblastuose streso sužadinto senėjimo metu ²¹⁸ .
<i>hsa-miR-455-5p</i>	↓	<i>miR-455*</i> raiška sumažėja vėlyvųjų pasažų pelių fibroblastuose ²¹² . <i>miR-455</i> raiška mažėja senstančių pelių skeleto raumenų ląstelėse ²¹⁹ .
<i>hsa-miR-188-3p</i>	↓	<i>miR-188</i> padidėjusi raiška susijusi su žmogaus nosiaryklės karcinomos ląstelių G1/S perėjimo slopinimu ²²⁰ .
<i>hsa-miR-224-5p</i>	↓	<i>miR-224</i> nuslopinimas lemia pelių kiaušidžių grūdėtųjų ląstelių proliferacijos slopinimą ²²¹ .
<i>hsa-miR-29a-5p</i>	↓	<i>miR-29a</i> laikoma viena pagrindinių su senėjimu susijusių miRNR ²²² . <i>miR-29a</i> sužadina senstančių žiurkių raumenų ląstelių senėjimą ²²³ . <i>miR-29a</i> raiška padidėja žmogaus virkštelės venos endotelio ląstelių replikacinio senėjimo metu ²²⁴ . <i>miR-29a</i> veikia kaip ląstelės genomo stabilumo saugiklis ²²⁵ . <i>miR-29a</i> laikoma vėžio slopikliu ²²⁶ .
<i>hsa-miR-25-5p</i>	↓	<i>miR-25</i> raiška sumažėjusi: <ul style="list-style-type: none"> • senyvo amžiaus donorų audiniuose²²⁷ • senstančiuose žmogaus fibroblastuose^{228,229} • žmogaus plaučių WI-38 ląstelėse tiek pirmalaikio, tiek replikacinio senėjimo metu²³⁰. <i>miR-25</i> raiškos padidėjimas leidžia žmogaus krūties vėžinėms ląstelėms išvengti doksorubicino sužadinto senėjimo ²³¹ .
<i>hsa-miR-15b-3p</i>	↓	<i>miR-15b</i> raiška sumažėjusi: <ul style="list-style-type: none"> • senyvo amžiaus donorų audiniuose²²⁷ • žmogaus fibroblastų replikacinio senėjimo metu²³² • žmogaus odos ląstelių pirmalaikio senėjimo metu²³³. <i>miR-15b</i> reguliuoja žmogaus gliomos ląstelių proliferaciją: raiškos sumažėjimas lemia populiacijoje G0/G1 ląstelių sumažėjimą ir atitinkamai padidėjimą S fazėje ²³⁴ .
<i>hsa-miR-29b-1-5p</i>	↓	<i>miR-29b-1*</i> raiška mažėja žmogaus virkštelės venos endotelio ląstelių replikacinio senėjimo metu ²¹¹ .
<i>hsa-miR-7-5p</i>	↓	<i>miR-7-5p</i> slopina žmogaus danties pulpos MKL proliferaciją ²³⁵ . <i>miR-7</i> susijusi su pelių senstančiais skeleto raumenimis ²¹⁹ . <i>mir-7</i> raiška padidėjusi senyvo amžiaus žmonių fibroblastuose ²³⁶ . <i>mir-7</i> skatina žmogaus plaučių navikų ląstelių proliferaciją ²³⁷ . <i>mir-7-5p</i> raiškos padidėjimas slopina krūties navikų ląstelių proliferaciją ²³⁸ . <i>miR-7</i> veikia kaip pelių β-ląstelių proliferacijos slopiklis ²³⁹ . <i>miR-7</i> skatina kinų žiurkėno kiaušidžių ląstelių ciklo stabdymą G1/S fazėje ²⁴⁰ .

↑ rodo miRNR raiškos padidėjimą, ↓ - sumažėjimą.

Remdamiesi mūsų tyrimo metu gautais rezultatais ir išanalizuota literatūra, galime teigti, kad mūsų tyrimo metu žmogaus KČ MKL patyrė *in vitro* sužadintą pirmalaikį senėjimą. Nors šiame darbe netyrėme šaldymo įtakos žmogaus KČ MKL savybėms, tačiau negalime atmesti tikimybės, kad papildomas ląstelių šaldymas galėjo paskatinti ląstelių senėjimą. Todėl labai svarbu toliau tirti įvairių veiksnių galimą įtaką ląstelių senėjimui ir ieškoti optimalių žmogaus KČ MKL auginimo sąlygų, siekiant išvengti pirmalaikio ląstelių senėjimo ir maksimaliai išnaudoti šio tyrimo metu sukurtą ląstelių išskyrimo iš likutinės kaulų čiulpų medžiagos ir pagausinimo metodiką.

Remiantis mūsų tyrimo rezultatais, šviesinė mikroskopija yra pirminis, greitas, neinvazinis ir nebrangus metodas, kurį taikant nustačius MKL morfologijos pokyčius, jau galima įtarti apie ląstelių kitų savybių pokyčius, kurie toliau gali būti vertinami tikslesniais metodais. Tačiau ląstelės senėjimą sužadinančių dirgiklių, signalinių kelių ir mechanizmų moksliniai tyrimai vis dar yra ankstyvosios stadijos²⁹. Iki šiol nėra molekulinų žymenų, kurie specifiskai atspindėtų MKL populiacijos ląstelių senėjimą¹⁴⁰. Todėl šio tyrimo metu su senstančiomis žmogaus KČ MKL ilgalaikio auginimo *in vitro* metu susieti molekuliniai žymenys galėtų būti panaudoti kaip pagrindas kuriant ląstelių preparato kokybės kontrolę. Mūsų nustatyti žymenys būdingi ne tik jau visiškai nustojusioms dalytis MKL populiacijoms, bet ir toms, kurių proliferacija dar tik lėtėja (17 pav.). Tai leidžia manyti, kad šie žymenys gali būti panaudoti ne tik galutinio MKL preparato senėjimo būklei įvertinti, bet ir preparato gamybos stebėsenos metu siekiant numatyti galimą gaminamo MKL preparato senėjimą.

Šio darbo rezultatai perspektyvūs ir hematologijoje. Manoma, kad MKL yra pagrindinės kaulų čiulpų fiziologijos reguliatoriai. Kaulų čiulpuose iš MKL formuojasi osteoblastai ir adipocitai, kurie tiesiogiai per ląstelė–ląstelė sąveikas ar per išskiriamus tirpius veiksnius sukuria nišą kraujodaros kamieninėms ląstelėms, t.y. sukuria mikroaplinką joms išgyventi, proliferuoti ir kraujodaros sistemai vystytis¹²⁰. Neseniai *Balakrishnan* su bendraautoriais nustatė, kad žmogaus KČ MKL miRNR reguliuoja kraujodaros kamieninių

ląstelių nišą apibrėžiančius genus²⁴¹. Mokslininkai tyrinėjo miRNR–iRNR sąveikas KČ mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse ir nustatė konkrečias miRNR, kurios tiesiogiai reguliuoja kaulų čiulpų funkcijoms svarbius veiksnius: *miR-193a* slopina JAG1 raišką, *miR-9* slopina MMP2 raišką, *miR-200a* slopina WNT5A raišką, o *miR-185* slopina VEGFA raišką. Mūsų nuostabai, *miR-193a* ir *miR-200a* raiška buvo iš labiausiai pakitusių senstančiose *in vitro* žmogaus KČ MKL (4 lentelė). Įdomu ir tai, kad visai neseniai parodyta, kad hematologinių pacientų KČ MKL *in vitro* būdingas pirmalaikio senėjimo fenotipas^{193,242-246}. Remdamiesi šiais rezultatais, mes išskelėme prielaidą, kad šio tyrimo metu senstančiose *in vitro* KČ MKL nustatytos miRNR, ypač *miR-193a* ir *miR-200a*, gali būti genai–kandidatai ieškant hematologinių ligų biožymenų. Todėl verta šiuos pastebėjimus patikrinti ateityje tiriant hematologinių pacientų kaulų čiulpų MKL.

5.3 Audinio šaldymo įtaka MKL kariotipo stabilumui

Virkštelės audinys yra patraukli alternatyva kaulų čiulpams, kadangi jame gausu MKL, o jų išskyrimas yra neinvazinis²⁴⁷. Norint išsaugoti virkštelės audinį, kad galima būtų panaudoti ateityje, jį būtina užšaldyti ir saugoti ilgą laiką – kriokonservuoti. Tačiau šaldymo–atšildymo procesas gali pažeisti ląsteles⁷¹. Kol kas nedaugelis tyrėjų geba išskirti MKL iš šaldyto virkštelės audinio – dažniausiai tai vykdoma iš šviežio audinio fragmentų⁷⁰.

Įmonėje *The Cell Factory* (Belgija) buvo sukurta efektyvi virkštelės drebutinio jungiamojo audinio (VDJA) kontroliuojamo užšaldymo, atšildymo, MKL išskyrimo ir pagausinimo *in vitro* technologija. Bendradarbiaudami su šia įmone, šio tyrimo metu nustatėme, kad virkštelės audinio kontroliuojamo užšaldymo ir atšildymo bei MKL (n = 3) trumpalaikio auginimo *in vitro* (kol užauga P1–P2) technologija nepažeidžia VDJA MKL kariotipo – jokių chromosomų struktūros pokyčių (tokių kaip delecijos, inversijos, translokacijos ar žiedinės chromosomos) neaptikome (25 pav.). Šiuo tyrimu pirmą kartą

parodėme, kad virkštelės audinio šaldymas neturi įtakos VDJA MKL genomo stabilumui ir kad minėtoje įmonėje vykdomas kontroliuojamas virkštelės audinio kriokonservavimas yra saugi technologija ląstelėms saugoti. Šiuos tyrimus reikėtų tęsti toliau, siekiant atkartoti gautus rezultatus turint didesnę tiriamąją imtį.

