



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Јасмин С. Нурковић

**УТИЦАЈ ЛАСЕРА НИСКЕ СНАГЕ И
ЕЛЕКТРОМАГНЕТНОГ ПОЉА НА МОРФОЛОГИЈУ,
ПРОЛИФЕРАЦИЈУ, ДИФЕРЕНЦИЈАЦИЈУ И СТАРЕЊЕ
ХУМАНИХ МЕЗЕНХИМАЛНИХ МАТИЧНИХ ЋЕЛИЈА
ИЗОЛОВАНИХ ИЗ МАСНОГ ТКИВА**

Радна верзија докторске дисертације

Крагујевац, 2018.



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES

Jasmin S. Nurković

**THE EFFECTS OF LOW LEVEL LASER AND
ELECTROMAGNETIC FIELD ON MORPHOLOGY,
PROLIFERATION, DIFFERENTIATION AND AGING OF
HUMAN ADIPOSE TISSUE-DERIVED MESENCHYMAL
STEM CELLS**

PhD thesis Draft

Kragujevac, 2018.

ЗАХВАЛНИЦА

менторском тиму:

проф. др Зани Долићанин,
проф. др Владиславу Воларевићу,
проф. др Небојши Арсенијевићу и
проф. др Миодрагу Стојковићу

породици,

Господару Свевишњем.

Докторску дисертацију посвећујем својој деци, **Омеру и Зејни.**

САЖЕТАК

Последњих неколико година откривено је да ласер ниске снаге (енгл. *Low Level Laser*, LLL) и електромагнетно поље (енгл. *Electromagnetic Field*, EMF) утичу на бројне биолошке процесе, раст и пролиферацију ћелија, а нарочито на матичне ћелије. Циљ ове студије био је испитивање ефеката LLL-а и EMF-а на карактеристике и потенцијал хуманих мезенхималних матичних ћелија из масног ткива (енгл. *human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells*, hAT-MSCs) и на њихово прихватање након евентуалне терапијске апликације. hAT-MSCs су изоловане из масног ткива 12 особа старости 18-65 година. LLL третман се примењивао током 7 дана, једном дневно у различитом трајању, у неколико различитих доза од 1 J/cm^2 , 3 J/cm^2 , 5 J/cm^2 and 10 J/cm^2 , са таласном дужином од 808 nm, снагом од 200 mW и густином енергије од 0.2 W/cm^2 . EMF третман се, такође, примењивао у трајању од 7 дана, једном дневно у различитом трајању, преко магнетних јастучића, фреквенције од 50 Hz и различитим интензитетом од 1 mT, 3 mT, 5 mT и 10 mT. Контролна група ћелија култивисана је у истим условима, али без третмана физикалним агенсима. Седам дана након третмана утврђене су појединачне оптималне дозе LLL-а и EMF-а и испитана је вијабилност, морфологија, пролиферација, диференцијација, старење и оксидативни стрес третираних ћелија. Резултати су показали да је након 7 дана број hAT-MSCs третираних EMF-ом био знатно већи од броја контролних, нетретираних ћелија, hAT-MSCs третиране LLL-ом су биле бројније од оних третираних EMF-ом, а да су hAT-MSCs које су стимулисане комбиновано LLL-ом и EMF-ом биле најбројније. LLL и/или EMF третман није значајно утицао на вијабилност третираних ћелија. Исти позитивни ефекти су регистровани и када се испитала диференцијација. LLL и/или EMF третман није утицао на старење, нити је повећао оксидативни стрес ћелија. Такође су примећене промене у морфологији ћелија у смислу повећања површине ћелија и фракталне димензије у групама које су третиране EMF-ом и комбинацијом EMF-а и LLL-а. У закључку, LLL и/или EMF третман је убрзао пролиферацију и побољшао диференцијацију hAT-MSCs, без угрожавања њихове одрживости, без утицаја на старење и оксидативни стрес, те представља терапијски потенцијал у ћелијском инжењерингу.

ABSTRACT

In recent years, electromagnetic field (EMF) and low-level laser (LLL) have been found to affect various biological processes, the growth and proliferation of cells, and especially that of stem cells. The aim of this study was to investigate the effects of EMF and LLL on the characteristics and abilities of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (hATMSCs) and thus to examine the impact of these therapeutic physical modalities on stem cell engraftment. hAT-MSCs were isolated from subcutaneous adipose tissue of 12 persons ranging in age from 18 to 65 years. LLL was applied also for 7 days, for varying periods of time, at different radiation energies of 1 J/cm², 3 J/cm², 5 J/cm² and 10 J/cm², with a wavelength of 808 nm, power output of 200 mW, and power density of 0.2 W/cm². EMF was applied for a period of 7 days, once a day for varying periods of time, via a magnetic cushion surface at a frequency of 50 Hz and an different intensity of 1 mT, 3 mT, 5 mT and 10 mT. Nonexposed cells (control) were cultivated under the same culture conditions. Seven days after treatment, optimum doses of LLL and EMF are determined, and the cells were examined for cell viability, morphology, proliferation, differentiation, aging and oxidative stress. We found that after 7 days, the number of EMF-treated hATMSCs was significantly higher than the number of the untreated cells, LLL-treated hAT-MSCs were more numerous than EMF-treated cells, and hAT-MSCs that were treated with the combination of EMF and LLL were the most numerous. EMF and/or LLL treatment did not significantly affect hAT-MSC viability by itself. The same positive effects were registered also when differentiation was examined. LLL and/or EMF treatment did not affect aging and oxidative stress of hAT-MSCs. Changes in cell morphology were also observed, in terms of an increase in cell surface area and fractal dimension in hAT-MSCs treated with EMF and the combination of EMF and LLL. In conclusion, LLL and/or EMF treatment accelerated the proliferation and enhance differentiation of hAT-MSCs without compromising their viability, without affecting aging and oxidative stress, and therefore, they may be used in stem cell tissue engineering.

СКРАЋЕНИЦЕ

LLL	<i>Low Level Laser</i>
EMF	<i>Electromagnetic Field</i>
MSCs	<i>Mesenchymal Stem Cells</i>
WALT	<i>World Assotiation For Laser Therapy</i>
ESCs	<i>Embrionic Stem Cells</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
Thy-1	<i>Thymocyte Differentiation Antigen 1</i>
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
STRO1	<i>Stromal Precursor Antigen-1</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule-1</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
IGFR	<i>Insulin-Like Growth Factor Receptor</i>
NGFR	<i>Neural Growth Factor Receptor</i>
PDGFR	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
BM-MSCs	<i>Bone Marrow Mesenchimal Stem Cells</i>
AT-MSCs	<i>Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells</i>
DP-MSCs	<i>Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells</i>
СВФ	Стромална Васкуларна Фракција
UC-MSCs	<i>Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
α-DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
CFU-F	<i>Colony Forming Units – Fibroblast</i>
iPSC	<i>Induced Pluripotent Stem Cells</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
IFN-γ	<i>Interferon-Gama</i>
IL-10	<i>Interleukin-10</i>
NOD/SCID	<i>Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency</i>
BUNDW	<i>Bone Marow Donor Worldwide</i>

WMDA	<i>World Marrow Donor Association</i>
HLA	<i>Humal Leukocyte Antigens</i>
PDX1	<i>Pancreatic And Duodenal Homeobox 1</i>
NKX6-1	<i>Homeobox Protein Nkx-6.1</i>
MAFA	<i>Musculoaponeurotic Fibrosarcoma Oncogene Homolog A</i>
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
EDSS	<i>Expanded Disability Status Scele</i>
MELD	<i>Mayo End-Stage Liver Disease</i>
IL-1Ra	<i>Interleukin-1 Receptor Antagonist</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
HSA	<i>Human Serum Albumins</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
PDT	<i>Population Doubling Time</i>
ГАГ	<i>Гликозаминогликани</i>
GaAIs	<i>Галијум-Алуминијум-Арсенидна</i>
SA-β-Gal	<i>Senescence-Associated B-Galactosidase</i>
NBT	<i>Nitroblue Tetrazolium</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
GSH	<i>Glutathione</i>
GSSG	<i>Glutathione Disulfide</i>
ФД	<i>Фрактална Димензија</i>
SD	<i>Standard Deviation</i>
FGF2	<i>Fibroblast Growth Factors 2</i>
rAT-MSCs	<i>Rat Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells</i>

САДРЖАЈ

1. УВОД	1
1.1 Регенеративна рехабилитација	1
1.2 Ласер као физикални агенс	3
1.2.1 Физичке карактеристике ласера	4
1.3 Ласер ниске снаге	6
1.3.1 Биофизичко дејство LLL	6
1.3.2 Биохемијско дејство LLL	6
1.3.3 Технике примене LLL	7
1.3.4 Дозирање LLL	7
1.3.5 Заштитне мере при примени LLL	8
1.4 Електромагнетно поље	8
1.4.1 Биофизичко дејство EMF	9
1.4.2 Биохемијско дејство EMF	11
1.4.3 Дозирање EMF	12
1.5 Матичне ћелије	13
1.5.1 Дефиниција и класификација матичних ћелија	14
1.5.2 Изолација MSCs	18
1.5.3 Култивација MSCs	19
1.5.4 Диференцијација MSCs	20
1.5.5 MSCs као имуномодулатори	21
1.5.6 Могућности примене MSCs	23
1.5.7 Ограничења у примени MSCs	28
2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА	31
3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	32
3.1 Врста студије	32
3.2 Узимање узорака хуманог масног ткива	32
3.3 Дигестија масног ткива	32
3.4 Прање ћелија	33

3.5 Бројање и култивација ћелија	33
3.6 Одређивање вијабилности и пролиферационе кинетике ћелија	34
3.7 Одређивање фенотипа добијених ћелија	34
3.8 Диференцијација ћелија <i>in vitro</i>	35
3.9 Узорковање hAT-MSCs	36
3.10 Третман hAT-MSCs LLL-ом	37
3.11 Третман hAT-MSCs EMF-ом	37
3.12 Заједнички третман hAT-MSCs LLL-ом и EMF-ом	37
3.13 Одређивање активности β -галактозидазе	38
3.14 Оксидативни стрес и антиоксидативни капацитет третираних hAT-MSCs	38
3.14.1 NBT assay	39
3.14.2 Одређивање концентрације хидроген пероксида (H_2O_2) и нитрита (NO^2^-)	39
3.14.3 Одређивање концентрације редукованог (GSH) и оксидованог глутатиона (GSSG)	39
3.15 Фрактална анализа	40
3.15.1 Добијање и графичка обрада фотографија третираних hAT-MSC	40
3.15.2 Фрактална анализа попуњавања простора и величине третираних hAT-MSCs	41
3.16 Статистичка обрада података	42
4. РЕЗУЛТАТИ	43
4.1 Физикални преглед пацијената, донора масног ткива	43
4.2 Карактеристике изолованих hAT-MSCs	44
4.2.1 Број и пролиферациона кинетика изолованих ћелија	44
4.2.2 Морфологија изолованих ћелија	46
4.2.3 Имунофенотипизација добијених ћелија	47
4.2.4 Диференцијација добијених ћелија	48
4.2.4.1 Адипогена диференцијација	48
4.2.4.2 Остеогена диференцијација	49
4.2.4.3 Хондрогена диференцијација	50
4.3 LLL у дози од $3 J/cm^2$ и EMF у дози од 3 mT најуспешније стимулишу пролиферацију третираних ћелија	51
4.4 LLL у дози од $3 J/cm^2$ и EMF у дози од 3 mT најуспешније стимулишу	54

диференцијацију третираних ћелија	
4.5 Комбиновани третман изолованих hAT-MSCs LLL-ом и EMF-ом побољшава пролиферацију третираних ћелија	58
4.6 Комбиновани третман изолованих hAT-MSCs LLL-ом и EMF-ом побољшава диференцијацију третираних ћелија	60
4.7 Појединачни и комбиновани LLL и EMF третман изолованих hAT-MSCs LLL није утицао на старење третираних ћелија	62
4.8. Појединачни и комбиновани LLL и EMF третман изолованих hAT-MSCs LLL није утицао на оксидативни стрес третираних ћелија	64
4.9 Комбиновани LLL и EMF третман мења фракталну димензију и величину третираних hAT-MSCs	65
5. ДИСКУСИЈА	66
5.1 Изоловане ћелије показале су добар пролиферативни капацитет и фибробластоидне морфолошке карактеристике	66
5.2 Изоловане ћелије експримирале су маркере за MSCs	67
5.3 Изоловане ћелије поседовале су способност трилинеарне диференцијације	67
5.4 Третман добијених hAT-MSCs LLL-ом и EMF-ом побољшао је пролиферацију и диференцијацију, без утицаја на вијабилност ћелија	69
5.5 hAT-MSCs након третмана LLL-ом и EMF-ом нису брже старале	73
5.6 Третман добијених hAT-MSCs LLL-ом и EMF-ом не утиче на оксидативни стрес, нити мења активност ензима антиоксидативне заштите	74
5.7 hAT-MSCs након третмана LLL-ом и EMF-ом су се значајно морфолошки мењале	74
6. ЗАКЉУЧАК	78
7. РЕФЕРЕНЦЕ	79

УВОД

Главни циљ овог истраживања је испитивање улоге и значаја два терапијска физикална модалитета која се често користе у клиничкој пракси, ласера ниске снаге (енгл. *Low level laser*, LLL) и електромагнетног поља (енгл. *Electromagnetic field*, EMF), на морфологију, пролиферацију, диференцијацију и старење хуманих мезенхималних матичних ћелија (енгл. *Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) изолованих из масног ткива. Тиме се жели дати научни допринос у бољем разумевању дејства ова два физикална агенса и побољшању карактеристика и потентности MSCs ради успешније клиничке примене. Због тога су у уводном делу објашњене основе нове области, регенеративне рехабилитације, биофизичка и биохемијска дејства ласера ниске снаге и електромагнетног поља, карактеристике MSCs, са посебним освртом на могућности и ограничења у примени ових ћелија.

1.1. Регенеративна рехабилитација

Регенеративна медицина је медицинска област која комбинује знања, технике и вештине из молекулске и ћелијске биологије, хемије, клиничке медицине, биомедицинског инжењеринга и науке о материјалима, са циљем да поправи и обнови функцију органа која је изгубљена због урођених аномалија, оштећења, болести и старости (1-5). Четири главна приступа регенеративне медицине су: ћелијска терапија, генска терапија, трансплантација и ткивни инжењеринг (1, 3, 5). Претходна експериментална и клиничка истраживања показала су ефикасност и сигурност ових процедура (2-4).

Да би постали потпуно функционални и витални, трансплантирани или лечени органи, ткива и ћелије, пролазе читав низ адаптивних процеса и прилагођавају се хомеостазу која влада унутар тела (2, 6, 7). У овом процесу рехабилитација је од велике важности, те се регенеративна медицина и рехабилитација међусобно допуњују због успешнијег планирања и ефикаснијег лечења пацијената (Схема 1). Последњих година принципи ове две области обједињу се у нову медицинску област – регенеративну рехабилитацију (1, 8). Регенеративна рехабилитација први пут је формализована на Колумбија

Универзитету у Њујорку у Сједињеним Америчким Државама (енгл. *New York's Columbia University*; <http://www.cumc.columbia.edu/rehab>), 2014. године, под руководством др *Joel Stein*, са циљем да повеже Департман за рехабилитацију са више од 100 лабораторија за матичне ћелије (8). Америчка асоцијација за физикалну терапију дефинисала је регенеративну рехабилитацију као интеграцију принципа и приступа рехабилитације и регенеративне медицине са главним циљем проналаска нових и ефикасних метода за обнављање и потпуни опоравак функције ткива (1, 8, 9). Убрзо су и на другим америчким клиникама и универзитетима формиран центри и институти који обједињују рехабилитацију и регенеративну медицину: *Mayo Clinic Center for Regenerative Medicine*, *McGowan Institute for Regenerative Medicine of University of Pittsburgh* и *University of Washington's Institute for Stem Cell and Regenerative Medicine (ISCRM)* (8). У Европи, такође, постаје актуелна научна и клиничка сарадња у овим областима (10, 11).

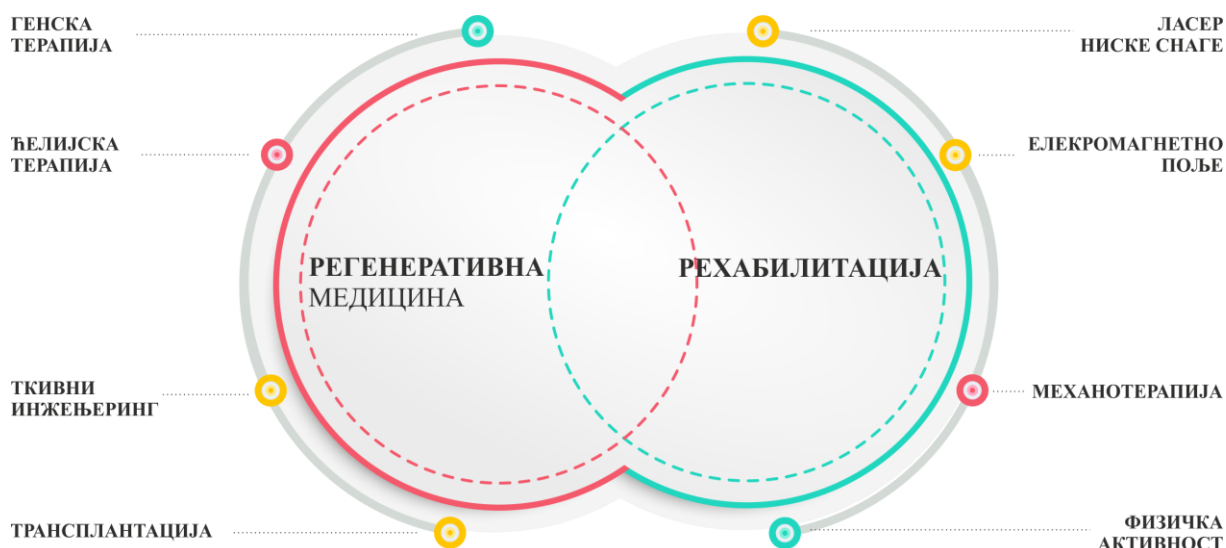


Схема 1. Повезаност регенеративне медицине и рехабилитације

Матичне ћелије су неспецијализоване ћелије организма које имају способност самообнављања и диференцирања у ћелије сва три клицина листа (2, 12). Оне имају важну улогу у ембрионалном развићу и органогенези (ембрионалне и феталне матичне ћелије), као и у хомеостази и регенерацији ткива (адултне матичне ћелије) (2, 12-15). MSCs су адултне матичне ћелије које се, због својих предности у изолацији и имунској толеранцији, најчешће користе у експерименталним и клиничким студијама (1-3, 16, 17). Масно ткиво је један од најлакше доступних извора ових ћелија (13, 18-20).