5.4 Mitybinės terpės sudėties įtaka MKL genų raiškai

Fetalinis veršelio serumas (FVS) – dažniausiai naudojamas ląstelių, tarp jų ir žmogaus MKL¹³⁰, kultūrų augimą skatinantis mitybinės terpės papildas¹¹⁸. Tačiau serumo skirtingų partijų sudėties įvairumas, užkrato infekciniais virusais ar prionais rizika ir galimas recipiento imuninio atsako sužadinimas skatina ieškoti serumo pakaitalų, siekiant ląsteles auginti ir taikyti klinikoje²⁴⁸. Šiam tikslui geriausia būtų žmogaus MKL gausinti serumo neturinčioje žinomos sudėties mitybinėje terpėje¹⁰⁸. *Chen* su bendraautoriais²⁴⁹ virkštelės drebutinio jungiamojo audinio (VDJA) MKL gausino serumo neturinčioje *MesenCult-XF* (*StemCell Technologies*, Kanada) mitybinėje terpėje, kol užaugo P25, ir nustatė, kad VDJA MKL savybės (gyvybingumas, morfologija, imunofenotipas, diferenciacijos potencialas, kariotipas) išlieka nepakitusios iki P20. Tačiau gauti rezultatai nebuvo palyginti su VDJA MKL, augintų serumo turinčioje mitybinėje terpėje, savybėmis.

Įmonė *The Cell Factory* (Belgija) sukūrė naują VDJA MKL pagausinimo klinikiniam pritaikymui ir GGP reikalavimus atitinkančią metodiką nenaudojant serumo. Rekombinantiniais baltymais papildytoje mitybinėje terpėje VDJA MKL proliferavo 5–10 kartų greičiau nei ląstelės, augintos įprastoje DME terpėje, papildytoje 10 % FVS. Panašius rezultatus paskelbė *Swamynathan* su bendradarbiais²⁵⁰. Tyrėjai parodė, kad serumo neturinčioje *MesenCult-XF* mitybinėje terpėje augintos VDJA MKL pasidalija daugiau kartų nei ląstelės, augintos mitybinėje terpėje, turinčioje 10 % FVS.

Šio darbo metu tyrėme 3 donorų VDJA MKL mėginius. Nustatėme, kad P2 VDJA MKL (augintose rekombinantiniais baltymais papildytoje mitybinėje terpėje) iš 162 skirtingų genų 24 genų raiška reikšmingai ($p < 0,05$) padidėjo ≥ 2 kartus ir 9 genų raiška reikšmingai ($p < 0,05$) sumažėjo ≥ 2 kartus, palyginti su P3 VDJA MKL (augintose įprastoje DME terpėje, papildytoje 10 % FVS) atitinkamų genų raiška (26 pav. A, B, 8 lentelė). Atlikę šių 33 pakitusios raiškos genų funkcinę ontologijos analizę biologinių procesų kategorijoje nustatėme, kad šie genai daugiausia dalyvauja ląstelės diferenciacijos bei metamorfozės, nukleino rūgščių biosintezės bei baltymų modifikacijos, atsako į dirgiklį procesuose (27 pav.). Nė vienas genų ontologijos terminas nebuvo susietas su ląstelės supiktybėjimu²¹. Tikėtina, kad greitesnė proliferacija gali būti stipresnio kamieniškumo požymis. Atlikę analizę molekulinų funkcijų kategorijoje nustatėme, kad tiriamųjų genų produktai dalyvauja ląstelės komunikacijos procesuose ir dauguma produktų jungiasi prie ląstelių receptorių (10 lentelė). Analizuodami ląstelines funkcijas nustatėme, kad dauguma tiriamų genų koduojamų produktų susiję su sekrecinėmis pūslelėmis ir užląsteline erdve (9 lentelė).

Remdamiesi šio tyrimo rezultatais mes iškėlėme prielaidą, kad auginimo *in vitro* sąlygos galėtų turėti įtakos VDJA MKL vykdomai sekrecijai. Yra žinoma, kad vienas pagrindinių mechanizmų, per kuriuos pasireiškia MKL terapinis poveikis, yra tirpių veiksnių išskyrimas. Neseniai nustatyta, kad MKL parakrininis poveikis pasireiškia, bent jau iš dalies, per užląstelines pūsleles (angl. *extracellular vesicles*)²⁵¹. Užląstelinėse pūslelėse yra gausu biologiškai aktyvių lipidų, baltymų, RNR molekulių ir šios pūslelės yra galima nauja alternatyva kamieninių ląstelių terapijai²⁵². Šios krypties tyrimai turi didelį potencialą ir todėl verta juos tęsti ateityje.

Apibendrinami galime teigti, kad mezenchiminės kamieninės ląstelės, išskirtos iš likutinės kaulų čiulpų transplantacijos medžiagos ir pagausintos iki terapijai tinkamo kiekio, išlaiko savo tapatybę, proliferacijos potencialą ir genomo stabilumą. Tačiau po ilgalaikio auginimo ląstelės pereina į senėjimo

būseną. To priežastis gali būti auginimo sąlygų nulemtas stresas. Atliekant šį tyrimą nustatyti nauji su žmogaus kaulų čiulpų mezenchiminių kamieninių ląstelių senėjimu siejami genai reikšmingai papildo fundamentinio ląstelių biologijos mokslo žinias bei yra potencialūs ląstelių terapijos kokybės kontrolės biožymenys. Virkštelės audinio MKL kariotipo ir genų raiškos tyrimų rezultatai yra palankūs tolesniems šių ląstelių tyrinėjimams siekiant sukurti pažangiosios terapijos vaistinius preparatus.

6. IŠVADOS

1. Kaulų čiulpai – patogus mezenchiminių kamieninių ląstelių (MKL) šaltinis naudoti terapijoje. Eritrocitų lizės metodu MKL gali būti išskirtos iš likutinės kaulų čiulpų transplantacijos medžiagos (6 ml) ir pagausintos *in vitro* iki terapijai tinkamo kiekio ($>1 \cdot 10^8$).
2. Ankstyvųjų pasažų (3–4) kaulų čiulpų MKL fenotipinės, funkcinės bei genetinės savybės (morfologija, proliferacijos greitis, imunofenotipas ir kariotipas) liko nepakitusios. Ankstyvųjų pasažų ląstelėms nebuvo būdingi senėjimo požymiai.
3. Vėlyvųjų pasažų (6–7) kaulų čiulpų MKL buvo genomiškai stabilios. Sulėtėjęs proliferacijos greitis, pakitusi morfologija ir didėjęs β -galaktozidazės aktyvumas rodė, kad 6–7 pasažų MKL perėjo į senėjimo būklę. Nustatyti vėlyvųjų 6–7 pasažų MKL imunofenotipo pokyčiai buvo individualūs kiekvienam donorui.
4. Nustatyti 13 genų, siejamų su ląstelių kamieniškumo palaikymu arba ląstelės dalijimosi stabdymu, ir 33 miRNR raiškos reikšmingi pokyčiai (padidėjimas arba sumažėjimas, $p < 0,05$) senstančiose vėlyvųjų pasažų (6–7) MKL. Tarp jų 8 genų ir 30 miRNR raiškos pokyčiai su MKL senėjimu *in vitro* susieti pirmą kartą.
5. Kontroliuojamas virkštelės audinio šaldymas iš jo išskirtų ir *in vitro* pagausintų MKL kariotipo stabilumui įtakos neturėjo.
6. MKL pagausinimo metodikos pakeitimas pagal Geros gamybos praktikos reikalavimus turėjo reikšmingos įtakos genų, siejamų su ląstelių kamieniškumo palaikymu arba ląstelės dalijimosi stabdymu, raiškai. Nustatyti 33 genų raiškos reikšmingi pokyčiai (padidėjimas arba sumažėjimas, $p < 0,05$) virkštelės audinio MKL, kurios proliferavo greičiau rekombinantiniais baltymais papildytoje mitybinėje terpėje (palyginti su MKL, augintose įprastoje terpėje, papildytoje fetaliniu veršelio serumu).

7. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

1. Mūsų sukurta nauja žmogaus kaulų čiulpų MKL išskyrimo ir auginimo metodika gali būti pritaikyta įstaigose, gaminančiose pažangiosios terapijos vaistinius preparatus, kaip greitesnė, pigesnė ir ląstelių donorui saugesnė už šiuo metu taikomas.
2. Šio tyrimo metu taikytų metodų pagrindu galima būtų sukurti MKL preparato kokybės vertinimo protokolą, siekiant įvertinti gausinamų ląstelių kamieniškumą, galimą senėjimą ir piktybinę transformaciją.

8. REZULTATŲ VIEŠINIMAS

8.1 Publikacijos disertacijos tema

Publikacijos mokslinės informacijos instituto duomenų bazės „ISI Web of Science“ leidiniuose, turinčiuose citavimo rodiklį:

1. **Kundrotas G**, Gasperskaja E, Slapsyte G, Gudleviciene Z, Krasko J, Stumbryte A, Liudkeviciene R. Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow. *Oncotarget* (IF=6,36). 2016;7:10788-10802.
2. Gudleviciene Z, **Kundrotas G**, Liudkeviciene R, Rascon J, Jurga M. Quick and effective method of bone marrow mesenchymal stem cell extraction. *Open Medicine* (IF=0,153). 2015;10:44-49.

Publikacijos kituose recenzuojamuose žurnaluose:

1. **Kundrotas G**. Surface markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Acta Medica Lituanica*. 2012;19:75-79.

8.2 Pranešimai konferencijose

Žodiniai pranešimai

1. Quick and donor saving method for mesenchymal stem cell extraction for clinical use. XII-asis Baltijos šalių laboratorinės medicinos kongresas. 2014 m. rugsėjo 19 d. Ryga, Latvija.
2. Žmogaus mezenchiminių kamieninių ląstelių genetinių savybių tyrimai saugiai terapijai užtikrinti. 2012 m. Jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos“. 2012 m. gruodžio 5 d. Vilnius.
3. Precise controlling of MSC characteristics during *in vitro* cultivation to ensure effective and safe stem cell application in clinical practice for

advanced therapy in oncology. VI-tasis medicinos inovatyvių technologijų tarptautinis forumas. 2012 m. lapkričio 22 d. Baltstogė, Lenkija.

4. Investigation of genetic features of mesenchymal stem cells to ensure safe treatment in oncology. XI-tasis Baltijos šalių laboratorinės medicinos kongresas. 2012 m. gegužės mėn. 11 d. Vilnius.

Stendiniai pranešimai

1. Development of Quality Control protocol for clinical application of mesenchymal stem cells. **Kundrotas G**, Gudlevičienė Ž, Slapšytė G, Gasperskaja E. Tarptautinė konferencija "Stem cell research in Lithuania: past, present and future". 2015 m. rugpjūčio 27 d. Vilnius.
2. Stemness and genetic stability of human mesenchymal stem cells isolated from ultralow bone marrow volume. **Kundrotas G**, Gudlevičienė Ž, Gasperskaja E, Slapšytė G. Tarptautinis VI-tasis Baltijos Onkologų Kongresas. 2014 spalio 3-4 d. Vilnius.
3. Karyotype analysis of early passage mesenchymal stem cells isolated from frozen umbilical cord tissue. **Kundrotas G**, Gasperskaja E, Slapšytė G, Jurga M. VIII-toji mokslinė konferencija "Mokslas Gamtos mokslų fakultete". 2014 spalio 3 d. Vilnius.
4. Quick and donor-saving method for mesenchymal stem cell extraction for biobanking and clinical use. Gudlevičienė Ž, **Kundrotas G**, Liudkevičienė R. Jungtinės Europos, Vidurio Rytų ir Afrikos Biobankų Asociacijos (ESBB) bei Biobankų ir Biologinių Resursų Mokslinių Tyrimų Infrastruktūros (BBMRI) konferencija. 2013 m. spalio 8-11 d. Verona, Italija.
5. Precise controlling of MSC characteristics during *in vitro* cultivation to ensure effective and safe stem cell application in clinical practice for advanced therapy in oncology. Gudlevičienė Ž, **Kundrotas G**, Schweigert D, Slapšytė G. VI-tasis medicinos inovatyvių technologijų tarptautinis forumas. 2012 m. lapkričio 21-23 d. Baltstogė, Lenkija.

FINANSINĖ PARAMA

Mūsų mokslinis tyrimas buvo atliktas pagal Europos Sąjungos struktūrinių fondų lėšomis finansuojamus projektus: „Ląstelių programavimo ir navikų mikroaplinkos valdymo panaudojimas individualizuotai terapijai onkologijoje – LASTER“ (Nr. VP1-3.1-SMM-10-V-02-027) ir „Aukštos kvalifikacijos specialistų, atitinkančių valstybės ir visuomenės poreikius, biomedicinos srityje rengimo tobulinimas – BIOMEDOKT“ (Nr. VP1-3.1-SMM-01-V-03-002), iš kurio buvo finansuojamos doktorantūros studijos.

9. LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Kulshreshtha S, Bhatnagar P. Recent Advances in Stem Cell Research. In: Ravi I, Baunthiyal M, Saxena J, eds. *Advances in Biotechnology*. New Delhi: Springer India; 2014:151-178.
2. Tomar GB, Srivastava RK, Gupta N, Barhanpurkar AP, Pote ST, Jhaveri HM, Mishra GC, Wani MR. Human gingiva-derived mesenchymal stem cells are superior to bone marrow-derived mesenchymal stem cells for cell therapy in regenerative medicine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393:377-383.
3. Grigorian AS, Kruglyakov PV, Taminkina UA, Efimova OA, Pendina AA, Voskresenskaya AV, Kuznetsova TV, Polyntsev DG. Alterations of cytological and karyological profile of human mesenchymal stem cells during in vitro culturing. *Bull Exp Biol Med*. 2010;150:125-130.
4. Kobolak J, Dinnyes A, Memic A, Khademhosseini A, Mobasheri A. Mesenchymal stem cells: identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro engineering of their niche. *Methods*. 2015.
5. Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ. Clinical grade adult stem cell banking. *Organogenesis*. 2009;5:143-154.
6. Estes BT, Diekmann BO, Gimble JM, Guilak F. Isolation of adipose-derived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat Protoc*. 2010;5:1294-1311.
7. Hematti P. Mesenchymal stromal cells and fibroblasts: a case of mistaken identity? *Cytotherapy*. 2012;14:516-521.
8. Lindner U, Kramer J, Rohwedel J, Schlenke P. Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Toward a Better Understanding of Their Biology? *Transfus Med Hemother*. 2010;37:75-83.
9. Prockop DJ, Kota DJ, Bazhanov N, Reger RL. Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs). *J Cell Mol Med*. 2010;14:2190-2199.
10. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8:315-317.
11. Marion NW, Mao JJ. Mesenchymal stem cells and tissue engineering. *Methods Enzymol*. 2006;420:339-361.

12. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*. 2012;10:709-716.
13. Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, Wang CY. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med*. 2013;19:35-42.
14. Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15:482-496.
15. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153:1194-1217.
16. Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal*. 2011;9:12.
17. Takahashi H, Toyoda M, Birumachi J, Horie A, Uyama T, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Umezawa A. Shortening of human cell life span by induction of p16ink4a through the platelet-derived growth factor receptor beta. *J Cell Physiol*. 2009;221:335-342.
18. Koch CM, Reck K, Shao K, Lin Q, Jousen S, Ziegler P, Walenda G, Drescher W, Opalka B, May T, Brummendorf T, Zenke M, Saric T, Wagner W. Pluripotent stem cells escape from senescence-associated DNA methylation changes. *Genome Res*. 2013;23:248-259.
19. Ohtani N, Hara E. Roles and mechanisms of cellular senescence in regulation of tissue homeostasis. *Cancer Sci*. 2013;104:525-530.
20. Roselli EA, Lazzati S, Iseppon F, Manganini M, Marcato L, Gariboldi MB, Maggi F, Grati FR, Simoni G. Fetal mesenchymal stromal cells from cryopreserved human chorionic villi: cytogenetic and molecular analysis of genome stability in long-term cultures. *Cytotherapy*. 2013;15:1340-1351.
21. Estrada JC, Torres Y, Benguria A, Dopazo A, Roche E, Carrera-Quintanar L, Perez RA, Enriquez JA, Torres R, Ramirez JC, Samper E, Bernad A. Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. *Cell Death Dis*. 2013;4:e691.
22. Zhou L, Chen X, Liu T, Gong Y, Chen S, Pan G, Cui W, Luo ZP, Pei M, Yang H, He F. Melatonin reverses H₂O₂-induced premature senescence in mesenchymal stem cells via the SIRT1-dependent pathway. *J Pineal Res*. 2015;59:190-205.

23. Chang TC, Hsu MF, Wu KK. High glucose induces bone marrow-derived mesenchymal stem cell senescence by upregulating autophagy. *PLoS One*. 2015;10:e0126537.
24. Choi M, Han D, Kim S, Ohn T, Jung K, Chai Y. Resveratrol relieves hydrogen peroxide-induced premature senescence associated with SIRT1 in human mesenchymal stem cells. *Molecular & Cellular Toxicology*. 2014;10:29-39.
25. Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD. Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS One*. 2008;3:e2213.
26. Tarte K, Gaillard J, Lataillade J-J, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, Tchirkov A, Rouard H, Henry C, Splingard M, Dulong J, Monnier D, Gourmelon P, Gorin N-C, Sensebé L. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*. 2010;115:1549-1553.
27. Bentivegna A, Miloso M, Riva G, Foudah D, Butta V, Dalpra L, Tredici G. DNA Methylation Changes during In Vitro Propagation of Human Mesenchymal Stem Cells: Implications for Their Genomic Stability? *Stem Cells Int*. 2013;2013:192425.
28. Coleman PR, Hahn CN, Grimshaw M, Lu Y, Li X, Brautigan PJ, Beck K, Stocker R, Vadas MA, Gamble JR. Stress-induced premature senescence mediated by a novel gene, SENEX, results in an anti-inflammatory phenotype in endothelial cells. *Blood*. 2010;116:4016-4024.
29. van Deursen JM. The role of senescent cells in ageing. *Nature*. 2014;509:439-446.
30. Cheng H, Qiu L, Ma J, Zhang H, Cheng M, Li W, Zhao X, Liu K. Replicative senescence of human bone marrow and umbilical cord derived mesenchymal stem cells and their differentiation to adipocytes and osteoblasts. *Mol Biol Rep*. 2011;38:5161-5168.
31. Shibata KR, Aoyama T, Shima Y, Fukiage K, Otsuka S, Furu M, Kohno Y, Ito K, Fujibayashi S, Neo M, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J. Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells and is potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion. *Stem Cells*. 2007;25:2371-2382.
32. Kim J, Kang JW, Park JH, Choi Y, Choi KS, Park KD, Baek DH, Seong SK, Min HK, Kim HS. Biological characterization of long-term cultured human mesenchymal stem cells. *Arch Pharm Res*. 2009;32:117-126.

33. Chandler H, Peters G. Stressing the cell cycle in senescence and aging. *Curr Opin Cell Biol.* 2013;25:765-771.
34. Ozono E, Yamaoka, Sh, Ohtani, K. To grow, stop or die? Novel tumor-suppressive mechanism regulated by the transcription factor E2F. In: Cheng Y ed. *Future aspects of tumor suppressor gene: InTech*; 2013.
35. Alessio N, Bohn W, Rauchberger V, Rizzolio F, Cipollaro M, Rosemann M, Irmeler M, Beckers J, Giordano A, Galderisi U. Silencing of RB1 but not of RB2/P130 induces cellular senescence and impairs the differentiation potential of human mesenchymal stem cells. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70:1637-1651.
36. Noh H, Ahn H-J, Lee W-J, Kwack K, Kwon Y. The molecular signature of in vitro senescence in human mesenchymal stem cells. *Genes & Genomics.* 2010;32:87-93.
37. Yoo JK, Choi SJ, Kim JK. Expression profiles of subtracted mRNAs during cellular senescence in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *Exp Gerontol.* 2013;48:464-471.
38. Choi MR, In YH, Park J, Park T, Jung KH, Chai JC, Chung MK, Lee YS, Chai YG. Genome-scale DNA methylation pattern profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells in long-term culture. *Exp Mol Med.* 2012;44:503-512.
39. Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1812:592-601.
40. Landau DA, Slack FJ. MicroRNAs in mutagenesis, genomic instability, and DNA repair. *Semin Oncol.* 2011;38:743-751.
41. Bilslund AE, Revie J, Keith W. MicroRNA and senescence: the senectome, integration and distributed control. *Crit Rev Oncog.* 2013;18:373-390.
42. Benhamed M, Herbig U, Ye T, Dejean A, Bischof O. Senescence is an endogenous trigger for microRNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Cell Biol.* 2012;14:266-275.
43. Yoo JK, Kim CH, Jung HY, Lee DR, Kim JK. Discovery and characterization of miRNA during cellular senescence in bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Exp Gerontol.* 2014;58:139-145.
44. Tome M, Sepulveda JC, Delgado M, Andrades JA, Campisi J, Gonzalez MA, Bernad A. miR-335 correlates with senescence/aging in human mesenchymal stem cells and inhibits their therapeutic actions through inhibition of AP-1 activity. *Stem Cells.* 2014;32:2229-2244.