Иако се раније сматрало да матичне ћелије, а међу њима нарочито MSCs немају недостатке, новији научни подаци, укључујући и наше (21-23) показују да слабо прихватање (енгл. *poor engraftment*), кратко преживљавање и старење MSCs чине главна ограничења у клиничкој примени ових ћелија. Због тога се улажу велики напори како би примена MSCs била што ефикаснија. Осим хемијских фактора (фактори раста, хормони и цитокини) за које се зна да могу утицати на морфологију, раст, пролиферацију и диференцијацију матичних ћелија (24-27), све већи значај имају физички фактори у побољшању енграфтмента ових ћелија.

До данас су објављени резултати који показују да LLL и EMF, као терапијски физикални модалитети, утичу на различите биолошке процесе и доприносе оздрављењу (28-30). Међутим, њихово терапијско дејство још увек није потпуно разјашњено, а заједнички утицај ових агенаса на MSCs уопште није познат. Отуда идеја да се детаљнијим истраживањем дејства физичких фактора на MSCs, примарно LLL-а и EMF-а, дође до података који би употпунили знање о поменутиим физикалним агенсима и евентуално поставили основу за третман MSCs пре примене и пацијента након трансплантације ових ћелија, ради бољег енграфтмента.

1.2. Ласер као физикални агенс

Ласеротерапија се последњих година интензивно користи у клиничкој пракси.

Ласер означава усмерени сноп монохроматске кохерентне светлости, која може бити инфрацрвена, видљива или ултраљубичаста. Назив ласер представља скраћеницу од почетних слова енглеских речи *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, које значе светлост појачана стимулисаном емисијом зрачења. До скоро се мислило да овај процес стимулације емисије зрачења не постоји у природи, али данас се зна да деловање ултраљубичасте и видљиве светлости на неорганске и органске супстанце узрокује секундарну емисију светлости, тј. фотолуминисценцију у природним условима (31-35).

Још је Алберт Ајнштајн (*Albert Einstein*) почетком прошлог века имао идеју о стимулисаном зрачењу, али су тек 40-ак година касније руски научници Басов (*Никола́й Генна́диевич Ба́сов*) и Прохоров (*Алекса́ндр Миха́йлович Про́хоров*) и амерички научник Товнес (*Charles H. Townes*) са својим тимом, независно једни од других, конструисали

први квантни генератор електромагнетног зрачења и због тога, 1964. године, добили Нобелову награду за област физике (Слика 2) (36). Први ласерски уређај конструисао је Маиман (*Theodore Harold Maiman*) 1960. године, а убрзо су направљени и хелијум-неонски и полупроводнички ласер. У литератури се наводи да се ласер убраја у највећа научна открића у XX веку (31, 37-40).

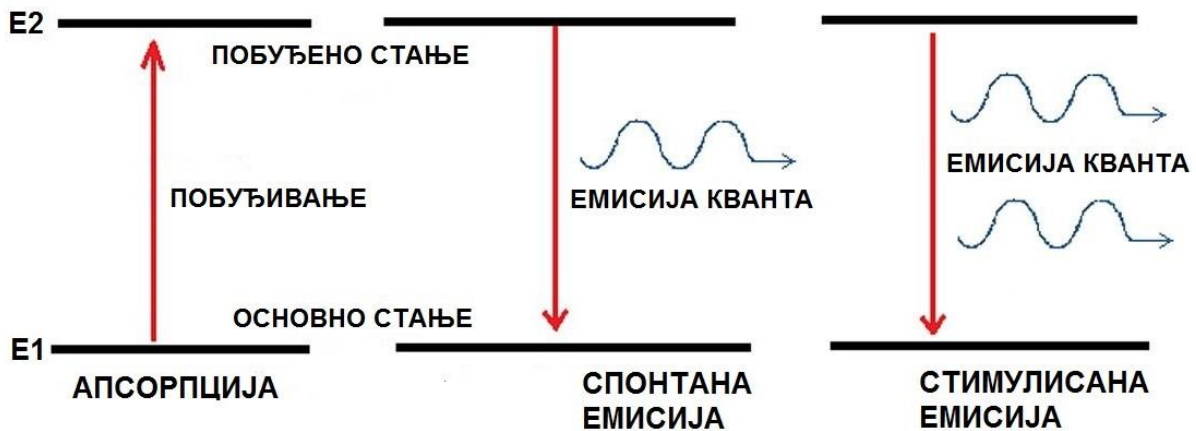


Слика 2. Добитници Нобелове награде за област физике 1964. године за достигнуће конструкције првог микроталасног квантног генератора: *Charles H. Townes, Николáй Генна́диевич Ба́сов и Алекса́ндр Миха́йлович Про́хоров*

1.2.1. Физичке карактеристике ласера

Ласерска светлост добија се из атома, довођењем енергије из спољашњег извора, при чему јони и молекули прелазе из стања ниже у стање више енергије. Тај процес се назива побуђивање, а то ново, „побуђено“ стање није дуго одрживо и стабилно, траје свега 10^{-7} до 10^{-9} секунди, те се електрони враћају на полазне путање, а квантни системи прелазе на нижи, основни енергијски ниво, при чему се ослобађа светлосна енергија (41-43). Та емисија кванта зрачења може бити спонтата или стимулисана. Спонтаном емисијом настаје обична, некохерентна, неусмерена и полихроматска светлост, коју чине зраци разних таласних дужина и смерова кретања. Извори такве светлости су Сунце, сијалице и кварцне светиљке. Стимулисано зрачење настаје тако што упадни, стимулациони фотони при судару са побуђеним честицама не бивају апсорбовани, већ ланчаном реакцијом изазивају умножавање фотона у виду „лавине“ (Слика 3). При томе, сви емитовани фотони имају исту таласну дужину, фазу и смер кретања, па је

тако добијена светлост монохроматска, кохерентна и усмерена и концентрише велику енергију (31, 44, 45).



Слика 3. Емисија кванта зрачења и настајање ласерске светлости

Делови ласера су активно средство, ласерска пумпа и резонаторска комора. Активно средство служи за умножавање фотона. Ласерска пумпа је извор енергије за побуђивање, а помоћу резонатора се продужава пут емитованих фотона и њихово дејство на активно средство (32-35).

У односу на агрегатно стање активног средства, ласери могу бити чврсти, течни и гасни, а према начину емисије континуирани и импулсни. Најпознатији чврсти ласер је рубински ласер, у коме је активно средство хром. У ову групу спадају и полупроводнички ласери, као што су галијум-арсенидни и галијум-алуминијум-арсенидни ласери. Од гасних ласера најчешће се у медицини користи хелијум-неонски, аргонски и угљен-диоксидни, а течни ласери су са раствореном органском или неорганском бојом (31, 34, 35, 45-47).

У односу на снагу коју емитују, ласери који се користе у медицини се могу поделити на ласере ниске и ласере високе снаге. Ласери ниске снаге су хелијум-неонски, галијум-арсенидни и галијум-алуминијум-арсенидни и примењују се у физикалној медицини. Ласери високе снаге су угљен-диоксидни и аргонски ласер и они се користе у хирургији, офталмологији, дерматологији и другим гранама медицине.

Сонде које се користе у физикалној медицини могу бити појединачне – тачкасте (површине 0,5-1 cm²) или групне – *cluster* (површине 10-20 cm²) (31, 34, 35, 48-50).

1.3. Ласери ниске снаге

Ласери излазне снаге до 500 mW током примене не изазивају осећај загревања у зраченом ткиву и називају се ласери ниске снаге (енгл. *Low level laser*, LLL). Они производе енергију ниске густине (која се израчунава као однос снаге и површине ласерске сонде и изражава се у W/cm²). У литератури се среће још неколико назива: ласери малог интензитета, ласери ниског нивоа и ласери мале снаге (31-33).

1.3.1. Биофизичко дејство LLL

Ефекат LLL настаје апсорпцијом у површинским ткивима, и то у структурама које се зову хромофоре (меланин, хемоглобин, миоглобин, родопсин, цитохроми и протеини смештене у ћелијској мембрани). Директна пенетрација износи 1-2 цм, а индиректна чак и до 5 цм (34, 35, 44).

1.3.2. Биохемијско дејство LLL

Основни механизам дејства LLL заснива се на фотобиолошкој реакцији са живим ткивом, тј. фотобиомодулацији. Овај процес одвија се на ћелијском и субћелијском нивоу, а чине га два супротна процеса: фотобиостимулација и фотобиоинхибиција. Оба процеса одвијају се по Арнт-Шулцовом (*Arndt-Schultz*) закону: ниске дозе изазивају фотобиостимулацију, а високе дозе фотобиоинхибицију (31, 51, 52). Апсорбовани зраци директно активирају ензиме и убрзавају метаболичке процесе. У ћелијама се повећава синтеза аденозин-трифосфата, који је главни енергијски извор ћелија, а у ћелијској мембрани активирају се јони калцијума. Обе ове реакције су од кључног значаја за успостављање ткивне хомеостазе и зарастање ткива. Оне иницирају синтезу дезоксирибонуклеинске и рибонуклеинске киселине, при чему се поспешује митоза и пролиферација макрофага и фибробласта и продукција колагена. Ласерски зраци изазивају вазодилатацију, убрзавају микроциркулацију, повећавају оксигенацију, мењају рН вредност и побољшавају нутрицију, утичући на тај начин на зарастање ткива (32-35, 51-53).

Ласерски зраци имају аналгетски ефекат тако што смањују брзину проводљивости сензорних влакана на месту и дистално од места примене, изазивају хиперполаризацију мембране нервних ћелија и подижу праг бола, смањују ниво простагландина E_2 , хистамина и интерлеукина и повећавају ниво серотонина и ендогених опиоида (31, 54-56). Ткива која су изложена хипоксији из било ког разлога (инфламација, повреда) много су подложнија деловању ласера него здрава ткива. Осим тога, под дејством апсорбоване енергије појачава се активност ензима антиоксидативне заштите (57).

1.3.3. Технике примене LLL

Ласери се примењују на два начина: контактано и неконтактано. Контактна техника подразумева примену ласерских снопова посредством ласерске сонде која се директно поставља на третирану површину и држи довољно чврсто како би се смањила рефлексија и дивергенција ласерског снопа и омогућила максимална пенетрација. Овом техником се третирају „тригер“ тачке, које на палпацију реагују локалним и рефереисаним (удаљеним) болом. Неконтактном техником се зраче отворене ране, а ова техника се примењује и када пацијент не може да поднесе притисак сонде на третирано подручје (32, 58-60).

1.3.4. Дозирање LLL

Основни параметри дозирања ласерског зрачења дати су у табели 1 (31, 32).

Табела 1. Основни параметри дозирања ласерског зрачења

Параметри дозирања ласерског зрачења	Јединица
Излазна снага	вати (W)
Површина ласерског снопа	центриметри квадратни (cm^2)
Густина снаге	вати по центриметру квадратном (W/cm^2)
Трајање зрачења	секунде (s)
Енергија зрачења	цули (J)
Густина енергије	цули по центриметру квадратном (J/cm^2)

Густина енергије унапред се одређује на основу патолошког поремећаја и циља који се жели постићи. Нови, софистицирани уређаји аутоматски израчунавају и на дисплеју приказују време потребно за зрачење на основу одабране густине енергије.

За дозу зрачења традиционално се узима густина енергије изражена у џулима по центриметру квадратном (J/cm^2). Још увек међу научницима и клиничарима не постоји консензус о оптималној појединачној терапијској дози, већ она варира од 0,5 до 10 J/cm^2 . У клиничкој пракси, акутна стања и површинска ткива захтевају мање дозе, а хронична стања и дубља ткива – веће (61, 62).

Светско удружење за лечење ласером (*World Assotiation for Laser Therapy – WALT*) препоручило је 2006. године да се за дозу зрачења узима енергија изражена у џулима по једној тачки (енгл. *J/point*), јер је то прецизније у односу на J/cm^2 (63).

1.3.5. Заштитне мере при примени *LLL*

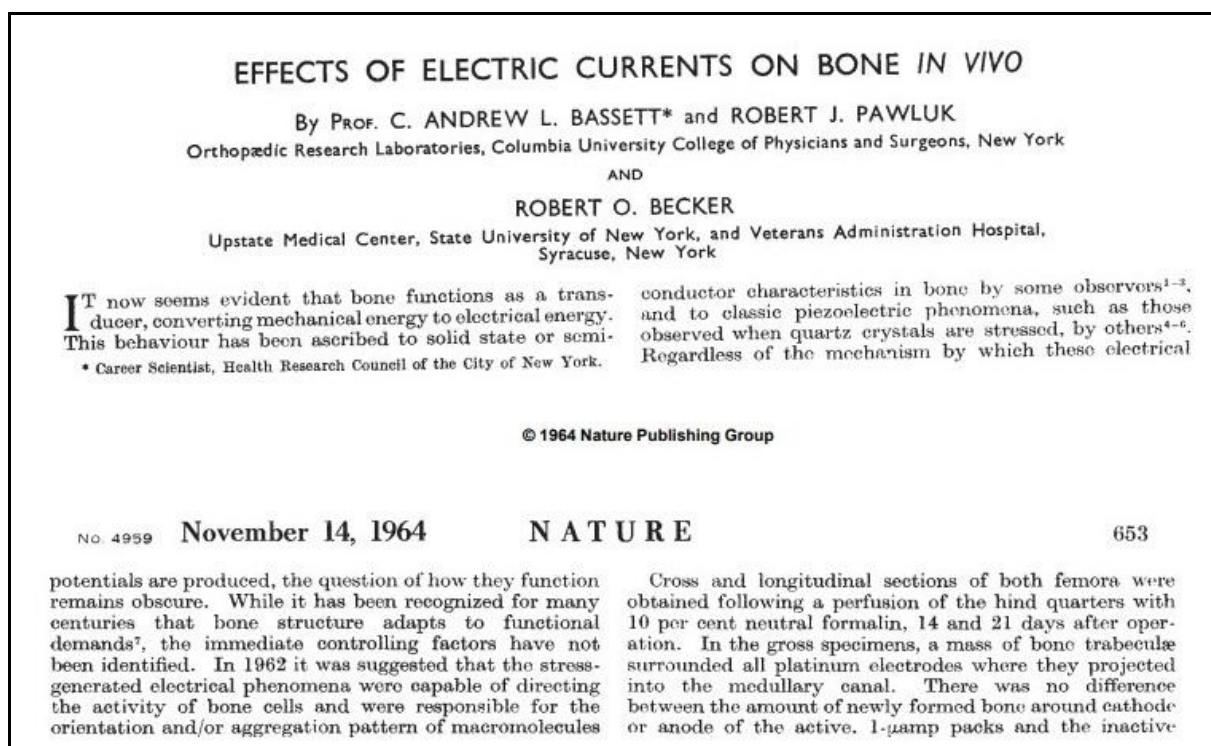
Ласерски зраци слободно пролазе кроз диоптрички апарат ока и фокусирају се на очном дну, апсорбујући се у мрежњачи и пигменту родопсину. Густина енергије која се при том концентрише на мрежњачи је за 100-1000 пута већа од улазне енергије на рожњачи, те могу да настану озбиљна оштећења вида. Зато се користе оклузивне наочаре са посебним филтром, који не пропушта ласерске зраке (31, 64).

1.4. Електромагнетно поље

Електромагнетно поље (енгл. *Electromagnetic field, EMF*) се користи у терапији већ неколико хиљада година. У Египту, древни лекар Еберс на папирусу је 3600 година пре нове ере записао рецепт за лечење повреда главе и сунчанице, који садржи и артпет – ферометеорит слабе магнетне активности (31, 34, 35). Такође, постоје записи да су Грци, Римљани, Византијци и Арапи за лечење користили разне врсте магнета. Магнет је први пут пронађен у природном стању у Магнезији, области Мале Азије, по којој је и добио назив. Исти или слични оксиди гвожђа пронађени су и у другим деловима света (31, 34, 35).

Модерна ера магнетне терапије почиње са научним радовима које су 1957. године објавили Јапанци *Fukada Eiichi* и *Yasuda Iwao*, и 1962. године Американци *Andrew L. Bassett*, *Robert J. Pawluk* и *Robert O. Becker* (Слика 4), поставивши научне основе за примену магнетног поља у лечењу прелома костију који не зарастају спонтано (31, 65, 66,).

Ипак, ни данас није довољно познат и јасан механизам деловања електромагнетног поља, те ова докторска теза има циљ да допринесе бољем објашњењу дејства ЕМФ на ћелијском нивоу (31-35).

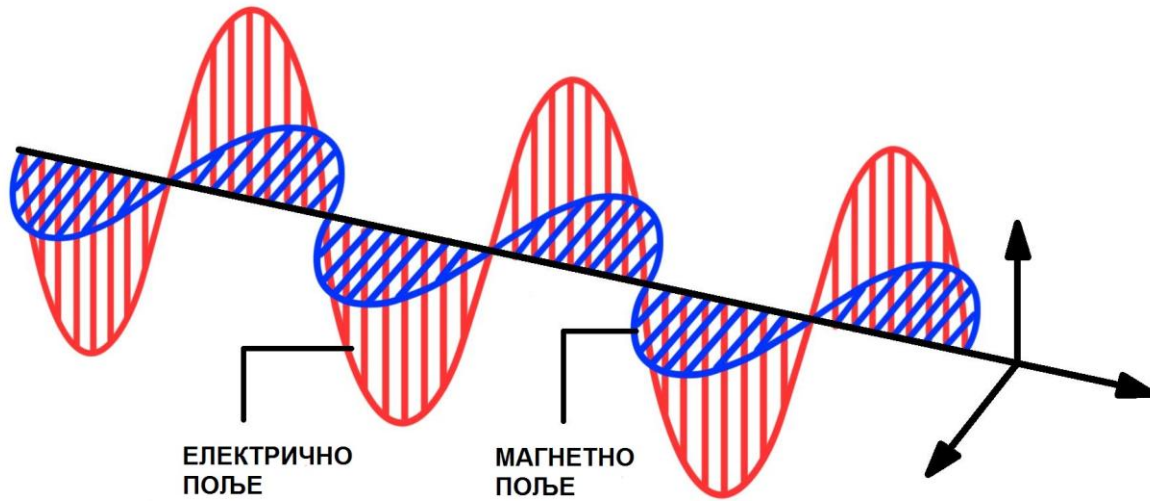


Слика. 4. Наслов и део увода научног рада објављеног у *Nature*-у 1964. године у којем Американци *Andrew L. Bassett*, *Robert J. Pawluk* и *Robert O. Becker* убрзавају лечење прелома костију применом електромагнетног поља

1.4.1. Биофизичко дејство ЕМФ

ЕМФ стварају наелектрисане честице које се слободно крећу, као и наелектрисане честице које се крећу унутар атома и молекула којем припадају. ЕМФ постоји око проводника са струјом и око сталних магнета. Електричне и магнетне појаве међусобно су повезане. То значи да се магнетно поље ствара из електричног и обратно (Слика 5).

ЕМФ које се користи у физикалној медицини припада радиоталасима најниже фреквенције (31-35, 67-69).



Слика 5. Електромагнетно поље

Класични извори ЕМФ су стални магнет, завојница и електромагнет. Стални магнет је стално намагнетисан прави или потковичасти челични предмет. Завојница или соленоид је калем металне жице који може да привуче гвоздене предмете, ако кроз њега тече галванска струја. Електромагнет је завојница с језгром од меког гвожђа. Галванска струја која пролази кроз завојницу ствара њено магнетно поље (31-35).