45. Shvarts A, Brummelkamp TR, Scheeren F, Koh E, Daley GQ, Spits H, Bernards R. A senescence rescue screen identifies BCL6 as an inhibitor of anti-proliferative p19(ARF)-p53 signaling. *Genes Dev.* 2002;16:681-686.
46. Burton DG, Krizhanovsky V. Physiological and pathological consequences of cellular senescence. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71:4373-4386.
47. Ryu E, Hong S, Kang J, Woo J, Park J, Lee J, Seo JS. Identification of senescence-associated genes in human bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;371:431-436.
48. Sepulveda JC, Tome M, Fernandez ME, Delgado M, Campisi J, Bernad A, Gonzalez MA. Cell senescence abrogates the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in the lethal endotoxemia model. *Stem Cells.* 2014;32:1865-1877.
49. Sikora E, Arendt T, Bennett M, Narita M. Impact of cellular senescence signature on ageing research. *Ageing Res Rev.* 2011;10:146-152.
50. Shay JW, Roninson IB. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene.* 2004;23:2919-2933.
51. Gosselin K, Martien S, Pourtier A, Vercamer C, Ostoich P, Morat L, Sabatier L, Duprez L, T'Kint de Roodenbeke C, Gilson E, Malaquin N, Wernert N, Slijepcevic P, Ashtari M, Chelli F, Deruy E, Vandebunder B, De Launoit Y, Abbadie C. Senescence-associated oxidative DNA damage promotes the generation of neoplastic cells. *Cancer Res.* 2009;69:7917-7925.
52. EMA. Reflection paper on stem cell-based medicinal products. 2011.
53. Wang Y, Han ZB, Song YP, Han ZC. Safety of mesenchymal stem cells for clinical application. *Stem Cells Int.* 2012;2012:652034.
54. Wang Y, Huso DL, Harrington J, Kellner J, Jeong DK, Turney J, McNiece IK. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy.* 2005;7:509-519.
55. Ben-David U, Mayshar Y, Benvenisty N. Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells. *Cell Stem Cell.* 2011;9:97-102.
56. Shen Z. Genomic instability and cancer: an introduction. *J Mol Cell Biol.* 2011;3:1-3.
57. Jefford CE, Irminger-Finger I. Mechanisms of chromosome instability in cancers. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*;59:1-14.

58. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:646-674.
59. Kim SY, Im K, Park SN, Kwon J, Kim JA, Choi Q, Hwang SM, Han SH, Kwon S, Oh IH, Lee DS. Asymmetric aneuploidy in mesenchymal stromal cells detected by in situ karyotyping and fluorescence in situ hybridization: suggestions for reference values for stem cells. *Stem Cells Dev*. 2015;24:77-92.
60. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*. 2005;65:3035-3039.
61. Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, Mysliwicz J, Tonn JC, Goldbrunner R, Lonning PE, Bjerkvig R, Schichor C. Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res*. 2009;69:5331-5339.
62. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, Montagna D, Maccario R, Villa R, Daidone MG, Zuffardi O, Locatelli F. Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Res*. 2007;67:9142-9149.
63. de la Fuente R, Bernad A, Garcia-Castro J, Martin MC, Cigudosa JC. Retraction: Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*. 2010;70:6682.
64. Torsvik A, Rosland GV, Svendsen A, Molven A, Immervoll H, McCormack E, Lonning PE, Primon M, Sobala E, Tonn JC, Goldbrunner R, Schichor C, Mysliwicz J, Lah TT, Motaln H, Knappskog S, Bjerkvig R. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer Res*. 2010;70:6393-6396.
65. Sensebe L, Tarte K, Galipeau J, Krampera M, Martin I, Phinney DG, Shi Y. Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell*. 2012;10:9-10; author reply 10-11.
66. Stoltz JF, de Isla N, Li YP, Bensoussan D, Zhang L, Huselstein C, Chen Y, Decot V, Magdalou J, Li N, Reppel L, He Y. Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21th Century. *Stem Cells Int*. 2015;2015:734731.
67. Bailey AM. Balancing tissue and tumor formation in regenerative medicine. *Sci Transl Med*. 2012;4:147fs128.
68. Kim DW, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang SD, Borlongan CV. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and

optimizing their therapeutic potential for clinical applications. *Int J Mol Sci.* 2013;14:11692-11712.

69. Nagamura-Inoue T, He H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. *World J Stem Cells.* 2014;6:195-202.

70. Ding DC, Chang YH, Shyu WC, Lin SZ. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy. *Cell Transplant.* 2015;24:339-347.

71. Di Giuseppe F, Pierdomenico L, Eleuterio E, Sulpizio M, Lanuti P, Riviello A, Bologna G, Gesi M, Di Ilio C, Miscia S, Marchisio M, Angelucci S. Cryopreservation effects on Wharton's Jelly Stem Cells proteome. *Stem Cell Rev.* 2014;10:429-446.

72. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JA. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology.* 2015;71:181-197.

73. Maslova O, Novak M, Kruzliak P. Umbilical Cord Tissue-Derived Cells as Therapeutic Agents. *Stem Cells Int.* 2015;2015:150609.

74. Da-Croce L, Gambarini-Paiva GH, Angelo PC, Bambirra EA, Cabral AC, Godard AL. Comparison of vitrification and slow cooling for umbilical tissues. *Cell Tissue Bank.* 2013;14:65-76.

75. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34:747-754.

76. Bieback K, Schallmoser K, Kluter H, Strunk D. Clinical Protocols for the Isolation and Expansion of Mesenchymal Stromal Cells. *Transfus Med Hemother.* 2008;35:286-294.

77. Redaelli S, Bentivegna A, Foudah D, Miloso M, Redondo J, Riva G, Baronchelli S, Dalpra L, Tredici G. From cytogenomic to epigenomic profiles: monitoring the biologic behavior of in vitro cultured human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2012;3:47.

78. Gallina C, Turinetto V, Giachino C. A New Paradigm in Cardiac Regeneration: The Mesenchymal Stem Cell Secretome. *Stem Cells Int.* 2015;2015:765846.

79. Wernicke CM, Grunewald TG, Juenger H, Kuci S, Kuci Z, Koehl U, Mueller I, Doering M, Peters C, Lawitschka A, Kolb HJ, Bader P, Burdach S, von Luetlichau I. Mesenchymal stromal cells for treatment of steroid-refractory GvHD: a review of the literature and two pediatric cases. *Int Arch Med.* 2011;4:27.

80. von Dalowski F, Kramer M, Wermke M, Wehner R, Rollig C, Alakel N, Stolzel F, Parmentier S, Sockel K, Krech M, Schmitz M, Platzbecker U, Schetelig J, Bornhauser

M, von Bonin M. Mesenchymal Stromal Cells for Treatment of Acute Steroid-Refractory GvHD: Clinical Responses and Long-Term Outcome. *Stem Cells*. 2015.

81. Eom YW, Kim G, Baik SK. Mesenchymal stem cell therapy for cirrhosis: Present and future perspectives. *World J Gastroenterol*. 2015;21:10253-10261.

82. Kim G, Eom YW, Baik SK, Shin Y, Lim YL, Kim MY, Kwon SO, Chang SJ. Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cells for Patients with Chronic Liver Diseases: Systematic Review and Meta-analysis. *J Korean Med Sci*. 2015;30:1405-1415.

83. Wyles CC, Houdek MT, Behfar A, Sierra RJ. Mesenchymal stem cell therapy for osteoarthritis: current perspectives. *Stem Cells Cloning*. 2015;8:117-124.

84. Davey GC, Patil SB, O'Loughlin A, O'Brien T. Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of diabetes mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:86.

85. Liew A, O'Brien T, Egan L. Mesenchymal stromal cell therapy for Crohn's disease. *Dig Dis*. 2014;32 Suppl 1:50-60.

86. Colpo GD, Ascoli BM, Wollenhaupt-Aguiar B, Pfaffenseller B, Silva EG, Cirne-Lima EO, Quevedo J, Kapczinski F, Rosa AR. Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative and psychiatric disorders. *An Acad Bras Cienc*. 2015;87:1435-1449.

87. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, Devetten M, Jansen J, Herzig R, Schuster M, Monroy R, Uberti J. Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009;15:804-811.

88. Ringden O, Le Blanc K. Mesenchymal stem cells for treatment of acute and chronic graft-versus-host disease, tissue toxicity and hemorrhages. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2011;24:65-72.

89. Hashmi S, Ahmed M, Murad MH, Litzow MR, Adams RH, Ball LM, Prasad VK, Kebriaei P, Ringden O. Survival after mesenchymal stromal cell therapy in steroid-refractory acute graft-versus-host disease: systematic review and meta-analysis. *Lancet Haematol*. 2016;3:e45-52.

90. Caplan AI. Adult Mesenchymal Stem Cells: When, Where, and How. *Stem Cells Int*. 2015;2015:628767.

91. Aldonyte R, Tunaitis V, Surovas A, Suriakaite K, Jarmalaviciute A, Magnusson KE, Pivoriunas A. Effects of major human antiprotease alpha-1-antitrypsin on the motility and proliferation of stromal cells from human exfoliated deciduous teeth. *Regen Med*. 2010;5:633-643.