Подела ЕМФ заснована је на њиховој стабилности и фреквенцији (Табела 2) (31, 34, 35).

Табела 2. Подела ЕМФ

Електромагнетна поља		
према стабилности		према фреквенцији
константна	променљива	Ултраниске фреквенције (до 3 Hz)
	импулсна	Екстремно ниске фреквенције (од 3 до 3 kHz)
	алтернативна	Веомо ниске фреквенција (од 3 kHz до 30 kHz)
		Високе фреквенције (од 3 до 30 MHz)
		Ултрависоке фреквенције (од 30 од 300 GHz)

ЕМФ у клиничкој пракси користи се одавно, али је његова систематска примена релативно нова. Апарат за магнетотерапију је технички уређај који примарно ствара

магнетно поље и треба га разликовати од апарата који производе магнетно и електрично поље исте вредности. Вектор магнетне индукције доминира над вектором електричног поља за више од 90 %, па је термичка компонента занемарљива. Због тога се сматра да је примена ЕМФ атермичка, што је важна предност овог физикалног агенса у односу на друге, код лечења болести у којима је примена топлоте контраиндикована (31-35, 70).

У физикалној медицини се најчешће користи импулсно ЕМФ, са екстремно ниским фреквенцијама, од 1-50 Hz, највише до 100 Hz. За живе ћелије још нису са сигурношћу дефинисане вредности прага толеранције магнетног поља, упркос многим експериментима *in vivo* и *in vitro* (31, 70-72).

1.4.2. Биохемијско дејство ЕМФ

Примарни начин биолошког дејства ЕМФ није познат. Претпоставља се да су кључни ефекти електрохемијске природе. Међутим, секундарна или посредна дејства ЕМФ су доста проучена и због њих се магнетна поља користе у медицини (33, 73). Магнетна поља имају механохемијски ефекат, узрокују вибрације ћелијских мембрана, њихову хиперполаризацију и повећање активности јонских пумпи. На овај начин се утичу на функцију ћелија и убрзавају њен метаболизам. Апсорбована енергија ЕМФ подстиче адаптационе реакције организма, појачава имунску способност, убрзава зарастање ткива, побољшава циркулацију, смањује запаљење и бол (34, 71-75).

Утицајем на структуралну архитектонику липопротеина, ЕМФ мења пропустљивост ћелијске мембране и утиче на равнотежу унутарћелијских и ванћелијских јона (76). У многим патолошким стањима равнотежа је поремећена на рачун већег броја негативних јона са унутрашње стране или позитивних јона са спољашње стране, тако да је мембрана мање надражљива у односу на физиолошке принципе поларизације (77). Променом пермеабилности ћелијске мембране ЕМФ поново успоставља јонску равнотежу. Осим тога, ЕМФ делује на интеракцију рецептора на мембрани и активних супстанци и мења оријентацију елементарних магнетних дипола. Убрзавају се процеси дифузије и активног транспорта кроз мембрану, а стимулише формирање комплекса рецептор-трансмисер, рецептор-хормон и антиген-антитело (31-35, 78-81).

ЕМФ повећава парцијални притисак кисеоника, олакшава његову дифузију и утилизацију у ћелији. Побољшава енергетски биланс ћелије, повећава ресинтезу аденозин-трифосфата из аденозин-дифосфата (31, 82-85). Осим тога, магнетно поље директно утиче на физичко-хемијска својства воде: површински напон, вискозност, електричну проводљивост, диелектричну пропустљивост (86, 87).

Јапанци *Fukada Eiichi* и *Yasuda Iwao* и Американци *Andrew L. Bassett* и *Robert O. Becker* у својим експериментима су показали утицај магнетног поља на остеогенезу (65, 66). Утврдили су да под утицајем механичког стреса долази до појаве електричног потенцијала у костима. На страни компресије настаје позитивни потенцијал, а на страни растерећења негативни. Затим су у *in vivo* условима утврдили да је ендостална површина костију негативно наелектрисана, а периостална позитивно, тако да кроз кортекс кости тече једносмерна струја. На местима репарације кост је електронегативна, а остала места су електропозитивна. Под утицајем магнетног поља у кристалоидним макромолекулима протеина настаје позитивни пиезоелектрични ефекат, који активира остеобласте, хондробласте и фибробласте, тако да настаје пролиферација коштаног, хрскавичавог и везивног ткива (31-35, 65, 66).

Експериментална и клиничка испитивања последњих четири деценије скинула су ореол мистичности са магнетотерапије. Утврђено је да магнетно поље ниске фреквенције и ниског интензитета делује антиинфламаторно и антиедематозно и стимулише регенерацију ткива. Осим тога, делује вазодилататорно и хиперемизирајуће, ублажава бол и повишени тонус мишића (88-92).

1.4.3. Дозирање електромагнетног поља

Основни параметри дозирања електромагнетног поља дати су у табели 3 (31, 34, 93).

Табела 3. Основни параметри дозирања електромагнетног поља

Параметри дозирања електромагнетног поља	Јединица
Фреквенција	херц (Hz)
Интензитет	Тесла (Т)
Дужина трајања	секунд (s)

1.5. Матичне ћелије

Нови научни подаци у области матичних ћелија учинили су да је то једна од најинтересантнијих тема у медицини. Разлог за то је њихов потенцијал у лечењу дегенеративних болести и болести повезаних са поремећајем ћелијске функције (12-14). У последњих 10 година додељене су две Нобелове награде за медицину научницима који су се бавили матичним ћелијама (Слика 6) (13, 94, 95).



Photo: U. Montan
Mario R. Capecchi
Prize share: 1/3



Photo: U. Montan
Sir Martin J. Evans
Prize share: 1/3



Photo: U. Montan
Oliver Smithies
Prize share: 1/3



Photo: U. Montan
Sir John B. Gurdon
Prize share: 1/2



Photo: U. Montan
Shinya Yamanaka
Prize share: 1/2

Слика 6. Добитници Нобелових награда за област медицине 2007. године (горе, *Mario R. Capecchi*, *sir Martin John Evans* и *Oliver Smithies*) и 2012. године (доле, *John B. Gurdon* и *Shinya Yamanaka*,) за достигнућа у области матичних ћелија

Статистички подаци из 2010. године указују да је у САД регистровано 12,9% људи старијих од 65 година, а претпоставља се да ова узрасна група чини 8% укупне светске популације (96). Зато се већ сада сматра да ће превенција и лечење обољења повезаних

са старењем бити велики изазов и задатак у различитим областима биомедицине. Неуродегенеративне и остеодегенеративне болести (Алцхајмерова болест, Паркинсонова болест, амиотрофична латерална склероза, макуларна дегенерација ретине, остеоартритис, остеопороза и друге) и обољења у чијој је патогенези поремећај ћелијске функције (тумори, кардиоваскуларна обољења, хроничне опструктивне болести плућа и шећерна болест) чине поље интересовања регенеративне медицине и рехабилитације (13, 97-103). У теоријском смислу, репарација или замена оштећених ћелија које су изгубиле функцију, или оних ћелија које су умрле, матичним ћелијама било би идеално терапијско решење.

1.5.1. Дефиниција и класификација матичних ћелија

Иако су досадашња истраживања довела до прецизних објашњења многих механизма изолације и ефекта матичних ћелија, и даље постоји значајан степен конфузије и неслагања у овој области, па чак и у дефинисању основних појмова. Рана литература о матичним ћелијама била је препуна атрактивних и звучних термина, као што су: „континуирано“, „неограничено“, „бесмртно“, што није експериментано доказиво, те је неопходно увођење стандарда и доброг научног утемељења у овој области (104, 105).

Матичне ћелије се могу дефинисати као неспецијализоване ћелије организма, које имају способност самообнављања и диференцијације у различите типове функционално специјализованих зрелих ћелија. Оне имају важну улогу у ембрионалном развићу и органогенези (ембрионалне и феталне матичне ћелије), као и у хомеостазии и регенерацији ткива (адултне матичне ћелије) (1, 2, 13, 106-111).

Према функцији, матичне ћелије се деле на нормалне и канцерске матичне ћелије, а у односу на место изолације на ембрионалне, феталне и адултне матичне ћелије (Табела 4) (112-115).

Три основне карактеристике матичних ћелија су: 1) способност самообнављања, 2) клоногеност, 3) потентност (1, 116-119).

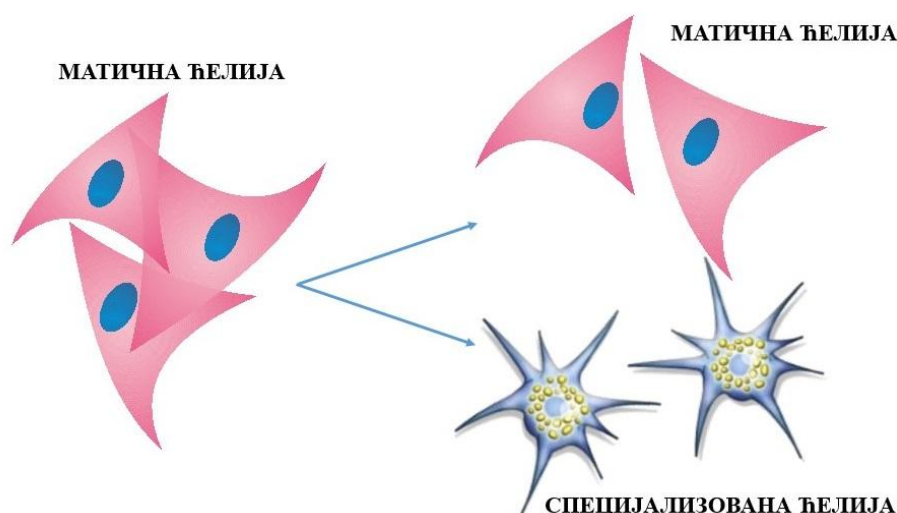
Самообнављање је јединствена способност континуиране деобе матичних ћелија у циљу сопствене репродукције (120, 121). Наиме, матичне ћелије деобом дају две ћелије, од којих једна ћерка ћелија обнови сопствену популацију, а друга путем пролиферације

и диференцијације даје сукцесивно прогениторне, прекурсорске и потом зреле ћелије организма; таква деоба назива се асиметрична деоба (Слика 7) (1, 116-119).

Табела 4. Подела матичних ћелија у односу на функцију и место изолације

Матичне ћелије	
у односу на функцију	у односу на место изолације
нормалне	ембрионалне
канцерске	феталне
	адултне

Клоногеност подразумева способност матичне ћелије да деобом да клон, анатомски и функционално идентичну ћерку ћелију (Слика 7) (122, 123).



Слика 7. Асиметрична деоба матичне ћелије

Потентност (пластичност) означава могућност диференцијације матичних ћелија у различите ћелијске типове. У односу на потентност, матичне ћелије се деле на тотипотентне, плурипотентне, мултипотентне и унипотентне ћелија (Табела 5) (124-127).

Тек оплођена јајна ћелија (зигот) и бластомере су једине тотипотентне ћелије у организму човека, пошто могу да се диференцирају у све ћелије организма и екстраембрионална ткива, а ембрионалне матичне ћелије, (енгл. *Embryonic Stem Cells*, ESCs) су плурипотентне, с обзиром да се њихов потенцијал за диференцијацију смањује, јер од њих не могу да се добију сва екстраембрионална ткива неопходна за

развиће сисара (128). Мултипотентне матичне ћелије имају ужи спектар потентности и способност да се диференцирају само у мезодермалном правцу, стварајући остеобласте, хондроците и адипоците. Због етичких проблема и непотпуне контроле над ESC у смислу канцерогене потентности, у експерименталним и клиничким студијама се значајно више користе мезенхималне матичне ћелије (енгл. *Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) које се мултипотентне (1, 2, 129). Унипотентне матичне ћелије су, у ствари, прекурсорске ћелије, са већ поодмаклом диференцијацијом и могућношћу да буду само један ћелијски тип (1, 112, 130).

Табела 5. Подела матичних ћелија у односу на потентност

Матичне ћелије
у односу на потентност
тотипотентне
плурипотентне
мултипотентне
унипотентне

Научни рад *Friedenstein*-а и његовог тима 1960. године у ком је описао изолацију, култивацију и показао остеогену диференцијацију ћелија изолованих из костне сржи отворио је ново поље у истраживању матичних ћелија, примарно MSCs (131). Убрзо су канадски научници, *Ernest A. McCulloch* и *James E. Till*, доказали клоногену способност ћелија костне сржи путем серије експеримената у којима су убризгавали суспензију хематопоетских ћелија костне сржи у озрачене мишеве (132, 133). У слезини тих мишева, након жртвовања, пронађене су многобројне колоније ћелија које су имале исто порекло као и ћелије костне сржи. Ови резултати одразили су се и на испитивање матичних ћелија уопште. Та почетна истраживања матичних ћелија рађена су на материјалу из костне сржи одраслих испитаника, да би се неколико деценија касније дошло до доказа да MSCs постоје у скоро свим ткивима одраслих особа. Још увек се не зна тачна локализација MSCs због тренутног недостатка добро дефинисаних орган-специфичних маркера, али постоје научни докази који указују да се налазе у мобилним „нишама“ и да се на тај начин обезбеђује ткивна хомеостаза (134-136). Највише проучене су оне које су смештене у костној сржи (1, 2, 13, 137). Поред костне сржи, до данас, ове ћелије су изоловане и из масног ткива, зубне пулпе, скелетних мишића,

синовијалне мембране, периоста, коже, епитела дигестивног тракта, срца, плућа, ретине, мозга, јетре, панкреаса, ендометријума, бубрега, жлезданог ткива дојке, менструалне крви (138-140).

Међународно удружења за ћелијску терапију (енгл. *International Society for Cellular Therapy*) дало је препоруку за три минимална критеријума за карактерисање MSCs ја у култури. Минимални имунофенотипски профил MSCs и критеријуми дати су у табели 6 (141).

Табела 6. Минимални критеријуми за дефинисање културе MSCs

Минимални критеријуми за дефинисање културе MSC (препука Међународног удружења за ћелијску терапију – <i>International Society for Cell Therapy</i>)	
1. Адхерентност (лепљивост) за пластику	
2. Експресија ($\geq 95\% +$)	Изостанак експресије ($\leq 2\% -$)
CD105	CD34
CD73	CD45
CD90	CD14 или CD11b
	CD79 α или CD19
	HLA-DR
3. Могућност трилинеарне диференцијације у адипоците, хондроците и остеобласте	

Антиген CD105 (ендоглин) је регулаторни део комплекса рецептора TGF- β . Антиген CD73 (екто-5'-нуклеотидаза) је адхезиони протеин који везује гликозил-фосфатидил-инозитол (енгл. *Glycosylphosphatidylinositol*, GPI) за ћелијску мембрану. Антиген CD90 (описан првобитно као *Thymocyte differentiation antigen 1*, Thy-1) је високогликозилирани мали протеин (из суперфамилије имуноглобулина) на површини ћелије који усидрује GPI. Постоје и други важни површински антигени на MSCs који се користе за имуноселекцију, као што су STRO1 (енгл. *Stromal Precursor Antigen-1*), CD45a/CD29 ($\alpha 1\beta 1$ -интегрин), CD106 (енгл. *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*, VCAM-1), CD146 (*MUC-18*), EGFR – *Epidermal Growth Factor Receptor*, IGFR – *Insulin-like Growth Factor Receptor*, NGFR – *Neural Growth Factor Receptor*, PDGFR – *Platelet-Derived Growth Factor Receptor* (13, 142, 143).

Треба напоменути да овај скуп критеријума није дефинитиван, нити скроз прецизан, јер ћелијски маркери у *in vitro* и *in vivo* условима нису исти због дејства спољашњих фактора у почетним пасажама, па експресија ћелијских маркера у *in vitro* условима не мора у потпуности да корелира са *in vivo* условима (13).

1.5.2. Изолација MSCs

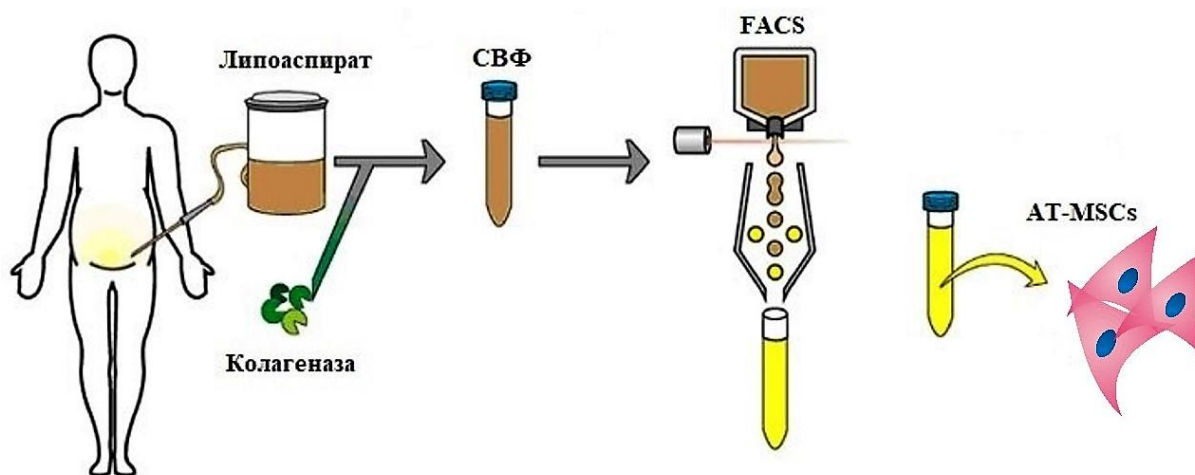
MSCs су најпре изоловане из пунктата костне сржи (144). Изолација се заснива на издвајању моноклеарних ћелија на основу градијента густине и култивисању на пластичним подлогама на које оне адхерирају раздвајајући се од неадхерентних хематопоеетских ћелија. Из овако издвојених адхерентних моноклеарних ћелија, током култивације у одговарајућем медијуму, после две до три недеље остају само ћелије са високим пролиферативним потенцијалом и оне које се самообнављају, међу којима се налазе MSCs различитих стадијума примитивности (енгл. *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*, BM-MSCs) (144, 145).

Ипак, постоје одређени недостаци при добијању BM-MSCs: мали број изолованих ћелија, бол приликом биопсије и могућност крварења и инфекције, па је постојала потреба за алтернативним изворима MSCs (144-146). У том смислу, као веома добри извори показали су се масно ткиво, зубна пулпа и крв пупчане врпце (147-150).

Методe изолације MSCs из масног ткива (енгл. *Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells*, AT-MSCs) (Слика 8) (151) и зубне пулпе (енгл. *Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells*, DP-MSCs) заснивају се на ензиматском разлагању добијеног материјала, при чему се добија стромална васкуларна фракција (СВФ), а касније поступком имуноселекције високопречишћена популација MSCs (147-150). Комбинацијом више моноклонских антитела усмерених против различитих површинских антигена, као што су CD146, STRO-1, CD49a, CD29, CD106, спречава се „контаминација“ MSCs хематопоеетским ћелијама, ендотелним ћелијама и фибробластима.

Изолација MSCs из крви пупчаника (енгл. *Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells*, UC-MSCs) одвија се на сличан начин као и BM-MSCs (148).

Проточна („flow“) цитометрија (енгл. *Fluorescence-Activated Cell Sorting*, FACS) је метода којом се анализира фенотип и прати апоптоза, ћелијски циклус, активност митохондија, присуство ензима и други процеси великог броја ћелија у суспензији. Ћелије су обележене флуоресцентном бојом, протичу „једна по једна“ кроз цевчицу, где бивају осветљене кохерентном ласерском светлошћу из два угла. Емитована флуоресценција се детектује, сакупља, пропушта кроз филтере и конвертује у дигиталне сигнале који се памте и анализирају у рачунару (13, 152).



Слика 8. Метода изолације мезенхималних матичних ћелија из хуманог масног ткива

1.5.3. Култивација MSCs

Услови култивације MSCs су температура од 37°C и парцијални притисак CO₂ 5%. MSCs се гаје у медијуму, најчешће у α -DMEM (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) медијуму са 10% феталним говеђим или телећим серумом (енгл. *Fetal Calf Serum* – FCS или *Fetal Bovine Serum* - FBS) (1, 13, 18, 153). Под тим условима култивисања (Табела 7) за 7-14 дана адхерисане ћелије формирају колоније (енгл. *Colony Forming Units – Fibroblast*, CFU-F) и то обично једну до десет колонија на 10⁵ ћелија положених на подлогу. Ове CFU-F ћелије представљају мешавину клоногених MSCs и прогениторних ћелија. Део CFU-F ћелија има изразито висок пролиферативни капацитет у условима *in vitro* и у оптималним условима култивисања ове ћелије могу да се дуплирају и до 90 пута (*ex vivo* пропација MSCs) и на тај начин да обезбеде довољан број ћелија за трансплатацију (13, 18, 154, 155).

Табела 7. Услови култивације MSCs

Услови култивације MSCs	
Температура	37°C
Парцијални притисак CO ₂	5%
Медијум	α -DMEM са 10% FCS или FBS
Време формирања колонија	7-14 дана

MSCs морфолошки се карактеришу као фибробласту сличне ћелије, са округлим једрима и јасним нуклеолусом који је окружен честицама хроматина, дајући једру карактеристичан изглед. Од ћелијских органела истакнуте су мале количине Голџијевог апарата, храпави ендоплазматични ретикулум и митохондрије (13, 156).

MSCs из костне сржи, крви пупчане врпце, масног ткива и зубне пулпе су имунофенотипски сличне, али постоје разлике у пролиферативном капацитету. MSCs изоловане из масног ткива и зубне пулпе стварају већи број колонија и имају већи пролиферативни потенцијал у односу на MSCs изоловане из костне сржи и крви пупчаника, па постају све популарније за клиничку примену. Осим тога, добијају се из лако доступних ткива, која су, уколико се не употребе, медицински отпад (1, 13, 147, 150, 157-159).

1.5.4. Диференцијација MSCs

MSCs поседују способност диференцирања у остеобласте, хондроците и адипоците у условима *in vitro*. Ипак, њихов мултипотентни капацитет може се проширити процесом трансдиференцијације и према ектодермалном и ендодермалном правцу. АТ-МССс имају способност да се диференцирају у остеобласте, хондроците, адипоците и глатке и скелетне мишићне ћелије (14, 18, 143, 160-162). ВМ-МССс имају способност да се диференцирају у остеобласте, хондроците, адипоците, глатке мишићне ћелије, а последњих година доказано је и у ендотел, епителне ћелије бубрега, хепатоците, кардиомиоците, нервне ћелије, теноците и епителне ћелије ретине (144, 148, 163).

DP-MSCs имају изразит пластицитет, тј. способност да се диференцирају и у ћелије различите од ћелија присутних на месту одакле потичу, а најновији радови пружају доказе о њиховом пластицитету и у условима *in vivo* (13). У условима *in vitro* или *in vivo* ове ћелије могу да се диференцирају, с одређеним међусобним разликама, у правцу одонтобласта, хондроцита, остеобласта, адипоцита, неурона/глије, глатких и скелетних мишићних ћелија, ендотелних ћелија, епителних ћелија рожњаче, меланоцита, β -ћелија панкреасних остраваца и iPSC (енгл. *Induced Pluripotent Stem Cells*) (13, 144, 164, 165).

Као што је раније поменуто, почетна истраживања матичних ћелија рађена су на материјалу из костне сржи одраслих испитаника, да би се неколико деценија касније дошло до доказа да адултне матичне ћелије постоје у скоро свим ткивима одраслих

особа (1, 166, 167). Анализом понашања BM-MSCs и добијених резултата који говоре да се BM-MSCs неће самообнављати уколико се уклоне из њихове природне микросредине, дошло се до концепта „нише“ матичних ћелија (13, 134, 154, 168). Једна ћерка ћелија ван своје „нише“ покренуће процес диференцијације, јер на њу не делују фактори самообнове. Дакле, у „нишама“ матичних ћелија постоје услови који омогућавају деловање пролиферативних и анти-апоптотичних сигнала и услови који искључују факторе за диференцијацију. Тиме, заправо, постојање „ниша“ у ткивима омогућава идеалну микросредину и депо матичних ћелија (13, 169, 170).

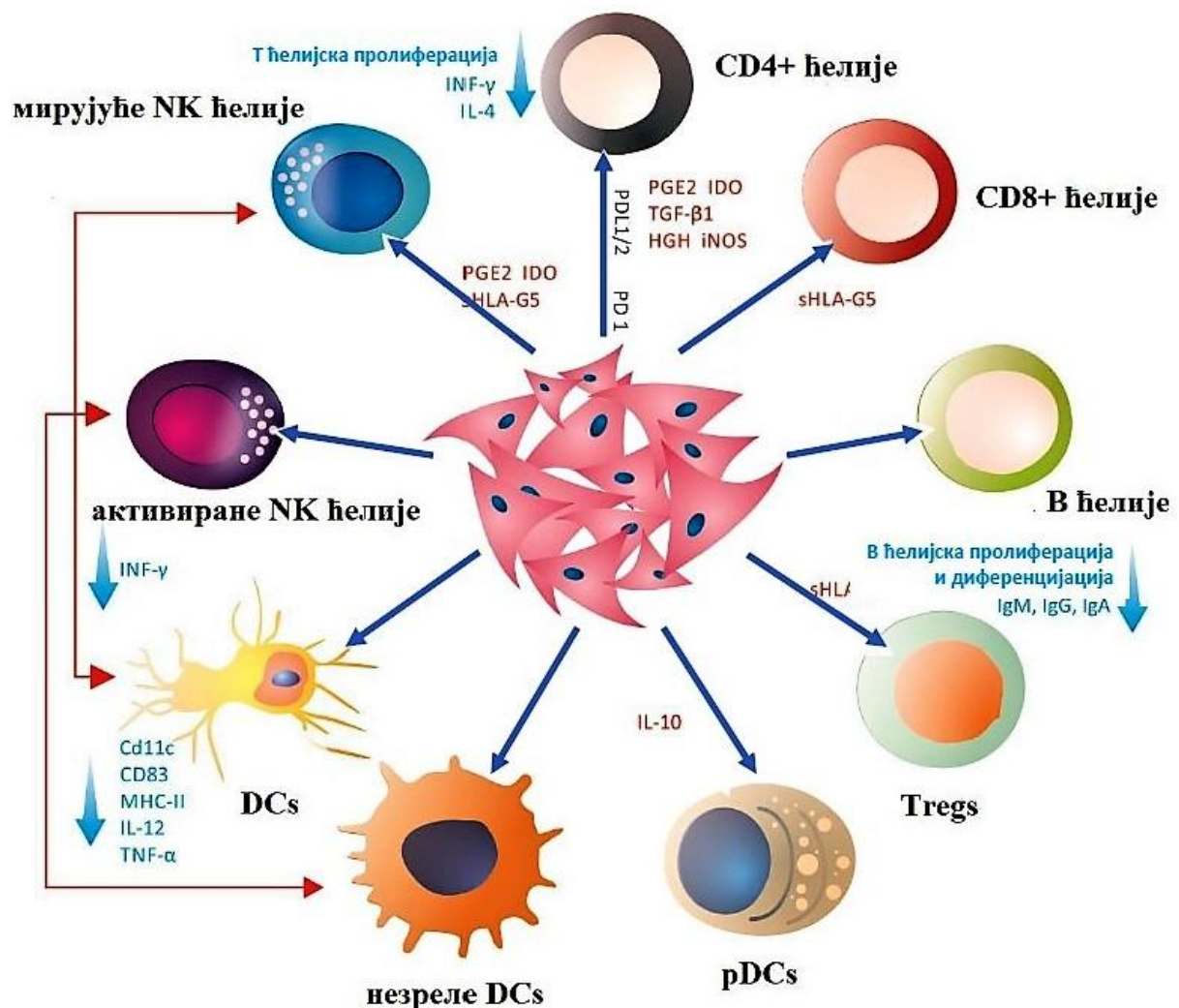
1.5.5. MSCs као имуномодулатори

Имуномодулација представља промену имунског одговора организма под утицајем ћелија или дејством растворљивих молекула и подразумева имуностимулацију, имуносупресију и индукцију толерогености на поједине антигене. Све ове врсте имуномодулације примењују се у оквиру одређених терапија (13, 14, 171).

На основу последњих научних доказа, циљана диференцијација MSCs на месту оштећења у оштећене или одумрле ћелије је ређи сценарио, већ MSCs секрецијом цитокина и хемокина, тј. имуномодулацијом чешће утичу и остварују терапијски ефекат (Слика 9) (1, 2, 12, 13, 22).

Способност MSCs да модулирају имунски одговор први пут је препозната при примени ових ћелија када је уочено да оне супримирају реакцију имунског система, те се данас терапија заснована на овој способности MSCs већ налази у великом броју клиничких испитавања (172, 173). Један од начина на који MSCs могу утицати на имунски одговор јесте обрада и презентација антигена и експримирање костимулаторних молекула. MSCs експримирају антигене ткивне хистокомпатибилности, и то МНС (енгл. *Major Histocompatibility Complex*) молекуле I класе и мали број МНС молекула II класе (14, 172-174). Осим тога, MSCs могу учествовати у фагоцитози микроорганизама, након чега их презентују Т лимфоцитима који се активирају и почињу да луче IFN- γ , који када се нађе у високој концентрацији инхибира даљи имунски одговор и онемогућава претерану активацију Т лимфоцита. На овај начин се може објаснити да MSCs могу имати двојну улогу: стимулација и инхибиција имунског одговора (173-176).

Имуномодулаторна својства која показују MSCs чине ове ћелије занимљивим у ћелијској терапији која се може применити у лечењу болести, као што су дијабетес типа 1 и реуматоидни артритис (177-182). Претпоставља се да MSCs могу инхибирати аутоимуност код дијабетеса, тако што спречавају експресију позитивних, а стимулишу експресију негативних костимулаторних молекула. Осим тога, утицајем на лучење различитих цитокина (TGF- β 1 и IL-10) који утичу на регулацију Т ћелија, MSCs могу да утичу на патогенезу шећерне болести (177). Испитивања која су вршена на тзв. NOD/SCID мишевима указују да смањена концентрација или неправилна функција дендритских ћелија, може повећати концентрацију костимулатора код дијабетес типа 1 и појачати имунски одговор (178). Испитивања показују да MSCs у интеракцији са дендритских ћелијама, доводе до формирања регулаторних дендритских ћелија које смањују тај имунски одговор (179).



Слика 9. Имуномодулаторне способности MSCs

Код реуматоидног артритиса, који представља аутоимунско обољење, долази до неадекватне активације В лимфоцита (180). Како MSCs супримирају матурацију В лимфоцита, претпоставља се да би могле бити ефикасне у терапији реуматоидног артритиса. Ипак, према најновијим научним подацима показано је да MSCs слабе свој имуномодулаторни потенцијал када се убризгају у инфламрани зглоб (181, 182). У претклиничким студијама је показано да би уз примену MSCs било пожељно дати и цитостатик да би се добио позитиван ефекат на стишавање индукованих и спонтаних артритиса (13, 183).

1.5.6. Могућности примене MSCs

У највећем броју клиничких студија користе се BM-MSCs, AT-MSCs и UC-MSCs. Болести које се покушавају лечити овим ћелијама су дегенеративна коштанозглобна и неуролошка обољења, као и реуматоидни артритис, дијабетес тип I, акутно оштећење и цироза јетре, инфаркт миокарда, мождани и срчани удар, реакције калем против домаћина и других (Схема 2). Сателитске ћелије мишића успешно су употребљене у терапији уринарне инконтиненције и *Duchenne*-ове мишићне дистрофије (13, 107, 110-116). Тренутно се у САД-у спроводи око 1000 клиничких студија са MSCs (179, 184-187).

У патофизиологији одређених болести мобилишу се MSCs из њихових ниша које насељавају место оштећења, у чему учествују фактори раста, цитокини и хемокини (2, 13, 188-190). Терапијска примена ових ћелија подразумева изолацију и њихову *ex vivo* култивацију, пролиферацију и диференцијацију. Након успешне диференцијације, суспензија ћелија се апликује пацијенту на један од више начина. Када се MSCs апликују интравенски, хемоатрактанти их привлаче да насељавају места оштећења у многим органима (нпр. плућа, јетра, мозак, срце) и не изазивају реакцију одбацивања (1, 2, 14, 191-193). Процес током ког ћелије мигрирају у ткива, где се могу “накалемити” и потом постати функционалне ћелије датог ткива назива се хоминг (енгл. *homing*). Хоминг представља каскаду догађаја, тј. интеракцију између ћелија и васкуларног ендотела ка циљаном ткиву. Ови процеси се дешавају захваљујући постојању “хоминг рецептора” који се налазе на површини наведених ћелија (13, 191-196). Кључну улогу у ћелијској адхезији, миграцији и хемотакси имају интергини, од

којих је најзначајнији интергин $\alpha 4/\beta 1$ који представља хетеродимер на површини ћелија (13, 193).

Раније се веровало да се процеси репарације и регенерације одигравају диференцијацијом MSCs на месту које су населиле (1, 107, 110), али се данас зна да је вероватнији другачији сценарио. Један мали део системски апликованих ћелија дође на место оштећења, након чега почињу да секретују различите цитокине, хемокине и протеине екстрацелуларног матрикса, те на тај начин вршећи имуномодулацију подстичу процес регенерације (1, 2, 188-196).

Показано је да је регенеративни потенцијал MSCs различит у односу на извор изолације (197, 198). BM-MSCs поседује већи потенцијал за формирање остеобласта и хондроцита (198, 199), док AT-MSCs доприносе бољем формирању капиларних мрежа у *in vitro* (200), и васкулогенези у *in vivo* условима (201, 202). UC-MSCs имају висок потенцијал за диференцијацију у периците, док је њихова потентност за остеогенезу мања у поређењу са BM-MSCs (203), које су и даље „златни стандард“ за остеогену диференцијацију и регенерацију.

Упркос чињеници да су DP-MSCs и BM-MSCs регулисане сличним факторима и имају сличан фенотипски профил, ове популације су показале да се значајно разликују у пролиферативном капацитету *in vitro* и, што је још важније, у регенеративном капацитету *in vivo* (204). Остеогени, хондрогени и адипогени потенцијал BM-MSCs већи је у односу на DP-MSCs (205-208), а насупрот томе, потенцијал неурогене диференцијације DP-MSCs значајно је бољи, јер ове ћелије имају порекло неуралног гребена (209).

По подацима *Bone Marrow Donor Worldwide* (<http://www.bundw.org>) у јавним националним банкама, до 2010. године у свету је сачувано више од 419.000 узорака крви из пупчане врпце, а процењује се да је у приватним породичним биобанкама похрањено 1.000.000 узорака (13). Крв из пупчане врпце похрањује се од 1991. године (График 1). Касније је ова организације прерасла у *World Marrow Donor Association* (WMDA), па по подацима из 2016. године број узорака крви из пупчаника је значајно повећан (График 2) (210). Ти узорци подвргавају се HLA-типизацији и припремају за алогену трансплантацију. HLA-систем (енгл. *Humal Leukocyte Antigens*, антигени ткивне подударности) задужен је за препознавање сопствених ћелија од ћелија другог порекла (ћелије рака, бактерије, вируси, итд.). Ови антигени налазе се на површини леукоцита и других ћелија у организму. Деле се на шест група, које су означене словима абецеде (A,

B, C, D, R, E). У случају трансплантације дониране костне сржи потребна је подударност свих 6 група и генска подударност, док је у случају трансплантације крви из пупчане врпце, потребна подударност само 3 од 6 група, због незрелости матичних ћелија из крви пупчане врпце, које стога изазивају далеко мању реакцију калем против домаћина (тј. трансплантат против примаоца) (13, 211).

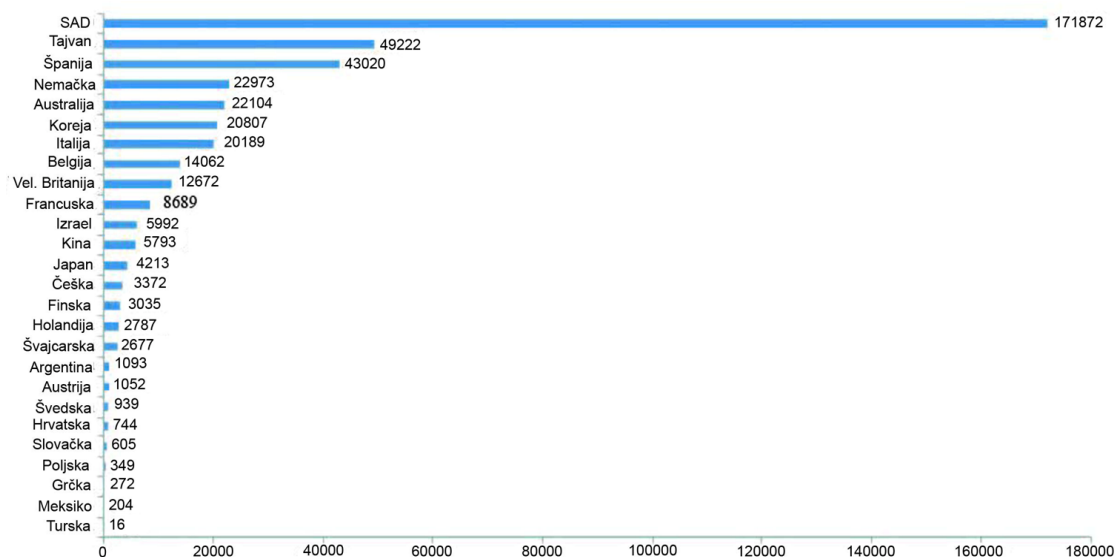


График 1. Узорци крви из пупчане врпце похрањени у јавним националним банкама у свету; (<http://www.bundw.org.>, 2010.)