92. Tunaitis V, Borutinskaite V, Navakauskiene R, Treigyte G, Unguryte A, Aldonyte R, Magnusson KE, Pivoriunas A. Effects of different sera on adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011;5:733-746.
93. Jarmalaviciute A, Tunaitis V, Strainiene E, Aldonyte R, Ramanavicius A, Venalis A, Magnusson KE, Pivoriunas A. A New Experimental Model for Neuronal and Glial Differentiation Using Stem Cells Derived from Human Exfoliated Deciduous Teeth. *J Mol Neurosci.* 2013.
94. Jarmalaviciute A, Tunaitis V, Pivoraite U, Venalis A, Pivoriunas A. Exosomes from dental pulp stem cells rescue human dopaminergic neurons from 6-hydroxy-dopamine-induced apoptosis. *Cytotherapy.* 2015;17:932-939.
95. Pivoraite U, Jarmalaviciute A, Tunaitis V, Ramanauskaite G, Vaitkuviene A, Kaseta V, Biziuleviciene G, Venalis A, Pivoriunas A. Exosomes from Human Dental Pulp Stem Cells Suppress Carrageenan-Induced Acute Inflammation in Mice. *Inflammation.* 2015;38:1933-1941.
96. Denkovskij J, Rudys R, Bernotiene E, Minderis M, Bagdonas S, Kirdaite G. Cell surface markers and exogenously induced PpIX in synovial mesenchymal stem cells. *Cytometry A.* 2015.
97. Daniunaite K, Serenaite I, Misgirdaite R, Gordevicius J, Unguryte A, Fleury-Cappellesso S, Bernotiene E, Jarmalaite S. Epigenetic regulation of human adipose-derived stem cells differentiation. *Mol Cell Biochem.* 2015.
98. Savickiene J, Treigyte G, Baronaite S, Valiuliene G, Kaupinis A, Valius M, Arlauskiene A, Navakauskiene R. Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells from Second- and Third-Trimester Amniocentesis: Differentiation Potential, Molecular Signature, and Proteome Analysis. *Stem Cells Int.* 2015;2015:319238.
99. Vestergaard HT, D'Apote L, Schneider CK, Herberts C. The evolution of nonclinical regulatory science: advanced therapy medicinal products as a paradigm. *Mol Ther.* 2013;21:1644-1648.
100. Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. ISCN: an international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: Karger; 2013.
101. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000;25:25-29.

102. Gene Ontology Consortium: going forward. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:D1049-1056.
103. Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat Protoc.* 2013;8:1551-1566.
104. Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, Locatelli F, Roelofs H, Lewis I, Lanino E, Sundberg B, Bernardo ME, Remberger M, Dini G, Egeler RM, Bacigalupo A, Fibbe W, Ringden O. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet.* 2008;371:1579-1586.
105. Venkataramana NK, Kumar SK, Balaraju S, Radhakrishnan RC, Bansal A, Dixit A, Rao DK, Das M, Jan M, Gupta PK, Totey SM. Open-labeled study of unilateral autologous bone-marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in Parkinson's disease. *Transl Res.* 2010;155:62-70.
106. Lee H, Park JB, Lee S, Baek S, Kim H, Kim SJ. Intra-osseous injection of donor mesenchymal stem cell (MSC) into the bone marrow in living donor kidney transplantation; a pilot study. *J Transl Med.* 2013;11:96.
107. Fennema EM, Renard AJ, Leusink A, van Blitterswijk CA, de Boer J. The effect of bone marrow aspiration strategy on the yield and quality of human mesenchymal stem cells. *Acta Orthop.* 2009;80:618-621.
108. Jung S, Panchalingam KM, Rosenberg L, Behie LA. Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells in defined serum-free media. *Stem Cells Int.* 2012;2012:123030.
109. Cooper K, Viswanathan C. Establishment of a mesenchymal stem cell bank. *Stem Cells Int.* 2011;2011:905621.
110. Hjortholm N, Jaddini E, Halaburda K, Snarski E. Strategies of pain reduction during the bone marrow biopsy. *Ann Hematol.* 2013;92:145-149.
111. Horn P, Bork S, Diehlmann A, Walenda T, Eckstein V, Ho AD, Wagner W. Isolation of human mesenchymal stromal cells is more efficient by red blood cell lysis. *Cytotherapy.* 2008;10:676-685.
112. Otsuru S, Hofmann TJ, Olson TS, Dominici M, Horwitz EM. Improved isolation and expansion of bone marrow mesenchymal stromal cells using a novel marrow filter device. *Cytotherapy.* 2013;15:146-153.
113. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004;363:1439-1441.

114. Emad A, Drouin R. Evaluation of the impact of density gradient centrifugation on fetal cell loss during enrichment from maternal peripheral blood. *Prenat Diagn.* 2014;34:878-885.
115. Fekete N, Gadelorge M, Furst D, Maurer C, Dausend J, Fleury-Cappellesso S, Mailander V, Lotfi R, Ignatius A, Sensebe L, Bourin P, Schrezenmeier H, Rojewski MT. Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy.* 2012;14:540-554.
116. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE, Jr. The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest.* 2005;115:3348-3354.
117. Bain BJ. Morbidity associated with bone marrow aspiration and trephine biopsy - a review of UK data for 2004. *Haematologica.* 2006;91:1293-1294.
118. Horn P, Bokermann G, Cholewa D, Bork S, Walenda T, Koch C, Drescher W, Hutschenreuther G, Zenke M, Ho AD, Wagner W. Impact of individual platelet lysates on isolation and growth of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2010;12:888-898.
119. Sensebe L, Bourin P, Tarte K. Good manufacturing practices production of mesenchymal stem/stromal cells. *Hum Gene Ther.* 2011;22:19-26.
120. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011;12:126-131.
121. EMA. Reflection paper on stem cell-based medicinal products; 2011.
122. Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.* 2003;33:919-926.
123. Rich IN. Measurement of Hematopoietic Stem Cell Proliferation, Self-Renewal, and Expansion Potential. In: Rich IN, ed. *Stem Cell Protocols.* Vol. 1235; 2015:7-17.
124. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 2001;98:2396-2402.
125. Sensebe L. Beyond genetic stability of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* 2013;15:1307-1308.
126. Borgonovo T, Vaz IM, Senegaglia AC, Rebelatto CL, Brofman PR. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2014;36:202-207.

127. Hwang SM, See CJ, Choi J, Kim SY, Choi Q, Kim JA, Kwon J, Park SN, Im K, Oh IH, Lee DS. The application of an in situ karyotyping technique for mesenchymal stromal cells: a validation and comparison study with classical G-banding. *Exp Mol Med.* 2013;45:e68.
128. Liehr T, Pellestor F. Molecular Cytogenetics: The Standard FISH and PRINS Procedure. In: Liehr T, ed. *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) — Application Guide*: Springer Berlin Heidelberg; 2009:23-34.
129. Jones M, Varella-Garcia M, Skokan M, Bryce S, Schowinsky J, Peters R, Vang B, Brecheisen M, Startz T, Frank N, Nankervis B. Genetic stability of bone marrow-derived human mesenchymal stromal cells in the Quantum System. *Cytotherapy.* 2013;15:1323-1339.
130. Ikebe C, Suzuki K. Mesenchymal stem cells for regenerative therapy: optimization of cell preparation protocols. *Biomed Res Int.* 2014;2014:951512.
131. Penforis P, Pochampally R. Isolation and expansion of mesenchymal stem cells/multipotential stromal cells from human bone marrow. In: Vemuri M, Chase L, Rao M, eds. *Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications*. New York: Humana Press; 2011:11-21.
132. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol.* 2006;7:14.
133. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev.* 2006;5:91-116.
134. Dmitrieva RI, Minullina IR, Bilibina AA, Tarasova OV, Anisimov SV, Zaritskey AY. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell Cycle.* 2012;11:377-383.
135. Somasundaram I, Mishra R, Radhakrishnan H, Sankaran R, Garikipati VN, Marappagounder D. Human adult stem cells maintain a constant phenotype profile irrespective of their origin, Basal media, and long term cultures. *Stem Cells Int.* 2015;2015:146051.
136. Schallmoser K, Bartmann C, Rohde E, Bork S, Guelly C, Obenauf AC, Reinisch A, Horn P, Ho AD, Strunk D, Wagner W. Replicative senescence-associated gene expression changes in mesenchymal stromal cells are similar under different culture conditions. *Haematologica.* 2010;95:867-874.
137. Poloni A, Maurizi G, Babini L, Serrani F, Berardinelli E, Mancini S, Costantini B, Discepoli G, Leoni P. Human mesenchymal stem cells from chorionic villi and

amniotic fluid are not susceptible to transformation after extensive in vitro expansion. *Cell Transplant.* 2011;20:643-654.

138. Crespo-Diaz R, Behfar A, Butler GW, Padley DJ, Sarr MG, Bartunek J, Dietz AB, Terzic A. Platelet lysate consisting of a natural repair proteome supports human mesenchymal stem cell proliferation and chromosomal stability. *Cell Transplant.* 2011;20:797-811.

139. Wagner W, Bork S, Lepperdinger G, Joussen S, Ma N, Strunk D, Koch C. How to track cellular aging of mesenchymal stromal cells? *Aging (Albany NY).* 2010;2:224-230.

140. Laschober GT, Brunauer R, Jamnig A, Fehrer C, Greiderer B, Lepperdinger G. Leptin receptor/CD295 is upregulated on primary human mesenchymal stem cells of advancing biological age and distinctly marks the subpopulation of dying cells. *Exp Gerontol.* 2009;44:57-62.

141. Ballester M, Cordon R, Folch JM. DAG expression: high-throughput gene expression analysis of real-time PCR data using standard curves for relative quantification. *PLoS One.* 2013;8:e80385.

142. Lengner CJ, Welstead GG, Jaenisch R. The pluripotency regulator Oct4: a role in somatic stem cells? *Cell Cycle.* 2008;7:725-728.

143. Porcu M, Kleppe M, Gianfelici V, Geerdens E, De Keersmaecker K, Tartaglia M, Foa R, Soulier J, Cauwelier B, Uyttebroeck A, Macintyre E, Vandenberghe P, Asnafi V, Cools J. Mutation of the receptor tyrosine phosphatase PTPRC (CD45) in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2012;119:4476-4479.

144. Muinos-Lopez E, Rendal-Vazquez ME, Hermida-Gomez T, Fuentes-Boquete I, Diaz-Prado S, Blanco FJ. Cryopreservation effect on proliferative and chondrogenic potential of human chondrocytes isolated from superficial and deep cartilage. *Open Orthop J.* 2012;6:150-159.

145. Popov B, Petrov N. pRb-E2F signaling in life of mesenchymal stem cells: Cell cycle, cell fate, and cell differentiation. *Genes & Diseases.* 2014;1:174-187.

146. Zhang W, Qin Z, Zhang X, Xiao W. Roles of sequential ubiquitination of PCNA in DNA-damage tolerance. *FEBS Lett.* 2011;585:2786-2794.

147. Rockey DC, Weymouth N, Shi Z. Smooth muscle alpha actin (Acta2) and myofibroblast function during hepatic wound healing. *PLoS One.* 2013;8:e77166.

148. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci.* 2003;116:1827-1835.

149. Kinner B, Zaleskas JM, Spector M. Regulation of smooth muscle actin expression and contraction in adult human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2002;278:72-83.
150. Li SS, Ivanoff A, Bergstrom SE, Sandstrom A, Christensson B, van Nerven J, Holgersson J, Hauzenberger D, Arencibia I, Sundqvist KG. T lymphocyte expression of thrombospondin-1 and adhesion to extracellular matrix components. *Eur J Immunol.* 2002;32:1069-1079.
151. Gene N. THBS1 thrombospondin 1 [Homo sapiens (human)] (ed 7-6-2015).
152. Begin P, Tremblay K, Daley D, Lemire M, Claveau S, Salesse C, Kacel S, Montpetit A, Becker A, Chan-Yeung M, Kozyrskyj AL, Hudson TJ, Laprise C. Association of urokinase-type plasminogen activator with asthma and atopy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:1109-1116.
153. Irigoyen JP, Besser D, Nagamine Y. Cytoskeleton reorganization induces the urokinase-type plasminogen activator gene via the Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *J Biol Chem.* 1997;272:1904-1909.
154. Madeira A, da Silva CL, dos Santos F, Camafeita E, Cabral JM, Sa-Correia I. Human mesenchymal stem cell expression program upon extended ex-vivo cultivation, as revealed by 2-DE-based quantitative proteomics. *PLoS One.* 2012;7:e43523.
155. Yang KE, Kwon J, Rhim JH, Choi JS, Kim SI, Lee SH, Park J, Jang IS. Differential expression of extracellular matrix proteins in senescent and young human fibroblasts: a comparative proteomics and microarray study. *Mol Cells.* 2011;32:99-106.
156. Salama R, Sadaie M, Hoare M, Narita M. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev.* 2014;28:99-114.
157. Hume AJ, Kalejta RF. Regulation of the retinoblastoma proteins by the human herpesviruses. *Cell Div.* 2009;4:1.
158. Miura T. Identification of signaling pathways involved during differentiation. In: Lakshmi U, Chesnut JD, Thyagarajan B, eds. *Emerging Technology Platforms for Stem Cells.* Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2009:235-247.
159. Hong S, Paulson QX, Johnson DG. E2F1 and E2F3 activate ATM through distinct mechanisms to promote E1A-induced apoptosis. *Cell Cycle.* 2008;7:391-400.
160. Sylvestre Y, De Guire V, Querido E, Mukhopadhyay UK, Bourdeau V, Major F, Ferbeyre G, Chartrand P. An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem.* 2007;282:2135-2143.

161. Saavedra HI, Wu L, de Bruin A, Timmers C, Rosol TJ, Weinstein M, Robinson ML, Leone G. Specificity of E2F1, E2F2, and E2F3 in mediating phenotypes induced by loss of Rb. *Cell Growth Differ.* 2002;13:215-225.
162. Zirzow S, Ludtke TH, Brons JF, Petry M, Christoffels VM, Kispert A. Expression and requirement of T-box transcription factors Tbx2 and Tbx3 during secondary palate development in the mouse. *Dev Biol.* 2009;336:145-155.
163. Koniaras K, Cuddihy AR, Christopoulos H, Hogg A, O'Connell MJ. Inhibition of Chk1-dependent G2 DNA damage checkpoint radiosensitizes p53 mutant human cells. *Oncogene.* 2001;20:7453-7463.
164. Furusawa Y, Iizumi T, Fujiwara Y, Zhao QL, Tabuchi Y, Nomura T, Kondo T. Inhibition of checkpoint kinase 1 abrogates G2/M checkpoint activation and promotes apoptosis under heat stress. *Apoptosis.* 2012;17:102-112.
165. Kim MK, James J, Annunziata CM. Topotecan synergizes with CHEK1 (CHK1) inhibitor to induce apoptosis in ovarian cancer cells. *BMC Cancer.* 2015;15:196.
166. Franckhauser C, Mamaeva D, Heron-Milhavet L, Fernandez A, Lamb NJ. Distinct pools of cdc25C are phosphorylated on specific TP sites and differentially localized in human mitotic cells. *PLoS One.* 2010;5:e11798.
167. Mitra J, Enders GH. Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. *Oncogene.* 2004;23:3361-3367.
168. Zhang R, Zhu L, Zhang L, Xu A, Li Z, Xu Y, He P, Wu M, Wei F, Wang C. PTEN enhances G2/M arrest in etoposide-treated MCF7 cells through activation of the ATM pathway. *Oncol Rep.* 2016.
169. Magimaidas A, Hoffman B, Liebermann D. Abstract 2252: Gadd45b deficiency impairs G2/M cell cycle progression leading to premature senescence. *Cancer Research.* 2014;74:2252.
170. Clark EA, Kalomoiris S, Nolta JA, Fierro FA. Concise review: MicroRNA function in multipotent mesenchymal stromal cells. *Stem Cells.* 2014;32:1074-1082.
171. Borel F, Lacroix FB, Margolis RL. Prolonged arrest of mammalian cells at the G1/S boundary results in permanent S phase stasis. *J Cell Sci.* 2002;115:2829-2838.
172. Kong Y, Cui H, Ramkumar C, Zhang H. Regulation of senescence in cancer and aging. *J Aging Res.* 2011;2011:963172.
173. Velletri T, Xie N, Wang Y, Huang Y, Yang Q, Chen X, Chen Q, Shou P, Gan Y, Cao G, Melino G, Shi Y. P53 functional abnormality in mesenchymal stem cells promotes osteosarcoma development. *Cell Death Dis.* 2016;7:e2015.

174. Acosta JC, Gil J. Senescence: a new weapon for cancer therapy. *Trends Cell Biol.* 2012;22:211-219.
175. Bellayr IH, Catalano JG, Lababidi S, Yang AX, Lo Surdo JL, Bauer SR, Puri RK. Gene markers of cellular aging in human multipotent stromal cells in culture. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5:59.
176. Moreno-Moya JM, Vilella F, Simon C. MicroRNA: key gene expression regulators. *Fertil Steril.* 2014;101:1516-1523.
177. Barkholt L, Flory E, Jekerle V, Lucas-Samuel S, Ahnert P, Bisset L, Buscher D, Fibbe W, Foussat A, Kwa M, Lantz O, Maciulaitis R, Palomaki T, Schneider CK, Sensebe L, Tachdjian G, Tarte K, Tosca L, Salmikangas P. Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies--bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytotherapy.* 2013;15:753-759.
178. Kaplon J, Zheng L, Meissl K, Chaneton B, Selivanov VA, Mackay G, van der Burg SH, Verdegaal EM, Cascante M, Shlomi T, Gottlieb E, Peeper DS. A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence. *Nature.* 2013;498:109-112.
179. Heo JY, Jing K, Song KS, Seo KS, Park JH, Kim JS, Jung YJ, Hur GM, Jo DY, Kweon GR, Yoon WH, Lim K, Hwang BD, Jeon BH, Park JI. Downregulation of APE1/Ref-1 is involved in the senescence of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2009;27:1455-1462.
180. Nojima Y, Ito K, Ono H, Nakazato T, Bono H, Yokoyama T, Sato R, Suetsugu Y, Nakamura Y, Yamamoto K, Satoh J, Tabunoki H, Fugo H. Superoxide dismutases, SOD1 and SOD2, play a distinct role in the fat body during pupation in silkworm *Bombyx mori*. *PLoS One.* 2015;10:e0116007.
181. Kumamoto M, Nishiwaki T, Matsuo N, Kimura H, Matsushima K. Minimally cultured bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate fibrotic lung injury. *Eur Respir J.* 2009;34:740-748.
182. Klinkhammer BM, Kramann R, Mallau M, Makowska A, van Roeyen CR, Rong S, Buecher EB, Boor P, Kovacova K, Zok S, Denecke B, Stuetgen E, Otten S, Floege J, Kunter U. Mesenchymal stem cells from rats with chronic kidney disease exhibit premature senescence and loss of regenerative potential. *PLoS One.* 2014;9:e92115.
183. Choumerianou DM, Martimianaki G, Stiakaki E, Kalmanti L, Kalmanti M, Dimitriou H. Comparative study of stemness characteristics of mesenchymal cells from bone marrow of children and adults. *Cytotherapy.* 2010;12:881-887.