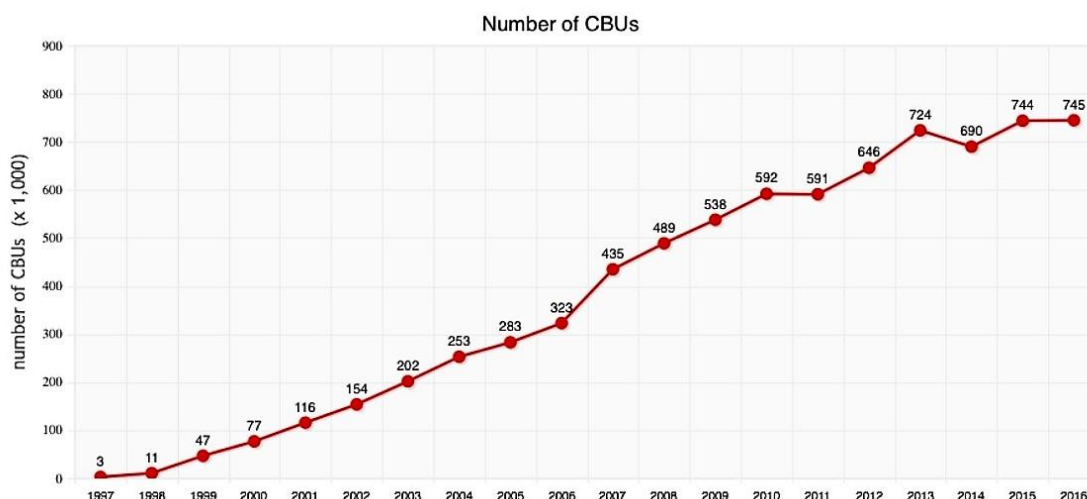


График 2. Узорци крви из пупчане врпце похрањени у јавним националним банкама у свету; (<https://www.wmda.info/>, 2016.)

У протекле две деценије, терапијски потенцијал MSCs интензивно се истражује у претклиничким студијама различитих неуролошких болести, укључујући моделе интрацеребралне и субарахноидне хеморагије. Најновији подаци из малих, нерандомизованих клиничких студија сугеришу да је ћелијска терапија сигурна и изводљива код пацијената са исхемијским или хеморагијским можданим ударом (212). Потенцијал MSCs да се диференцирају у β ћелије панкреаса које производе инсулин могао би бити нови и ефикасни терапеутски приступ за лечење дијабетес мелитуса типа 1 (127, 213). Иако је остало још пуно посла, постигнут је значајан напредак у дефинисању потребних услова за ову процедуру (127, 213). Диференциране ћелије карактеришу се експресијом β ћелијских транскрипционих фактора PDX1, NKX6-1 и MAFA (127, 213). Међутим, тако диференциране ћелије још увек немају потпуну способност да одговоре на стимулацију глукозом у *in vitro* условима (213). Сматра се да се потпуна диференцијација трансплантираних ћелија у β ћелије за производњу инсулина мора догодити *in vivo*, где владају идеални услови микросредине за тај процес (127, 214). Једна до три седмице након локалне апликације у миша, ћелије стичу способност реаговања на глукозу и почињу да луче инсулин и Ц-пептид као одговор на повишену гликемију (13, 127, 214).

1995. године први пут је урађена аутолога трансплантација матичних ћелија код пацијената који болују од мултипле склерозе након претходно спроведене имуноаблативне терапије (215). Од тада је урађено преко 300 таквих трансплантација у свету (216-219). Критеријуме и протокол предложило је 2000. године Европско удружење неуролога (220). Терапија се заснива на поништавању аутореактивног, патолошког имунског система интензивним имуноаблативним режимом – комбинацијом цитостатика и накнадном аутологом трансплантацијом матичних ћелија, пореклом из периферне крви самог болесника, ради успостављања новог функционалног имунског система (221). Дакле, циљ је да се заустави даље инфламаторно, имунолошки посредовано оштећење у нервном систему, док још није настао критични губитак аксона са иреверзибилним неуролошким оштећењем. Трансплантација је подразумевала инстилацију CD34⁺ ћелија, односно хематопоетских матичних ћелија. Ранија истраживања показала су њихов потенцијал диференцијације и у прогениторе неуралних и ћелија глије, што би значило да поред реституције новог имунског система долази можда и до ћелијске репарације (процес ремијелинизације демиелинизованих аксона, регенерације ћелија локалног *milieu* и настанак нових

неурона). У прилог овој тези говоре налази *post mortem* студија особа трансплантираних због леукемије, где су донори били HLA подударни, али другог пола од примаоца, тако да се бојењем полних хромозома могу идентификовати ћелије донора годинама касније. Наиме, код ових особа је десетинама година после трансплантације у бројним ткивима, укључујући мозак и мишиће, нађено присуство ћелија које потичу од донора, високодиференцираних и функционално интегрисаних у локалну средину (222, 223). Анализа првих 85 обављених аутологих трансплантација матичних ћелија показала је да чак 74% болесника нема погоршања у периоду од три године, значајно је редуован број активних лезија регистрованих MRI прегледом (са 33 на 8%), побољшање EDSS скорa, (енгл. *Expanded Disability Status Scale*), који представља меру тежине неуролошког дефицита, за 0,5, а код 20% болесника чак више од 1,0 (224).

Примена матичних ћелија представља будућност терапије акутног инфаркта миокарда, јер ће омогућити регенерацију оштећеног миокардног ткива, за разлику од досадашњих терапијских протокола, који се углавном базирају на лечењу симптома и узрока самог инцидента. Постоје четири пута апликације MSCs у терапији акутног инфаркта миокарда: интрамиокардни, трансендокардијални, интракоронарни и интравенски. У моделу на псима, *Hamano* и сарадници су такође показали да убризгавање ћелија костне сржи у инфарктну зону доводи до повећања густине мреже малих крвних судова - до ангио- и артериогенезе (225). *Wang* и сарадници су показали да инфузија стромалних ћелија костне сржи код пацова код којих је експериментално изазван инфаркт миокарда, доводи до имплантације ових ћелија у миокард и да се ту диференцирају у правцу фибробласта у зони самог ожиљка, а у правцу миоцита ван инфарктне зоне (226). *Kamihata* је код свиња показао да имплантиране ћелије костне сржи повећавају колатерални крвоток и да чине 31% ендотелних ћелија у новоформираним капиларима. Међутим, обележене ћелије костне сржи нису нађене диферентоване у правцу миоцита или фибробласта (227).

Неколико клиничких студија испитује терапијски потенцијал MSCs за третман цирозе јетре (2, 228-234). Резултати добијени у фази 1 пилот студије, коју је спровео тим *Mohamadnejad*-а (228) и *Kharaziha* (229) су врло добри и указују да аутологна трансплантација 30-50 милиона BM-MSCs апликованих преко периферне или порталне вене успева да значајно побољша „*Mayo End-Stage Liver Disease*“ (MELD) скор код више 50% пацијената. *Amer* са сарадницима у другој фази клиничке студије (230), показао је значајно побољшање у *Child-Pugh* и MELD резултатима код 20 пацијената

који су добили аутологне BM-MSCs. Сличне резултате су добили Peng и његова екипа (231) који су показали да MELD скор, као и нивои албумина, билирубина и протромбинско време су значајно побољшани код 53 пацијента са поремећајем функције јетре после инфекције хепатитис В вирусом, 2-3 недеље након интрахепатичне апликације аутологних MSCs.

Иако се још увек не зна тачан механизам којим MSCs поправљају оштећену хрскавицу, способност ових ћелија да индукује пролиферацију и диференцијацију прогениторних ћелија у хондроците може допринети репарацији оштећене хрскавице (232). Трансдуковане MSCs које експримирају IL-1Ra или антагонисте TNF могу побољшати репаративни процес хрскавице кроз свој инхерентни хондрогени потенцијал и заустављање дегенерације хрскавице (233). Напредак у производњи биоразградивих скафолда који служе као носачи за MSCs имплантацију ће довести до боље биокомпатибилности и интеграције апликованих ћелија у ткиво домаћина. Поред тога, осим ефикасности, у студијама је потврђена и сигурност ових процедура (234).

Традиционални програми рехабилитације фокусирају се на цело тело и физиолошке одговоре на механичко оптерећење и/или физикалне терапијске модалитете. Насупрот томе, регенеративна медицина посвећује више пажње молекуларним, ћелијским и хистолошким аспектима регенерације ткива. Интеграција ова два приступа представља велики изазов, али има за циљ синергијски ефекат и додатно побољшање регенерације ткива.

1.5.7. Ограничења у примени MSCs

Ефикасност клиничких студија у којима се трансплантирају MSCs често је недовољна због отежаних услова унутар циљног ткива, укључујући хипоксију, слабију васкуларизацију и локалну реактивну запаљенску реакцију. Ово указује на потребу за оптимизацијом приступа који се базирају на ћелијској терапији. Како одмичу предклиничка и клиничка истраживања долази се до спознаје да постоје све већи проблеми који ограничавају терапијску примену MSCs (1, 235-237). Слабо прихватање и лимитирана диференцијација *in vivo* су главне препреке за ефикасну терапијску примену MSCs (236). Једно од питања је да ли применити недиференциране MSCs или их пре примене усмерити ка жељеном ћелијском типу (238). Могућност спонтане

диференцијације MSCs унутар организма базира се на дејству локалне микросредине на трансплантиране MSCs, али је та судбина изузетно ретка (1, 237, 239). Осим тога, тако примењене MSCs могу да се диференцирају и у нежељене ћелијске линије. Новије студије имају за циљ ограничење такве нежељене диференцијације помоћу разних фактора (237, 240), међутим, то још увек није потпуно решиво, јер прецизне улоге фактора који су одговорни за судбину MSCs у живом организму још увек нису јасне (1, 2, 235-240). Озбиљна ограничења представља и могућност малигне трансформације MSCs, што је већ доказано на неким експерименталним моделима болести (1, 235, 241). Ипак, пут до евентуалне рутинске примене MSCs у терапији остео- и неуродегенеративних болести је дуг, јер тренутни резултати клиничких студија нису довољно убедљиви и нису изведени на релевантном броју пацијената. И даље нису потпуно познате предности и мане примене различитих типова MSCs, нити који је најбољи начин апликације (1). Подаци објављени 2009. године, о развоју мултиплих тумора мозга код детета који болује од *ataxia-e teleangiectasia*-е, годину дана након што су му апликоване неурогене матичне ћелије говоре у прилог озбиљних нежељених ефеката трансплантације. Осим тога, туморске ћелије које су изоловане показале су мушки и женски фенотип, што значи да је пацијент примио матичне ћелије од најмање од два донора (13, 242, 243).

Нови проблем у регенеративној медицини је старење матичних ћелија (1, 22, 244-246). Иако се сматрало да вишеструко умножавање MSCs не утиче на њихове способности, последњи научни резултати су показали да матичне ћелије хематопоетског система, нервног ткива, мишићног ткива и цревног епитела, а у последње време и матичне ћелије масног ткива и зуба значајно губе на спектру потентности и диференцијације (22). Да би се одредио оптимални тренутак примене матичних ћелија важно је идентификовати биомаркере процеса старења ових ћелија, чиме се избегава трансплантација остарелих ћелија са смањеном функционалном активношћу (244-246). Промене хроматина и генске експресије, као и промене у дужини теломера, мутације ДНК, оксидациони стрес и модификације структуре протеина важни су биомаркери старења матичних ћелија (246, 247).

На крају, свакако не треба заобићи ни неопходност за изузетно скупом опремом и адекватним условима у лабораторијама у којима би се спроводили поступци изолације, култивације и циљане диференцијације, а касније и клиничке примене MSCs. За сада то у многоме онемогућава веће успехе у овој области (1, 248) (Схема 2).



Слика 10. Могућности и ограничења у примени MSCs

2. ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ истраживања је да се испита утицај физичких фактора, LLL-а и EMF-а, на вијабилност, морфологију, раст, пролиферацију, диференцијацију и старење MSCs.

У складу са основним циљем поставили смо следеће експерименталне задатке:

1. Прикупљање узорака хуманог поткожног масног ткива, дигестија узорака, прање и бројање добијених ћелија, изолација и карактеризација, култивација и диференцијација hAT-MSCs у адипоците, остеобласте и хондробласте.
2. Хистолошком анализом утврдити да ли примена LLL-а и EMF-а утиче на вијабилност, мења морфологију, убрзава раст и пролиферацију MSCs.
3. Испитати да ли примена LLL-а и EMF-а убрзава и побољшава диференцијацију MSCs у адипоците, остеобласте и хондробласте.
4. Утврдити да ли примена LLL-а и EMF-а утиче на процес старења MSCs.

Ови резултати могу бити основа за третман матичних ћелија овим агенсима пре клиничке апликације и третман пацијента овим агенсима након добијања матичних ћелија, у циљу бољег прихватања апликованих матичних ћелија.

3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

3.1. Врста студије

Експериментална студија на материјалу хуманог порекла *ex vivo* и *in vitro*.

3.2. Узимање узорака хуманог масног ткива

У експериментима су се користиле hAT-MSCs 12 људи старости 18-65 година. Учешће у истраживању било је на добровољној бази. Испитаницима је, након давања информација о планираним експериментима и писане сагласности за учешће у експериментима, током хируршке интервенције, која је раније заказана у циљу решавања здравственог проблема, узет узорак поткожног масног ткива из регије на којој је већ направљен хируршки рез.

Ex vivo и *in vitro* експерименти су се спровели у складу са одредбама Етичког комитета Државног универзитета у Новом Пазару и Опште болнице Нови Пазар. Сва истраживања су спроведена у складу са етичким принципима датим у Декларацији у Хелсинкију (енгл. *Helsinki Declaration*). Предузете су све мере да се заштити приватност учесника и тајност њихових личних података.

3.3. Дигестија масног ткива

Након узимања, узорци масног ткива (око 10 грама) убачени су у фосфатни пуфер (енгл. *Phosphate-buffered saline, PBS, Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY 14072, USA*) у који су додати антибиотици и антимицотици у одређеној концентрацији (енгл. *Antibiotic-Antimycotic solution, Gibco[®], Life Technologies, Carlsbad, CA, USA: 100 U/ml penicilin, 100 µ/ml streptomycin, 0,25 µ/ml amphotericin*). Узорци масног ткива су очишћени од крвних судова, испрани у PBS-у и исечени на ситне делове. Тако ситни делови масног ткива дигестирани су у раствору за дигестију: PBS са 0,2% хуманих серумских албумина (енгл. *human serum albumins, HSA, Sigma Chemical Company, St.*

Louis, MO) и колагеназом тип 1 (*Collagenase type I, Gibco Cat N° 171000-017*), концентрације 205 U/mg, у трајању од 30 до 60 минута на температури од 37°C. Колагеназа тип 1 се раствара у *Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO)* у складу са препоруком произвођача и раније публикованим протоколима (249-251). Након дигестије масног ткива, добијене ћелије су опране.

3.4. Прање ћелија

Ћелије су пране тако што су у 10 ml PBS-а или медијума са 2% FCS или FBS (*Gibco®*, *Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) центрифугиране на 1600 обртаја 5 минута. Након тога супернатант се одливао, а ћелијски талог ресуспендовао у жељеној запремини или концентрацији. Најчешће су ресуспендоване у 1 ml медијума у који су и биле сађене, тј. у *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12; Gibco®*, *Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)* са 10% FCS.

3.5. Бројање и култивација ћелија

Бројање се вршило у коморици за бројање ћелија, са две врсте боја: уз помоћ *Türk*-овог раствора учињена је ексклузија еритроцита, одмах после дигестије, а *Trypan blue exclusion assay*-ем (*Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany*) одредио се број живих, вијабилних ћелија са једром. У зависности од броја добијених ћелија од различитих узорака, ћелије су се садиле у петри шољице или флашкове. У петри шољицу (*BD Biosciences, San Jose, CA 9513, USA*) од 35 mm сађено је око 30 000 ћелија у 3 ml DMEM/F12 са 10% FCS. У фласк T25 (*BD, Falcon, NY, USA*) се садило око 150 000 ћелија у 10 ml DMEM/F12 са 10% FCS, а код узорака из којих се изоловао највећи број ћелија, у фласк T75 (*BD, Falcon, NY, USA*) сађено је 450 000 ћелија у 30 ml DMEM/F12 са 10% FCS. Ћелије су гајене у CO₂ инкубатору на 5% CO₂ (*Binder GmbH, Tuttlingen, Germany*) на температури од 37°C, након чега су трипсинизоване и субкултивисане у следеће пасаже. Трипсинизација је вршена са *TrypLE™ Express (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)* када су културе достигале 80-90% конfluence. Медијум је мењан свака 3 дана, а ћелије су анализиране у пасажама од 2-4.

3.6. Одређивање вијабилности и пролиферационе кинетике ћелија

Вијабилност представља способност ћелије за одрживост, тј. преживљавање. Број живих ћелија у суспензији је одређен помоћу *Trypan blue exclusion assay*-а. Метода се заснива на принципу да живе ћелије не апсорбују боју, док се мртве обоје плаво, јер боја продире у ћелију кроз оштећену ћелијску мембрану. Узорак ћелија из смеше исте запремине ћелијске суспензије и комерцијалне боје *Trypan blue* (*Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany*) се бројао у *Neubauer*-ом хемоцитометру употребом триокуларног инвертног микроскопа (*trinocular inverted microscope XDS-3, Optika, Italy*). Применом одговарајуће формуле, број ћелија се изрази на милилитар суспензије.

Време удвајања броја ћелија у култури (енгл. *Population Doubling Time – PDT*) одређено је на основу броја засађених ћелија и броја ћелија које су добијене након трипсинизације култура у тренутку када су ћелије достигле око 80-90% конфлуенце. PDT је добијен применом формуле:

$$PDT = t \times \left[\frac{\log_{10} 2}{\log_{10} N_t - \log_{10} N_o} \right] \quad (252),$$

где је N_o број засејаних вијабилних ћелија (одређено према *Trypan blue exclusion assay*-у), N_t број вијабилних ћелија након трипсинизације и t време (у сатима) између засађивања и трипсинизације ћелија.

3.7. Одређивање фенотипа добијених ћелија

Имунофенотипизација *ex vivo* експандираних ћелија, од друге до четврте пасаже, је извршена са следећим мишјим антихуманим антителима CD34 (PE коњуговано), CD29 (PECy5 коњуговано), CD73 (PE коњуговано), CD146 (PE коњуговано) и CD106 (FITC коњуговано). Након трипсинизације и испирања у хладном PBS/0,5% FCS, 2×10^5 ћелија је инкубирано са одговарајућим моноклонским антителима 30 минута на 4°C, потом су три пута испране (1500 обртаја/мин, 5 минута) и ресуспендоване за коначну анализу. За прецизно одређивање степене неспецифичног везивања антитела, коришћене су одговарајуће изотипске контроле (*BD Biosciences, San Jose, CA, SAD*). Све анализе су рађене на проточном цитометру *CyFlow CL (Partec, Münster, Germany)*.