184. Jaganathan BG, Bonnet D. Human mesenchymal stromal cells senesce with exogenous OCT4. *Cytotherapy*. 2012;14:1054-1063.
185. Kim YW, Kim HJ, Bae SM, Kim YJ, Shin JC, Chun HJ, Rhie JW, Kim J, Kim H, Ahn WS. Time-course transcriptional profiling of human amniotic fluid-derived stem cells using microarray. *Cancer Res Treat*. 2010;42:82-94.
186. Peres J, Davis E, Mowla S, Bennett DC, Li JA, Wansleben S, Prince S. The Highly Homologous T-Box Transcription Factors, TBX2 and TBX3, Have Distinct Roles in the Oncogenic Process. *Genes Cancer*. 2010;1:272-282.
187. Duggal S, Brinchmann JE. Importance of serum source for the in vitro replicative senescence of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol*. 2011;226:2908-2915.
188. Jin Y, Kato T, Furu M, Nasu A, Kajita Y, Mitsui H, Ueda M, Aoyama T, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J. Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391:1471-1476.
189. Pattappa G, Thorpe SD, Jegard NC, Heywood HK, de Bruijn JD, Lee DA. Continuous and uninterrupted oxygen tension influences the colony formation and oxidative metabolism of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19:68-79.
190. Candini O, Spano C, Murgia A, Grisendi G, Veronesi E, Piccinno MS, Ferracin M, Negrini M, Giacobbi F, Bambi F, Horwitz EM, Conte P, Paolucci P, Dominici M. Mesenchymal progenitors aging highlights a miR-196 switch targeting HOXB7 as master regulator of proliferation and osteogenesis. *Stem Cells*. 2015;33:939-950.
191. Mateescu B, Batista L, Cardon M, Gruosso T, de Feraudy Y, Mariani O, Nicolas A, Meyniel JP, Cottu P, Sastre-Garau X, Mechta-Grigoriou F. miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response. *Nat Med*. 2011;17:1627-1635.
192. Cufi S, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Quirantes R, Segura-Carretero A, Micol V, Joven J, Bosch-Barrera J, Del Barco S, Martin-Castillo B, Vellon L, Menendez JA. Metformin lowers the threshold for stress-induced senescence: a role for the microRNA-200 family and miR-205. *Cell Cycle*. 2012;11:1235-1246.
193. Berenstein R, Blau O, Nogai A, Waechter M, Slonova E, Schmidt-Hieber M, Kunitz A, Pezzutto A, Doerken B, Blau IW. Multiple myeloma cells alter the senescence phenotype of bone marrow mesenchymal stromal cells under participation of the DLK1-DIO3 genomic region. *BMC Cancer*. 2015;15:68.

194. Jeyapalan Z, Deng Z, Shatseva T, Fang L, He C, Yang BB. Expression of CD44 3'-untranslated region regulates endogenous microRNA functions in tumorigenesis and angiogenesis. *Nucleic Acids Res.* 2011;39:3026-3041.
195. Sun Y, Shen S, Liu X, Tang H, Wang Z, Yu Z, Li X, Wu M. MiR-429 inhibits cells growth and invasion and regulates EMT-related marker genes by targeting Onecut2 in colorectal carcinoma. *Mol Cell Biochem.* 2014;390:19-30.
196. Gao H, Liu C. miR-429 represses cell proliferation and induces apoptosis in HBV-related HCC. *Biomed Pharmacother.* 2014;68:943-949.
197. Chang W, Lee CY, Park JH, Park MS, Maeng LS, Yoon CS, Lee MY, Hwang KC, Chung YA. Survival of hypoxic human mesenchymal stem cells is enhanced by a positive feedback loop involving miR-210 and hypoxia-inducible factor 1. *J Vet Sci.* 2013;14:69-76.
198. Taddei ML, Cavallini L, Comito G, Giannoni E, Folini M, Marini A, Gandellini P, Morandi A, Pintus G, Raspollini MR, Zaffaroni N, Chiarugi P. Senescent stroma promotes prostate cancer progression: the role of miR-210. *Mol Oncol.* 2014;8:1729-1746.
199. Kim JH, Park SG, Song SY, Kim JK, Sung JH. Reactive oxygen species-responsive miR-210 regulates proliferation and migration of adipose-derived stem cells via PTPN2. *Cell Death Dis.* 2013;4:e588.
200. Xu J, Huang Z, Lin L, Fu M, Gao Y, Shen Y, Zou Y, Sun A, Qian J, Ge J. miR-210 over-expression enhances mesenchymal stem cell survival in an oxidative stress environment through antioxidation and c-Met pathway activation. *Sci China Life Sci.* 2014;57:989-997.
201. Minayi N, Alizadeh S, Dargahi H, Soleimani M, Khatib ZK, Tayebi B, Mohammadian M, Alijani S, Karami F. The Effect of miR-210 Up-regulation on Proliferation and Survival of Mouse Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cell. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.* 2014;8:15-23.
202. Ragni E, Parazzi V, Crosti M, Moro M, Giordano R, Lazzari L. Diet composition transiently modulates proliferative and potency features of human cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;55:269-278.
203. Tome M, Lopez-Romero P, Albo C, Sepulveda JC, Fernandez-Gutierrez B, Dopazo A, Bernad A, Gonzalez MA. miR-335 orchestrates cell proliferation, migration and differentiation in human mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 2011;18:985-995.

204. Pandey AC, Semon JA, Kaushal D, O'Sullivan RP, Glowacki J, Gimble JM, Bunnell BA. MicroRNA profiling reveals age-dependent differential expression of nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase in adipose and bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2011;2:49.
205. Salvi A, Conde I, Abeni E, Arici B, Grossi I, Specchia C, Portolani N, Barlati S, De Petro G. Effects of miR-193a and sorafenib on hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer.* 2013;12:162.
206. Deng H, Lv L, Li Y, Zhang C, Meng F, Pu Y, Xiao J, Qian L, Zhao W, Liu Q, Zhang D, Wang Y, Zhang H, He Y, Zhu J. miR-193a-3p regulates the multi-drug resistance of bladder cancer by targeting the LOXL4 gene and the Oxidative Stress pathway. *Mol Cancer.* 2014;13:234.
207. Gao XN, Lin J, Li YH, Gao L, Wang XR, Wang W, Kang HY, Yan GT, Wang LL, Yu L. MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Oncogene.* 2011;30:3416-3428.
208. Georges SA, Biery MC, Kim SY, Schelter JM, Guo J, Chang AN, Jackson AL, Carleton MO, Linsley PS, Cleary MA, Chau BN. Coordinated regulation of cell cycle transcripts by p53-Inducible microRNAs, miR-192 and miR-215. *Cancer Res.* 2008;68:10105-10112.
209. Borgdorff V, Leonart ME, Bishop CL, Fessart D, Bergin AH, Overhoff MG, Beach DH. Multiple microRNAs rescue from Ras-induced senescence by inhibiting p21(Waf1/Cip1). *Oncogene.* 2010;29:2262-2271.
210. Xu J, Huang Z, Lin L, Fu M, Song Y, Shen Y, Ren D, Gao Y, Su Y, Zou Y, Chen Y, Zhang D, Hu W, Qian J, Ge J. miRNA-130b is required for the ERK/FOXM1 pathway activation-mediated protective effects of isosorbide dinitrate against mesenchymal stem cell senescence induced by high glucose. *Int J Mol Med.* 2015;35:59-71.
211. Jong HL, Mustafa MR, Vanhoutte PM, AbuBakar S, Wong PF. MicroRNA 299-3p modulates replicative senescence in endothelial cells. *Physiol Genomics.* 2013;45:256-267.
212. Nidadavolu LS, Niedernhofer LJ, Khan SA. Identification of microRNAs dysregulated in cellular senescence driven by endogenous genotoxic stress. *Aging (Albany NY).* 2013;5:460-473.
213. van Almen GC, Verhesen W, van Leeuwen RE, van de Vrie M, Eurlings C, Schellings MW, Swinnen M, Cleutjens JP, van Zandvoort MA, Heymans S, Schroen B. MicroRNA-18 and microRNA-19 regulate CTGF and TSP-1 expression in age-related heart failure. *Aging Cell.* 2011;10:769-779.

214. Kim SY, Lee YH, Bae YS. MiR-186, miR-216b, miR-337-3p, and miR-760 cooperatively induce cellular senescence by targeting alpha subunit of protein kinase CKII in human colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;429:173-179.
215. Ivanovska I, Ball AS, Diaz RL, Magnus JF, Kibukawa M, Schelter JM, Kobayashi SV, Lim L, Burchard J, Jackson AL, Linsley PS, Cleary MA. MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. *Mol Cell Biol.* 2008;28:2167-2174.
216. Harries LW. MicroRNAs as Mediators of the Ageing Process. *Genes (Basel).* 2014;5:656-670.
217. Yentrapalli R, Azimzadeh O, Kraemer A, Malinowsky K, Sarioglu H, Becker KF, Atkinson MJ, Moertl S, Tapio S. Quantitative and integrated proteome and microRNA analysis of endothelial replicative senescence. *J Proteomics.* 2015;126:12-23.
218. Li G, Luna C, Qiu J, Epstein DL, Gonzalez P. Alterations in microRNA expression in stress-induced cellular senescence. *Mech Ageing Dev.* 2009;130:731-741.
219. Smith-Vikos T, Slack FJ. MicroRNAs and their roles in aging. *J Cell Sci.* 2012;125:7-17.
220. Wu J, Lv Q, He J, Zhang H, Mei X, Cui K, Huang N, Xie W, Xu N, Zhang Y. MicroRNA-188 suppresses G1/S transition by targeting multiple cyclin/CDK complexes. *Cell Commun Signal.* 2014;12:66.
221. Yao G, Yin M, Lian J, Tian H, Liu L, Li X, Sun F. MicroRNA-224 is involved in transforming growth factor-beta-mediated mouse granulosa cell proliferation and granulosa cell function by targeting Smad4. *Mol Endocrinol.* 2010;24:540-551.
222. Olivieri F, Rippo MR, Monsurro V, Salvioli S, Capri M, Procopio AD, Franceschi C. MicroRNAs linking inflamm-aging, cellular senescence and cancer. *Ageing Res Rev.* 2013;12:1056-1068.
223. Hu Z, Klein JD, Mitch WE, Zhang L, Martinez I, Wang XH. MicroRNA-29 induces cellular senescence in aging muscle through multiple signaling pathways. *Aging (Albany NY).* 2014;6:160-175.
224. Dellago H, Preschitz-Kammerhofer B, Terlecki-Zaniewicz L, Schreiner C, Fortschegger K, Chang MW, Hackl M, Monteforte R, Kuhnel H, Schosserer M, Gruber F, Tschachler E, Scheideler M, Grillari-Voglauer R, Grillari J, Wieser M. High levels of oncomiR-21 contribute to the senescence-induced growth arrest in normal human cells and its knock-down increases the replicative lifespan. *Aging Cell.* 2013;12:446-458.