3.8. Диференцијација ћелија *in vitro*

Диференцијација експандираних ћелија у смеру остеогенезе, хондрогенезе и адипогенезе изведена је коришћењем комерцијалних медијума (*Stem PRO Osteogenesis Kit*, *Stem PRO Chondrogenesis Kit*, *Stem PRO Adipogenesis Kit Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA).

Остеогенеза: након првих 48 сати по сађењу 5×10^3 ћелија у коморице, комплетан медијум за експанзију је замењен са *Stem PRO Osteogenesis* медијумом (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA). Половина диференцијационог медијума је мењана свака 2 дана током трајања остеогене диференцијације. Поједине културе су прекидане после 5 и 10 дана да би се утврдила активност алкалне фосфатазе. Преостале културе су након три недеље прекинуте, ћелије опране PBS-ом и обојене *Alizarin Red S* (*Sigma-Aldrich*).

Адипогенеза: првих 48 сати по сађењу 5×10^3 ћелија у коморице, комплетан медијум за експанзију је замењен са *Stem PRO Adipogenesis Kit Invitrogen* (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA). Половина диференцијационог медијума је мењана свака 2 дана током трајања адипогене диференцијације. После три недеље култивације ћелије су обојене *Oil Red S* бојом (*Sigma-Aldrich*) којом се доказује присуство масних капљица у ћелијама.

Хондрогенеза: после трипсинизације, ћелије су испране и ресуспендоване у *Stem PRO Chondrogenesis Kit* (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, USA) и култивисане на два начина. Први начин је подразумевао култивацију 2×10^5 ћелија у полипропиленским епруветама после центрифугирања на 1000 обртаја у минути, 5 минута, да би се добио тзв. ћелијски „*pellet*“. Други начин је подразумевао култивацију ћелија у хондрогеном медијуму у већ описаним коморицама. После две недеље ћелије су лизирани и одређена је концентрација гликозаминогликана (ГАГ), протеина и ДНК. Истовремено су за контролу свих наведених услова, ћелије гајене у медијуму за експанзију.

Квантификација диференцијације одређена је анализом добијених слика помоћу софтвера *ImageJ* начином који је дат као пример за квантификацију бојења јетриног ткива (<http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/examples/stained-sections/index.html>). Исти пример коришћен је и у раније објављеним радовима (253-255).

3.9. Узорковање *hAT-MSCs*

Након потпуне карактеризације, *hAT-MSCs* су методом прости рандомизације биле распоређене у следеће групе (Схема 3):

- К (контролна група): 18×10^5 *hAT-MSCs* које нису третиране LLL-ом и EMF-ом.
- E1 (експериментална група 1, *hAT-MSCs* третиране LLL-ом): 18×10^5 *hAT-MSCs* које су третиране LLL-ом 7 дана, таласном дужином ласерског снопа од 808 nm, различитом енергијом зрачења (интензитетом), снагом и густином снаге LLL-а.
- E2 (експериментална група 2, *hAT-MSCs* третиране EMF-ом): 18×10^5 *hAT-MSCs* које су третиране EMF-ом 7 дана, различитом фреквенцом и интензитетом EMF-а.
- E3: (експериментална група 3, *hAT-MSCs* третиране LLL-ом и EMF-ом): 18×10^5 *hAT-MSCs* које су третиране LLL-ом и EMF-ом 7 дана, таласном дужином ласерског снопа од 808 nm, различитом енергијом зрачења (интензитетом), снагом и густином снаге LLL-а и различитом фреквенцом и интензитетом EMF-а.

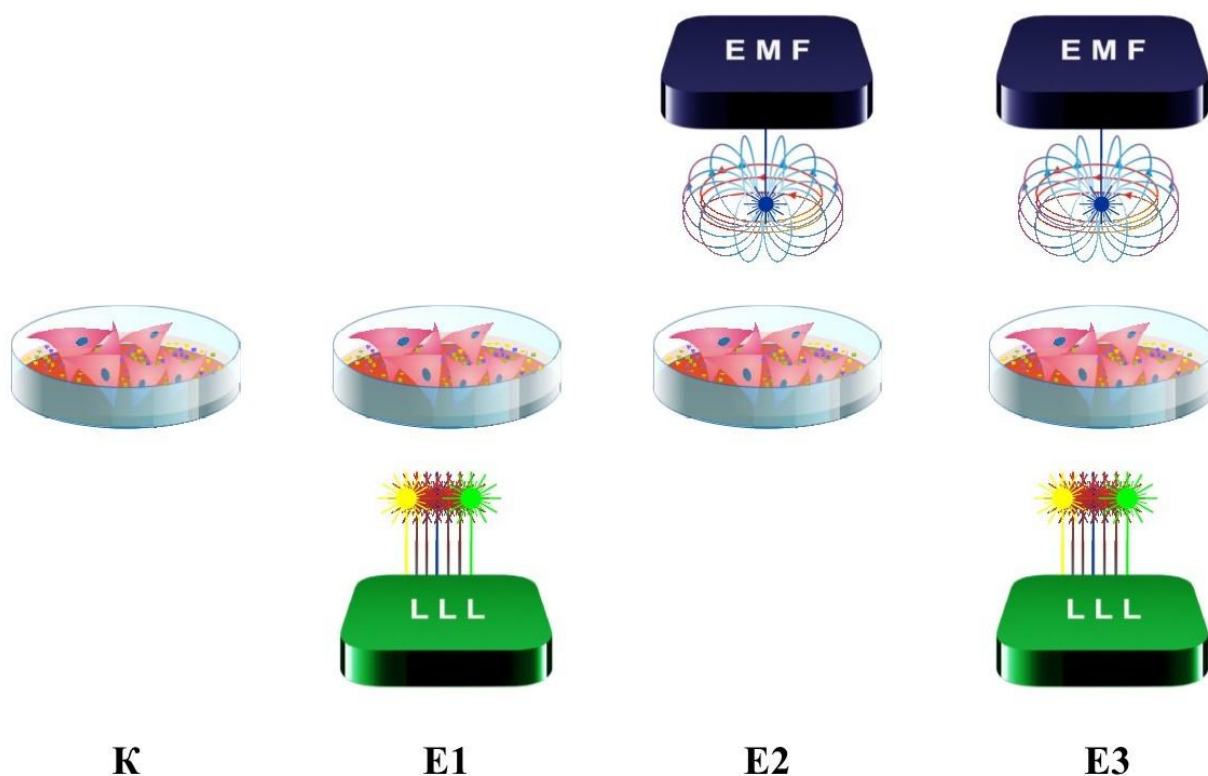


Схема 3. Подела *hAT-MSCs* у групе: **К** (контролна група); **E1** (експериментална група 1, *hAT-MSCs* третиране LLL-ом); **E2** (експериментална група 2, *hAT-MSCs* третиране EMF-ом); **E3** (експериментална група 3, *hAT-MSCs* третиране LLL-ом и EMF-ом)

3.10. Третман hAT-MSCs LLL-ом

Третман hAT-MSCs LLL-ом спроведен је по узору на претходне експерименте, уз мале измене (256). Коришћен је комерцијални апарат *EkoMedico-Laser (Electronic Design, Belgrade, Serbia)*, са галијум-алуминијум-арсенидном (GaAlAs) диодом, таласне дужине 808 nm, површином попречног пресека ласерског снопа 1 cm^2 , континуиране емисије зрачења, оптичке снаге ласерског снопа 200 mW и густине ласерског снопа 0.2 W/cm^2 . Време емисије зависило је од жељене густине енергије која се предаје, а у низу експеримената у различитим групама пратио се ефекат након 1 J/cm^2 , 3 J/cm^2 , 5 J/cm^2 и 10 J/cm^2 предате енергије. Ћелије су третиране једном дневно, током 7 дана у шестокоморним пластичним микроплочама (*6-well flat-bottom plate, tissue culture-treated, Falcon[®], USA*). Густина енергије мерена је и проверавана помоћу апарата *Gentec*, модел SOLO 2, XLP12-3S-DO (*Quebec, Canada*).

3.11. Третман hAT-MSCs EMF-ом

Третман hAT-MSCs EMF-ом спроведен је, такође, по узору на претходне експерименте, уз мале измене (257). Коришћен је комерцијални апарат *EkoMedico (Electronic Design, Belgrade, Serbia)*, а преко магнетних јастучића, континуираном емисијом и фреквенцом од 50 Hz ћелије су третиране електромагнетним пољем интензитета 1 mT, 3 mT, 5 mT и 10 mT. Третман се спроводио једном дневно, током 7 дана у шестокоморним пластичним микроплочама (*6-well flat-bottom plate, tissue culture-treated, Falcon[®], USA*). Снага је мерена и проверавана помоћу апарата *Hirst Gaussmeter GM 05*, са сондом PT 2837 (*Hirst Magnetic Instruments Ltd, Tesla House, Tregonigie, Cornwall, UK*).

3.12. Заједнички третман hAT-MSCs LLL-ом и EMF-ом

hAT-MSCs никад раније нису третиране истовремено LLL-ом и EMF-ом. Користили смо оне параметре LLL-а и EMF-а који су показали најбољи ефекат у стимулацији пролиферације и диференцијације hAT-MSCs.

3.13. Одређивање активности β -галактозидазе

Активност β -галактозидазе (енгл. *Senescence-associated β -galactosidase* - SA- β -Gal) за коју се сматра да је маркер старења ћелија, одређена је коришћењем комерцијалног кита *Senescence Cells Histochemical Staining kit* (*Sigma-Aldrich*) према инструкцијама произвођача и по узору на раније експерименте (258). hAT-MSCs (2×10^3) су култивисане у коморицама (енгл. *Multiwell Glass Chamber Slides*, *BD Biosciences*) пре и након третмана LLL-ом и EMF-ом у дозама које су показале најбољи ефекат у стимулацији пролиферације и диференцијације. Након испирања у PBS-у ћелије су фиксиране комерцијалним фиксативом 5 минута на собној температури, инкубиране на 37 °C током ноћи у свеже припремљеном раствору за бојење који је садржао X-Gal (5-бром-4-хлор-3-индолил ПЗ-Д-галактопиранозиду) у раствору чији је pH 6.0. Ћелије су потом испране у PBS-у и контрастиране бојом *Neutral Red* (*Merck*). Цитоплазма ћелија које садрже SA- β -Gal се бојила зелено. Процент обојених ћелија је одређиван на узорку од 300 ћелија. Према нивоу активности β -галактозидазе, све позитивне ћелије су означене као слабо (+), умерено (++) или високо позитивне (+++) (258). Све анализе су урађене након третмана LLL-ом и EMF-ом у дозама које су показале најбољи ефекат у стимулацији пролиферације и диференцијације hAT-MSCs у 3. и 10. пасажи.

3.14. Оксидативни стрес и антиоксидативни капацитет третираних hAT-MSCs

Након третмана LLL-ом и EMF-ом у дозама које су показале најбољи ефекат у стимулацији пролиферације и диференцијације, hAT-MSCs су трипсинизоване, пребачене у посебне епрувете и центрифугиране 5 минута на 2500 обртаја/минути на 4°C, како би се уклонио медијум за култивисање. Ћелије су испране хладним PBS-ом и после поновног центрифугирања (5 мин, 2500 обртаја/мин. на 4°C), 1×10^6 ћелија је ресуспендовано у 1 ml PBS-а. Ова суспензија ћелија коришћена је за даљу анализу.

3.14.1. NBT assay

Тест редукције нитроплавог тетразолијума (енгл. *Nitroblue tetrazolium*), NBT assay (*Sigma Aldrich, Darmstadt, Germany*) се користио за одређивање синтезе супероксид-анјона (O_2^-) у ћелијама (259). Суспензија 1×10^6 третираних hAT-MSCs распоређена је у 96-коморну плочу и то тако што је у свако поље помешано по 100 μ l суспензије ћелије са 100 μ l 0,1% NBT. После инкубације 45 минута на 37° у атмосфери која садржи 5% CO₂, концентрација O_2^- одређена је помоћу ELISA *microplate reader* (*Rayto Rt-6100, China*) и изражена као μ mol/10⁶ ћелија.

3.14.2. Одређивање концентрације хидроген пероксида (H₂O₂) и нитрита (NO₂⁻)

За одређивање концентрације H₂O₂ и NO₂⁻ ћелијска мембрана третираних hAT-MSCs разграђена је замрзавањем (-80°C) и отапањем (37°C) третираних hAT-MSCs у 3 циклуса од по 15 минута, након чега је следило 20-о минутно центрифугирање на 4500 обртаја у минути при температури од 4°C (260-262). Концентрације H₂O₂ и NO₂⁻ су одређене у супернатанту. Одређивање H₂O₂ засновано је на оксидацији фенол црвеног у присуству пероксидазе рена (енгл. *horseradish peroxidase*, HRP), као катализатора (261). Утврђивање концентрације NO₂⁻, као индикатора концентрације азотног оксида (NO), учињено је помоћу *Griess* методе (262). Концентрације H₂O₂ и NO₂⁻ одређене су помоћу ELISA *microplate reader* (*Rayto Rt-6100, China*) и изражене у μ mol/10⁶ ћелија.

3.14.3. Одређивање концентрације редукованог (GSH) и оксидованог глутатиона (GSSG)

За мерење концентрације GSH и GSSG користили смо супернатант добијен следећим поступком: суспензија ћелије је центрифугирана 5 минута на 2500 обртаја у минути, при 4°C. После уклањања супернатанта, пелета је ресуспендована у 2,25% сулфосалицилне киселине. Ћелијске мембране су лизирание замрзавањем (-80°C) и отапањем (37°C) третираних hAT-MSCs у 3 циклуса од по 15 минута, након чега је следило 20-о минутно центрифугирање на 4500 обртаја у минути при температури од

4°C. Концентрација GSH је одређена на основу GSH оксидације помоћу 5,5-дитио-бис-6,2-нитробензојеве киселине (263). Концентрација GSSG је ензимски одређена глутатион редуктазом (264) након инхибиције GSH оксидације помоћу 4-винилпиридина. Концентрације GSH и GSSG одређене су помоћу ELISA *microplate reader* (Rayto Rt-6100, China) и изражена у $\mu\text{mol}/10^6$ ћелија.

3.15. Фрактална анализа

Математичка интерпретација хистолошких слика један је од значајних задатака чији је циљ откривање потенцијалних абнормалности. Примена фракталне геометрије у анализи слике своди се на евалуацији фракталне димензије или лакунарности. Квантификација анализираних слика већим делом се ослања на употребу традиционалних математичких метода заснованих на линеарној анализи. С друге стране, фрактална анализа, као облик нелинеарне анализе, даје много више података о комплексности неке анатомске или хистолошке структуре, које класична Еуклидова геометрија није у стању да адекватно опише и квантификује (265).

3.15.1. Добијање и графичка обрада фотографија третираних hAT-MSCs

Дигиталне фотографије третираних hAT-MSCs добијене су помоћу тринокуларног инвертног микроскопа (XDS-3, *Optika, Italy*), камере *Moticam 2500 (Motic Deutschland GmbH, Germany)*, и *Motic Images Plus 2.0ML* софтвера. Након прикупљања фотографија, обрада је учињена помоћу софтвера *JMicroVision* (верзија 1.2.7, <http://jmicrovision.com>). Контуре третираних hAT-MSCs су касније трансформисане у одговарајуће бинарне (црне и беле) слике. Укупно 101 фотографија (K=35, E1=23, E2=22, E3=21) које су садржале по једну третирану hAT-MSC коришћене су за фракталну и морфометријску анализу.

3.15.2. Фрактална анализа попуњавања простора и величине третираних hAT-MSCs

Да би се анализирале промене у облику, тј. попуњавање простора третираних hAT-MSCs примењен је *box-counting* метод. Овим приступом добијена дигитална фотографија прекрива се мрежом квадратића (са величином ћелије r) и изражава као број пиксела. Број квадрата, $N(r)$, потребан за прекривање целе фотографије ћелије израчунава се једначином:

$$N(r) = \text{const} \cdot r^{-D_B},$$

где је D_B димензија квадратића, добијена као апсолутна вредност угла *log-log* односа између $N(r)$ и r (266).

Да би се умањио утицај ротационих варијација на вредност фракталне димензије (ФД) сви фотографија третиране hAT-MSCs је постављена централно и окренута тако да је њена најдужа оса паралелно са у осом. Коначне слике које су коришћене за мерење фракталне димензије сачуване су у *.tiff* формату димензија 5255×7005 пиксела, резолуције 300 dpi, и дубине бита 24. ФД третираних hAT-MSCs одређена је помоћу софтвера *JMicroVision* (верзија 1.2.7, <http://jmicrovision.com>) користећи команду *Fractal Box Count* (пут: *ImageJ>Analyze>Tools>Fractal Box Count*). Величине квадратића које су коришћене за бројање ФД су 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048, 4096 и 8192, које су добијене као растућа геометријска прогресија од 2^n , где је $n=0, 1, 2, \dots, 13$, метод који се користио у ранијим истраживањима (267, 268).

Поред ФД, површина ћелије на добијеним фотографијама је анализирана и софтвером *ImageJ*. Израчунавање је извршено коришћењем скале у микрометрима, а резултати за сваку ћелију изражени су у квадратном микрометру.

3.16. Статистичка обрада података

Подаци ће бити приказани као $Mean \pm SD$. За анализу података користиће се параметријски или непараметријски тестови у односу на нормалност расподеле, која ће бити одређена *Shapiro-Wilk* тестом. Статистички значајна разлика у добијеним вредностима између група износиће $p < 0.05$, док ће статистички веома значајна разлика бити $p < 0.01$. За статистичку обрада свих података користиће се SPSS пакет, верзија 20.0. *Microsoft Excel* ће се користити за креирање графикона и табела.

4. РЕЗУЛТАТИ

4.1. Физикални преглед пацијената, донора масног ткива

На основу општег физикалног прегледа закључено је да пацијенти, донори масног ткива, нису испољавали клиничке знаке за болести коштаног-зглобног и мишићног система, нити инфективни синдром. 12 пацијената, оба бола, старости 18-65 година хируршки је лечено због препонске киле (херниопластика) и калкулозе жучне кесе (холецистектомија) (Табела 8), те та патологија није утицала на карактеристике масног ткива и изолованих матичних ћелија.

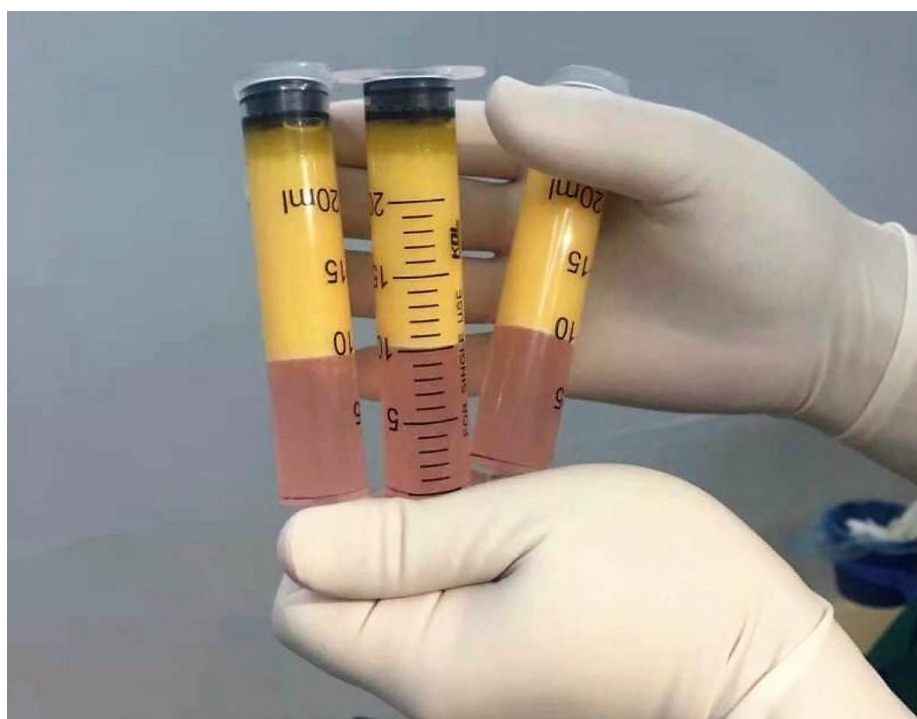
Табела 8. Подаци о донорима масног ткива

Донор	Пол	Старост	Хируршка интервенција
1.	Мушки	18	херниопластика
2.	Мушки	34	холецистектомија
3.	Женски	49	холецистектомија
4.	Женски	61	холецистектомија
5.	Мушки	24	херниопластика
6.	Женски	55	холецистектомија
7.	Женски	65	холецистектомија
8.	Женски	19	херниопластика
9.	Мушки	48	херниопластика
10.	Мушки	33	херниопластика
11.	Женски	60	холецистектомија
12.	Мушки	52	херниопластика

4.2. Карактеристике изолованих hAT-MSCs

4.2.1. Број и пролиферациона кинетика изолованих ћелија

Након дигестије узорака масног ткива и прања добијене суспензије (Слика 11), ћелије су се пре засејавања бројале, а након тога се пратила њихова пролиферациона кинетика. На слици 11 виде се дигестирани узорци масног ткива, а у табели 9 приказани су подаци о добијеном броју вијабилних ћелија и времену потребном за дуплирање тог броја ћелија.



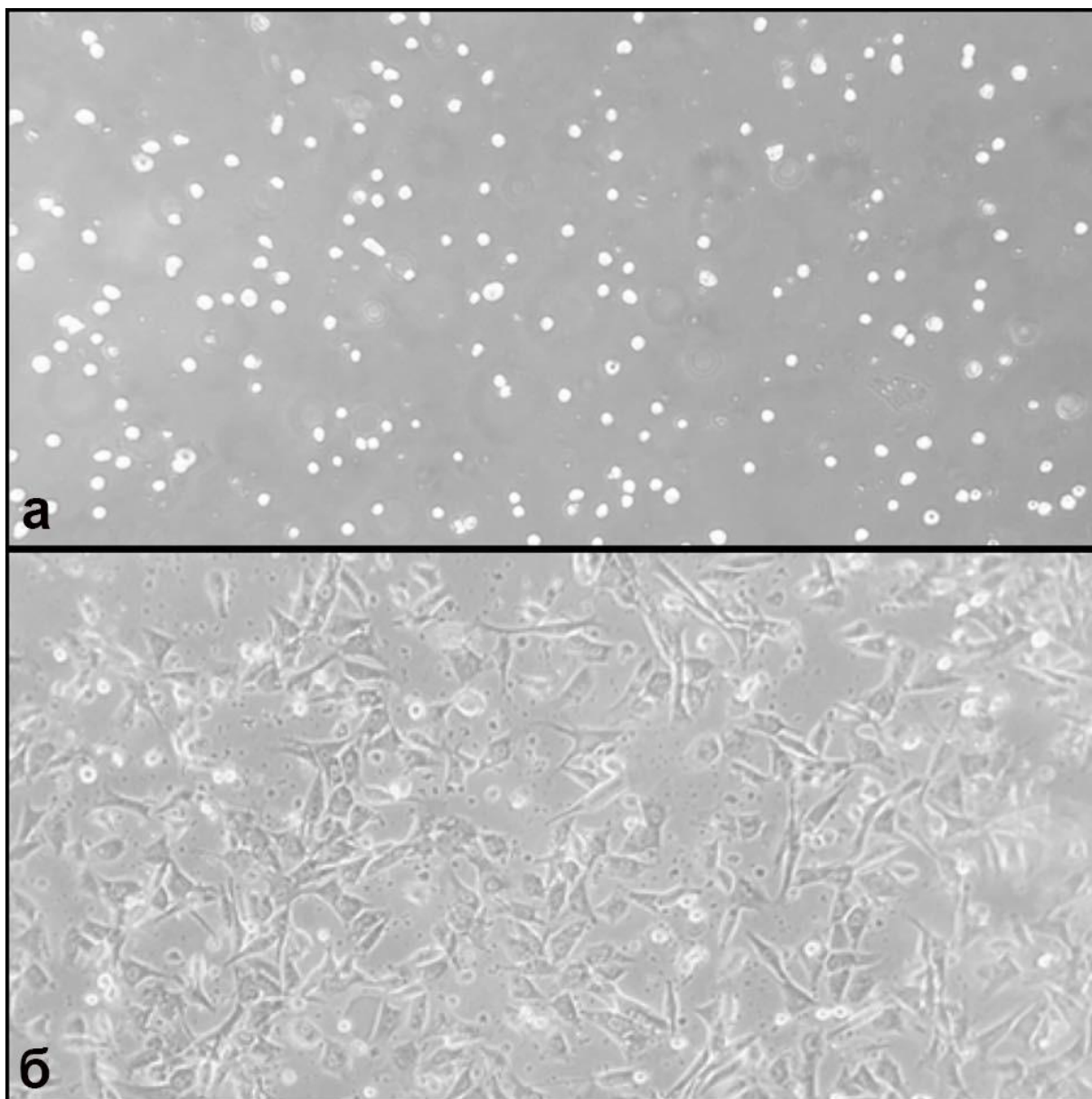
Слика 11. Дигестирани узорци масног ткива

Табела 9. Број добијених вијабилних ћелија након дигестије узорака масног ткива и прања добијене суспензије и време удвајања тих ћелија

Донор	Број ћелија	Време удвајања (у сатима)
1.	$1,2 \times 10^6$	32
2.	$0,7 \times 10^6$	35
3.	$1,3 \times 10^6$	36
4.	$1,1 \times 10^6$	36
5.	$1,0 \times 10^6$	34
6.	$1,4 \times 10^6$	37
7.	$1,2 \times 10^6$	33
8.	$0,8 \times 10^6$	35
9.	$1,5 \times 10^6$	35
10.	$1,3 \times 10^6$	37
11.	$0,9 \times 10^6$	32
12.	$1,1 \times 10^6$	34

4.2.2. Морфологија изолованих ћелија

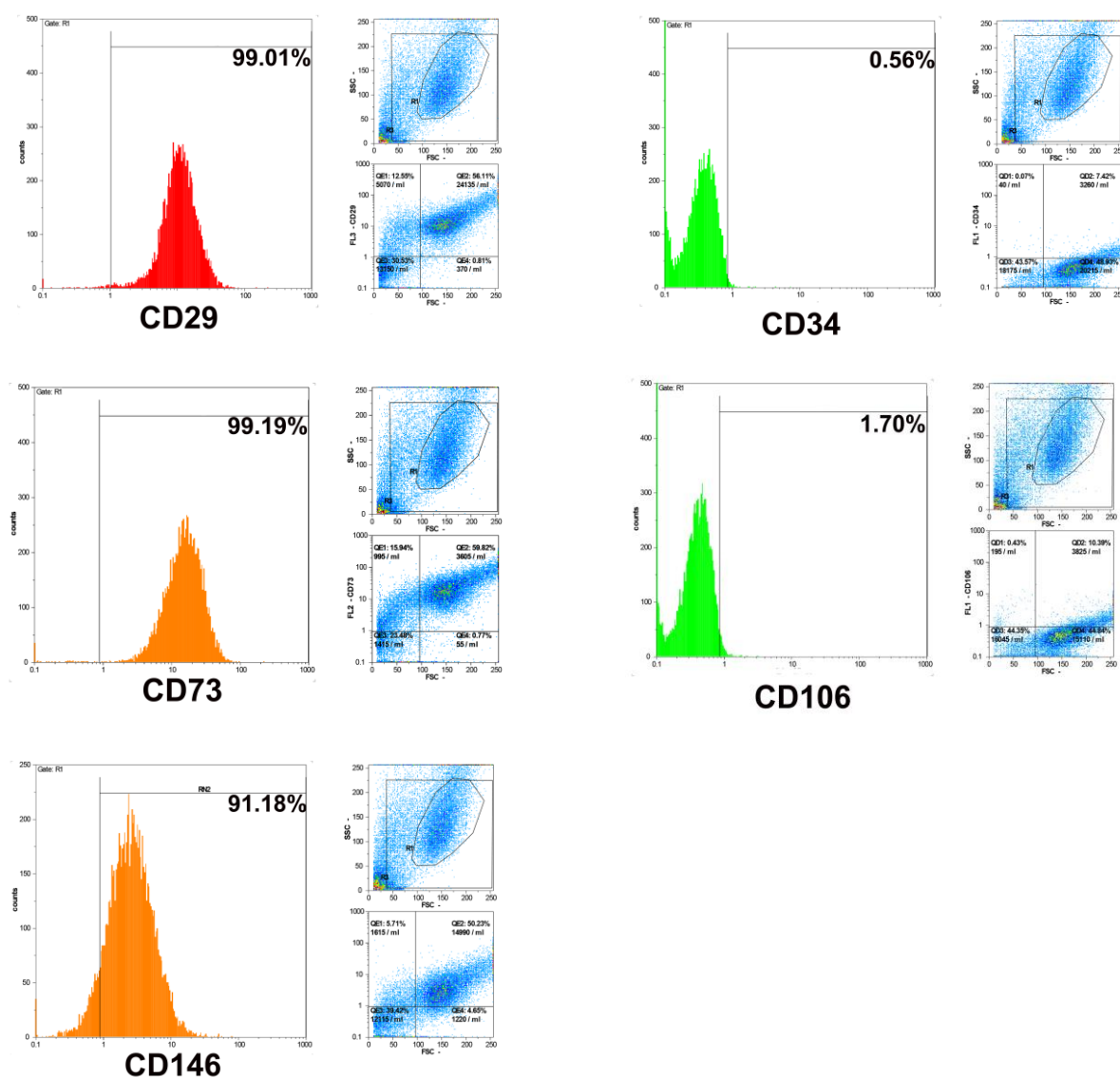
Све адхерентне ћелије су се залепиле за пластичну подлогу за 24 сата, а просечно за 7-10 дана култивације достигале су 80-90% конфлуенце (Слика 12), након чега су трипсинизоване и субкултивисане у следеће пасаже. Постепено су од овалног облика добијале фибробластичну морфологију.



Слика 12. Репрезентативни приказ тек засађених ћелија (а) и адхерентних ћелија након 3 дана од засађивања (б).

4.2.3. Имунофенотипизација добијених ћелија

Ћелије од 2-4. пасаже коришћене су за имунофенотипизацију. Изоловане ћелије експримираше маркере специфичне за мезенхималне матичне ћелије CD29, CD73 и CD146 (99.01, 99.19 и 91.18 %, редом), а истовремено нису поседовале антигене карактеристичне за хематопоетске ћелије, CD34 и CD106 (0.56 и 1.7 %, редом) (Слика 13).



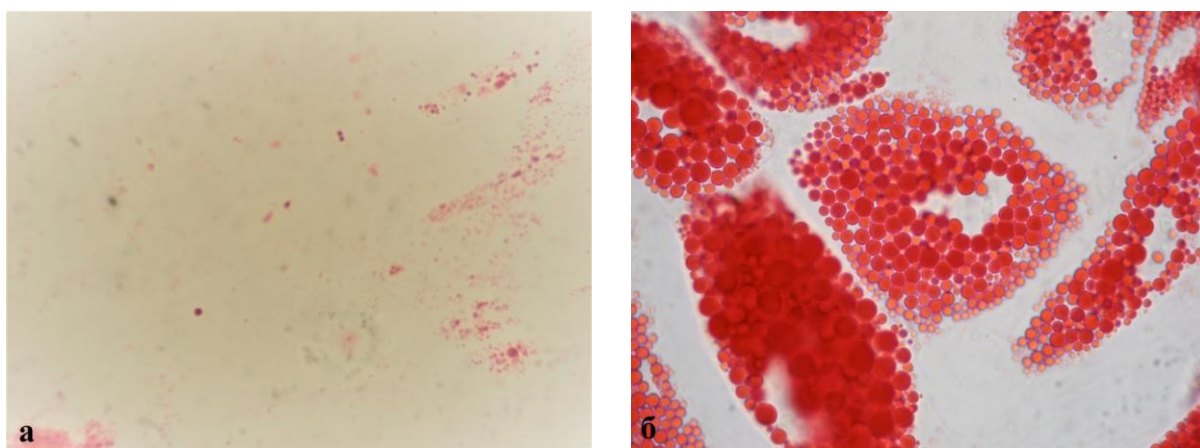
Слика 13. Имунофенотипски профил ћелија изолованих из масног ткива.

Репрезентативни приказ хистограма са експресијом ћелијских маркера CD29, CD73, CD146, CD34 и CD106.

4.2.4. Диференцијација добијених ћелија

4.2.4.1. Адипогене диференцијација

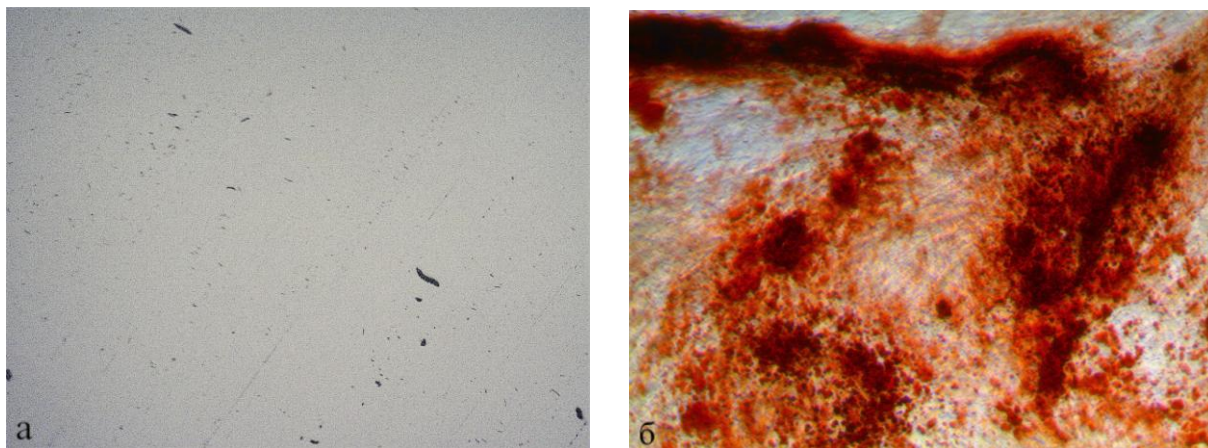
Након 21 дан култивације, ћелије које су гајене у контролном медијуму (DMEM/F-12 са 10% FCS) нису формирале крупне липидне капи у својој цитоплазми (Слика 14а), за разлику од ћелија које су узгајане у адипогеном медијуму. Код ћелија које су стимулисане диференцијационим медијумом, након бојења са *Oil Red O*, регистроване су крупне масне капљице које су се бојиле црвено (Слика 14б).



Слика 14. Адипогена диференцијација добијених ћелија; **а** – ћелије гајене у контролном медијуму (DMEM/F-12 са 10% FCS), **б** – ћелије гајене у диференцијационом медијуму (*Stem PRO Adipogenesis Kit Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*)

4.2.4.2. Остеогена диференцијација

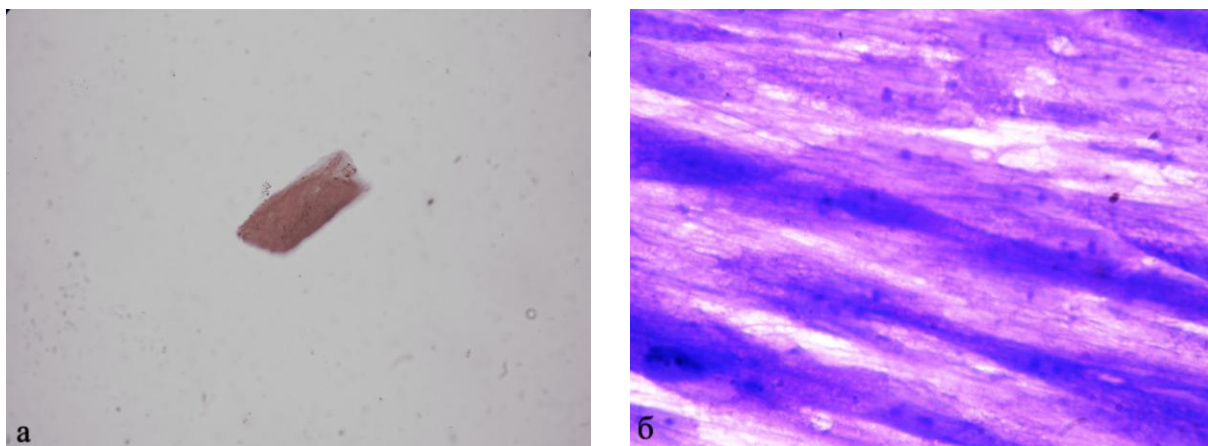
Након три недеље култивације ћелија у остеогеном медијуму, бојењем *Alizarin Red* су потврђени агрегати калцијум-фосфата у екстрацелуларном матриксу који су се бојили црвеном бојом (Слика 15б), за разлику од контролне групе (Слика 15а), где није примећено формирање накупина калцијума.