225. Yang CS, Rana TM. Learning the molecular mechanisms of the reprogramming factors: let's start from microRNAs. *Mol Biosyst.* 2013;9:10-17.
226. Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:849-864.
227. Provinciali M, Cardelli M, Marchegiani F, Pierpaoli E. Impact of cellular senescence in aging and cancer. *Curr Pharm Des.* 2013;19:1699-1709.
228. Gorospe M, Abdelmohsen K. MicroRegulators come of age in senescence. *Trends Genet.* 2011;27:233-241.
229. Marasa BS, Srikantan S, Masuda K, Abdelmohsen K, Kuwano Y, Yang X, Martindale JL, Rinker-Schaeffer CW, Gorospe M. Increased MKK4 abundance with replicative senescence is linked to the joint reduction of multiple microRNAs. *Sci Signal.* 2009;2:ra69.
230. Wang Y, Scheiber MN, Neumann C, Calin GA, Zhou D. MicroRNA regulation of ionizing radiation-induced premature senescence. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2011;81:839-848.
231. Zhou Y, Hu Y, Yang M, Jat P, Li K, Lombardo Y, Xiong D, Coombes RC, Raguz S, Yague E. The miR-106b~25 cluster promotes bypass of doxorubicin-induced senescence and increase in motility and invasion by targeting the E-cadherin transcriptional activator EP300. *Cell Death Differ.* 2014;21:462-474.
232. Feliciano A, Sanchez-Sendra B, Kondoh H, Lleonart ME. MicroRNAs Regulate Key Effector Pathways of Senescence. *J Aging Res.* 2011;2011:205378.
233. Grether-Beck S, Kuck F, Brenden H, Felsner I, Graffmann N, Schneider M, Lindecke A, Ezzahoini H, Weinhold S, Köhrer K, Urberg M, Marini A, Piekorz R, Krutmann J. Downregulation of miR-15b is associated with increased sirtuin 4 (SIRT4) expression in photoaging of human skin. 2014 Annual Meeting of the Society for Investigative Dermatology. Albuquerque Convention Center, Albuquerque, New Mexico: The Society for Investigative Dermatology, Inc; 2014:S114-S120.
234. Xia H, Qi Y, Ng SS, Chen X, Chen S, Fang M, Li D, Zhao Y, Ge R, Li G, Chen Y, He ML, Kung HF, Lai L, Lin MC. MicroRNA-15b regulates cell cycle progression by targeting cyclins in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;380:205-210.
235. Vasanthan P, Govindasamy V, Gnanasegaran N, Kunasekaran W, Musa S, Abu Kasim NH. Differential expression of basal microRNAs' patterns in human dental pulp stem cells. *J Cell Mol Med.* 2015;19:566-580.

236. Midgley AC, Bowen T, Phillips AO, Steadman R. MicroRNA-7 inhibition rescues age-associated loss of epidermal growth factor receptor and hyaluronan-dependent differentiation in fibroblasts. *Aging Cell*. 2014;13:235-244.
237. Chou YT, Lin HH, Lien YC, Wang YH, Hong CF, Kao YR, Lin SC, Chang YC, Lin SY, Chen SJ, Chen HC, Yeh SD, Wu CW. EGFR promotes lung tumorigenesis by activating miR-7 through a Ras/ERK/Myc pathway that targets the Ets2 transcriptional repressor ERF. *Cancer Res*. 2010;70:8822-8831.
238. Shi Y, Luo X, Li P, Tan J, Wang X, Xiang T, Ren G. miR-7-5p suppresses cell proliferation and induces apoptosis of breast cancer cells mainly by targeting REGgamma. *Cancer Lett*. 2015;358:27-36.
239. Wang Y, Liu J, Liu C, Naji A, Stoffers DA. MicroRNA-7 regulates the mTOR pathway and proliferation in adult pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2013;62:887-895.
240. Sanchez N, Gallagher M, Lao N, Gallagher C, Clarke C, Doolan P, Aherne S, Blanco A, Meleady P, Clynes M, Barron N. MiR-7 triggers cell cycle arrest at the G1/S transition by targeting multiple genes including Skp2 and Psme3. *PLoS One*. 2013;8:e65671.
241. Balakrishnan I, Yang X, Brown J, Ramakrishnan A, Torok-Storb B, Kabos P, Hesselberth JR, Pillai MM. Genome-wide analysis of miRNA-mRNA interactions in marrow stromal cells. *Stem Cells*. 2014;32:662-673.
242. Andre T, Meuleman N, Stamatopoulos B, De Bruyn C, Pieters K, Bron D, Lagneaux L. Evidences of early senescence in multiple myeloma bone marrow mesenchymal stromal cells. *PLoS One*. 2013;8:e59756.
243. Ferrer RA, Wobus M, List C, Wehner R, Schonefeldt C, Brocard B, Mohr B, Rauner M, Schmitz M, Stiehler M, Ehninger G, Hofbauer LC, Bornhauser M, Platzbecker U. Mesenchymal stromal cells from patients with myelodysplastic syndrome display distinct functional alterations that are modulated by lenalidomide. *Haematologica*. 2013;98:1677-1685.
244. Geyh S, Oz S, Cadeddu RP, Frobel J, Bruckner B, Kundgen A, Fenk R, Bruns I, Zilkens C, Hermsen D, Gattermann N, Kobbe G, Germing U, Lyko F, Haas R, Schroeder T. Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. *Leukemia*. 2013;27:1841-1851.
245. Ding W, Secreto C, Wu X, Braggio E, Zhang Y, Smoley SA, Shanafelt TD, Davila J, Call TG, Van Dyke DL, Jelinek DF, Kay NE. 3282 CLL Mesenchymal Stromal Cells Have Decreased Replicative Potential and Senescent Phenotype: Clinical and

Biologic Implications 56th ASH Annual Meeting and Exposition. San Francisco, CA; 2014.

246. Zhao Y, Wu D, Fei C, Guo J, Gu S, Zhu Y, Xu F, Zhang Z, Wu L, Li X, Chang C. Down-regulation of Dicer1 promotes cellular senescence and decreases the differentiation and stem cell-supporting capacities of mesenchymal stromal cells in patients with myelodysplastic syndrome. *Haematologica*. 2015;100:194-204.

247. Yang H, Sun J, Li Y, Duan WM, Bi J, Qu T. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells suppress proliferation of PHA-activated lymphocytes in vitro by inducing CD4(+)CD25(high)CD45RA(+) regulatory T cell production and modulating cytokine secretion. *Cell Immunol*. 2016;302:26-31.

248. Chimenti I, Gaetani R, Forte E, Angelini F, De Falco E, Zoccai GB, Messina E, Frati G, Giacomello A. Serum and supplement optimization for EU GMP-compliance in cardiospheres cell culture. *J Cell Mol Med*. 2014;18:624-634.

249. Chen G, Yue A, Ruan Z, Yin Y, Wang R, Ren Y, Zhu L. Monitoring the biology stability of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells during long-term culture in serum-free medium. *Cell Tissue Bank*. 2014;15:513-521.

250. Swamynathan P, Venugopal P, Kannan S, Thej C, Kolkundar U, Bhagwat S, Ta M, Majumdar AS, Balasubramanian S. Are serum-free and xeno-free culture conditions ideal for large scale clinical grade expansion of Wharton's jelly derived mesenchymal stem cells? A comparative study. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5:88.

251. Rani S, Ryan AE, Griffin MD, Ritter T. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Mol Ther*. 2015;23:812-823.

252. Zhang B, Yeo RW, Tan KH, Lim SK. Focus on Extracellular Vesicles: Therapeutic Potential of Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci*. 2016;17.

Duomenų bazės:

- Klinikinių tyrimų duomenų bazė www.clinicaltrials.gov. Paskutinį kartą naudotasi 2016 m. gegužės 5 d.
- Genų ontologijos konsorciumo projektas <http://geneontology.org/>. Naudotasi 2016 m. kovo 25 d.
- Genų raiškos duomenų saugykla Gene Expression Omnibus <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>. Duomenys įkelti 2015 m. gegužės 15 d., atnaujinti 2015 m. rugpjūčio 4 dieną.

Internetinės genų raiškos duomenų apdorojimo programos (Qiagen):

- RT² Profiler PCR Array Data Analysis v3.5 software <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>. Paskutinį kartą naudotasi 2015 m. gegužės 11 d.
- miScript miRNA PCR Array Data Analysis <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna/arrayanalysis.php>. Paskutinį kartą naudotasi 2015 m. gegužės 11 d.

Internetinės svetainės:

- The Globe and Mail. Straipsnis „Prochymal approval makes Canada first country to OK stem cell therapy“, paskelbtas 2012 m. gegužės 18 d., atnaujintas 2012 m. birželio 18 d. <http://www.theglobeandmail.com/>
- Oxford Reference. Sukurta 2007 m. sausio 1 d. Frazė „effector molecules“ ieškota 2016 m. kovo 21 d. <http://www.oxfordreference.com/view/10.1093/oi/authority.20110803095743474>

PADĖKA

Esu ypač dėkingas savo mokslinio darbo vadovei prof. dr. Gražinai Slapšytei ir konsultantei dr. Živilei Gudlevičienei už suteiktą galimybę dirbti laboratorijose ir įgyvendinti šio tyrimo idėją, nuolatinį palaikymą, pagalbą, diskusijas ir vertingas pastabas rengiant šią daktaro disertaciją.

Nuoširdžiai dėkoju visam Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Botanikos ir genetikos katedros kolektyvui ir Nacionalinio vėžio instituto Biobanko kolektyvui už dėmesingumą, suteiktą visokeriopą pagalbą ir draugišką darbo aplinką.

Atskirai dėkoju kitiems bendradarbiams už produktyvų bendradarbiavimą: med. dr. Jelenai Rascon už kaulų čiulpų mėginių surinkimą, Jaroslav Denkovskij ir Jan Krasko už tėkmės citometrijos analizę, dr. Marcin Jurga už šiltą priėmimą stažuotis įmonėje *The Cell Factory* ir virkštelės audinio ląstelių mėginius, Deimantei Ūsaitei už mokymus kaip dirbti su kiekybinės PGR gardelėmis, Tatjanai Serapinienei už statistikos konsultacijas ir Gražinai Pruskuvienei už lietuvių kalbos redagavimą.

Dėkoju visiems donorams, kurių kaulų čiulpų ir virkštelės audinio mėginiai buvo panaudoti šiame tyrime.

Esu labai dėkingas savo artimiesiems ir draugams už supratimą ir nuolatinį palaikymą.