Слика 15. Остеогена диференцијација добијених ћелија; **а** – ћелије гајене у контролном медијуму (DMEM/F-12 са 10% FCS), **б** – ћелије гајене у диференцијационом медијуму (*Stem PRO Osteogenesis Kit Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*)

4.2.4.3. Хондрогена диференцијација

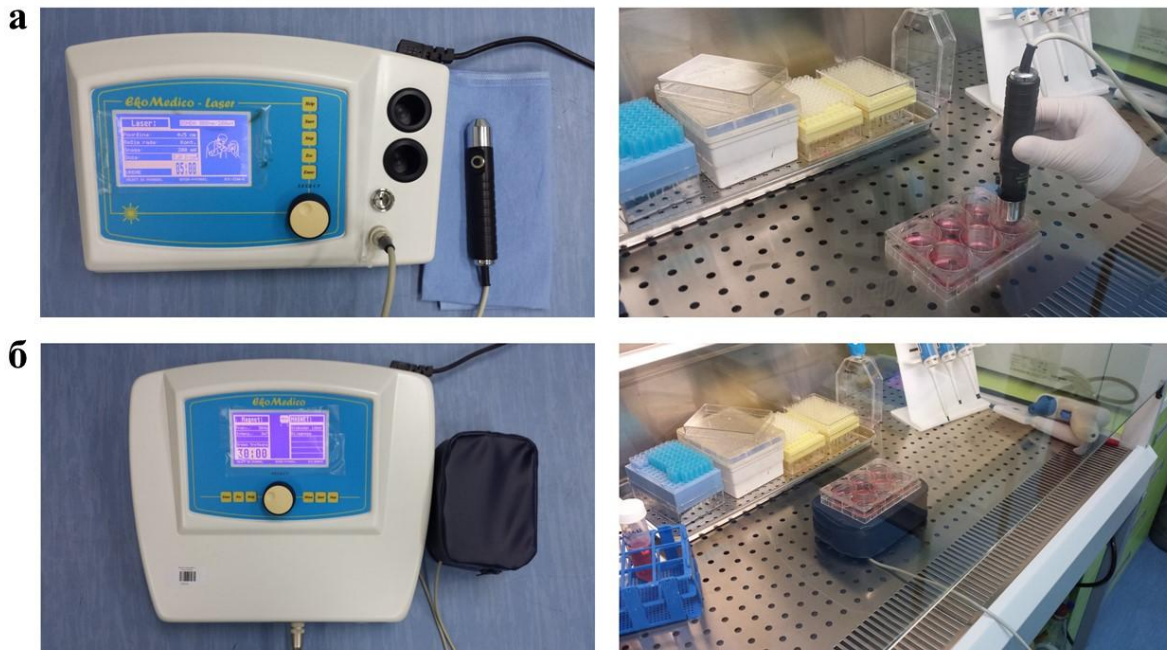
Медијум за хондрогену диференцијацију је након 21 дан стимулисао недиференциране ћелије да крену пут хондробласта и лаче хондроитин-сулфат, што је *Toluidin Blue* бојење и потврдило (Слика 16б). Ћелије које су биле у контролном медијуму нису поседовале екстрацелуларни матрикс богат гликозаминогликанима (Слика 16а).



Слика 16. Хондрогена диференцијација добијених ћелија; **а** – ћелије гајене у контролном медијуму (DMEM/F-12 са 10% FCS), **б** – ћелије гајене у диференцијационом медијуму (*Stem PRO Chondrogenesis Kit Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*)

4.3. LLL у дози од 3 J/cm^2 и EMF у дози од 3 mT најуспешније стимулишу пролиферацију третираних ћелија

Пошто је доказано да су изоловане ћелије из масног ткива мезенхималне матичне ћелије и након што су умножене у довољном броју, учињен је третман изолованих hAT-MSCs LLL-ом и EMF-ом (Слика 17).



Слика 17. Третман изолованих hAT-MSCs LLL-ом и EMF-ом. Коришћени су апарати *EkoMedico-Laser* и *EkoMedico* (*Electronic Design*, Београд, Србија)

Ћелије су најпре посебно третиране LLL-ом различите густине енергије и EMF-ом различитог интензитета, са циљем да се открију параметри који су најоптималнији за стимулацију пролиферације и диференцијације.

На графику 1 приказана је пролиферациона кинетика hAT-MSCs након 7-одневног третмана LLL-ом густине енергије 1 J/cm², 3 J/cm², 5 J/cm² и 10 J/cm². 1x10⁵ ћелија је засађено и сваког дана третирано комерцијалним апаратом, а дозе су одабране у складу са најчешће коришћеним дозама у клиничкој пракси. Резултати показују да је доза од 3 J/cm² предате енергије била најефикаснија у убрзању дељења и увећању броја ћелија. То је подразумевало и значајно скраћење времена дуплирања ћелија.

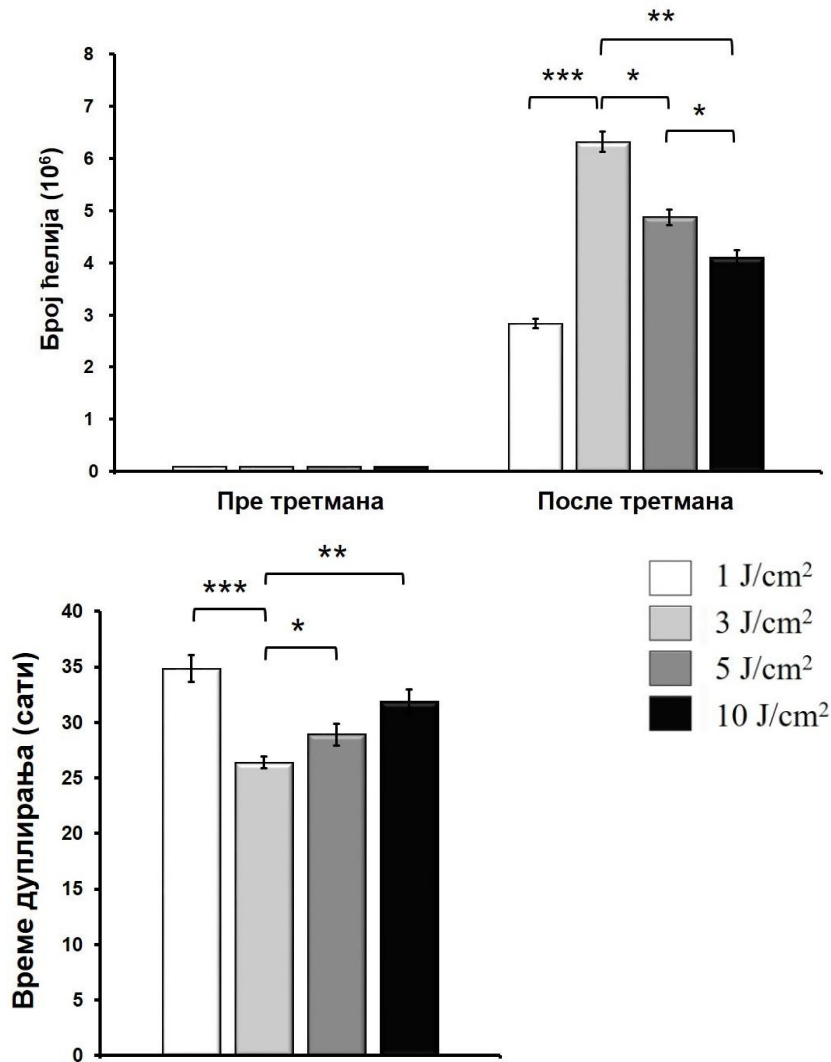


График 1. Пролиферациона кинетика и време дуплирања hAT-MSCs након 7-одневног третмана LLL-ом густине енергије 1 J/cm², 3 J/cm², 5 J/cm² и 10 J/cm². Резултати су представљени кад средња вредност ± стандардна девијација; *p < 0.05; **p < 0.01;

***p < 0.001

На графику 2 приказана је пролиферациона кинетика hAT-MSCs након третмана EMF-ом интензитета 1 mT, 3 mT, 5 mT и 10 mT који је трајао 7 дана. 1×10^5 ћелија је засађено и сваког дана третирано комерцијалним апаратом 30 минута у исто време, а дозе су, такође, одабране у складу са најчешће коришћеним дозама у клиничкој пракси. Резултати показују да је доза од 3 mT интензитета била најделотворнија у стимулацији пролиферације. Анализирајући и време дуплирања ћелија, види се да је та доза била сигнификантно ефикаснија у скраћењу тог периода, у односу на друге.

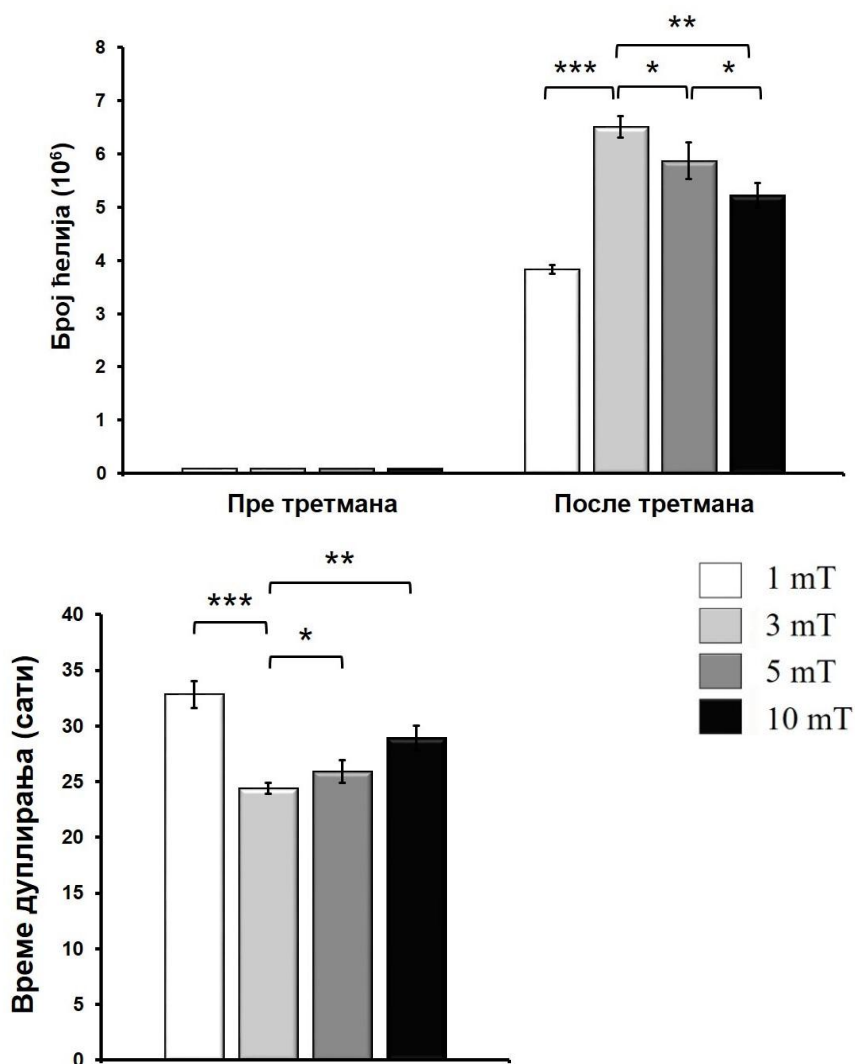
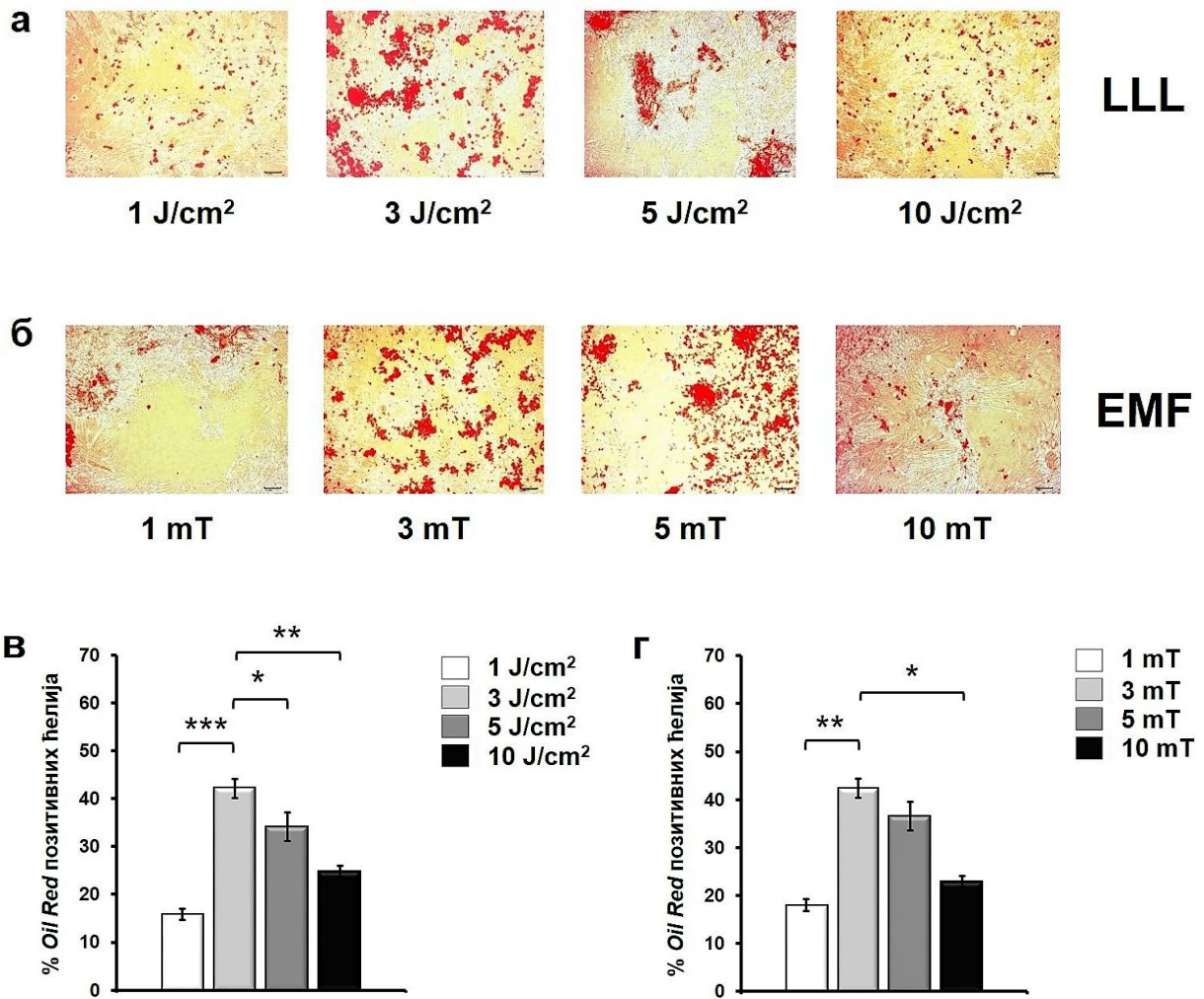


График 2. Пролиферациона кинетика и време дуплирања hAT-MSCs након 7-дневног третмана EMF-ом густине енергије 1 mT, 3 mT, 5 mT и 10 mT. Резултати су представљени кад средња вредност \pm стандардна девијација; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

4.4. LLL у дози од 3 J/cm² и EMF у дози од 3 mT најуспешније стимулишу диференцијацију третираних ћелија

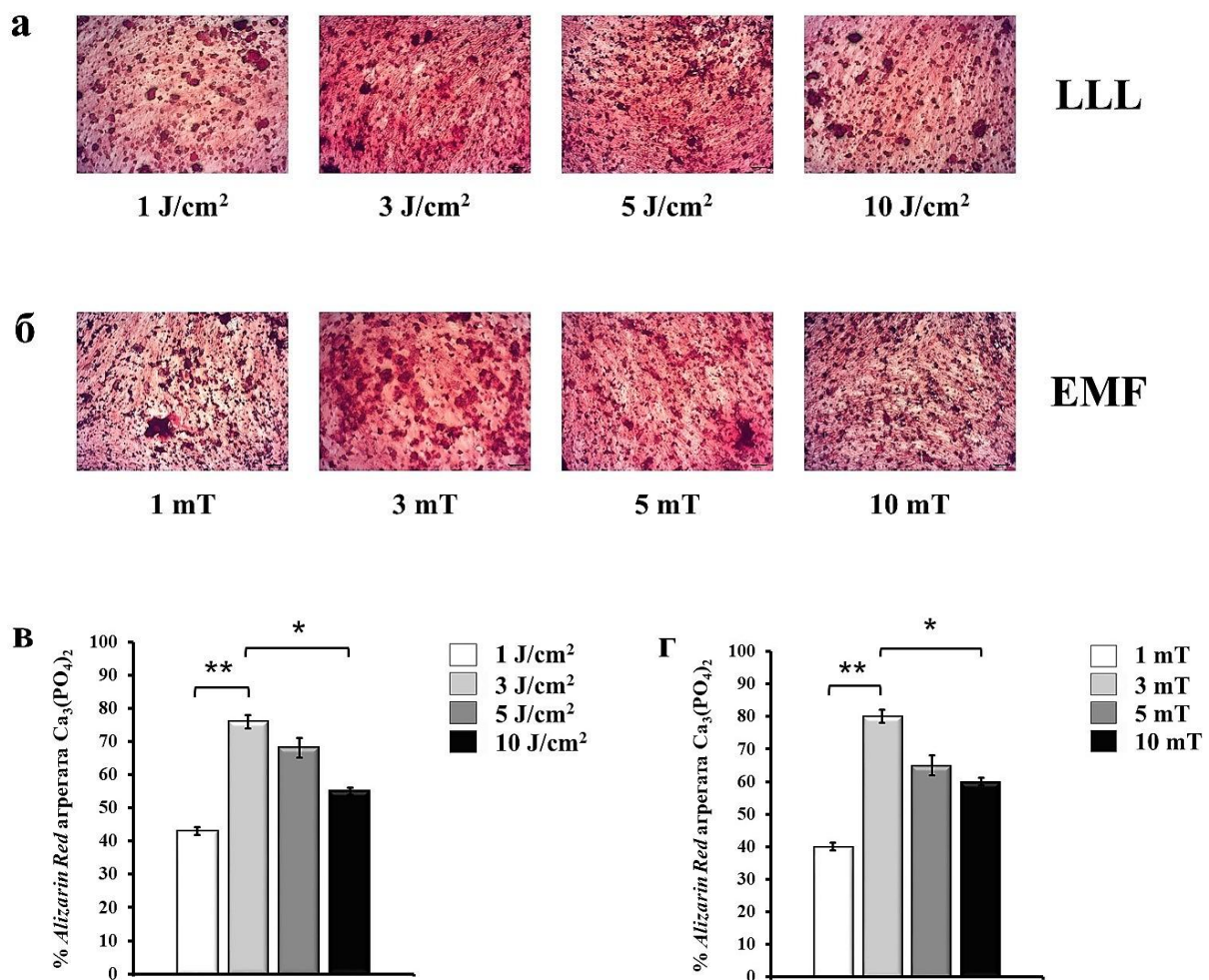
У наставку експеримената, испитан је утицај различитих доза LLL-а и EMF-а на диференцијацију hAT-MSCs.

Адипогена диференцијација спроведена је током 21 дан, ћелије су гајене у адипогеном медијуму и сваког дана третиране посебно LLL-ом густине енергије 1 J/cm², 3 J/cm², 5 J/cm² и 10 J/cm² и EMF-ом густине енергије 1 mT, 3 mT, 5 mT и 10 mT. Након спроведене диференцијације, урађена је квантификација анализом добијених слика помоћу софтвера *ImageJ*. Код ћелија које су стимулисане диференцијационим медијумом и третиране LLL-ом густине енергије 3 J/cm² (Слика 18а) и EMF-ом густине енергије 3 mT (Слика 18б), након бојења са *Oil Red O*, регистрована је ефикаснија диференцијација у виду крупних масних капљица које су се бојиле црвено у односу на друге параметре LLL-а и EMF-а (Слика 18в).



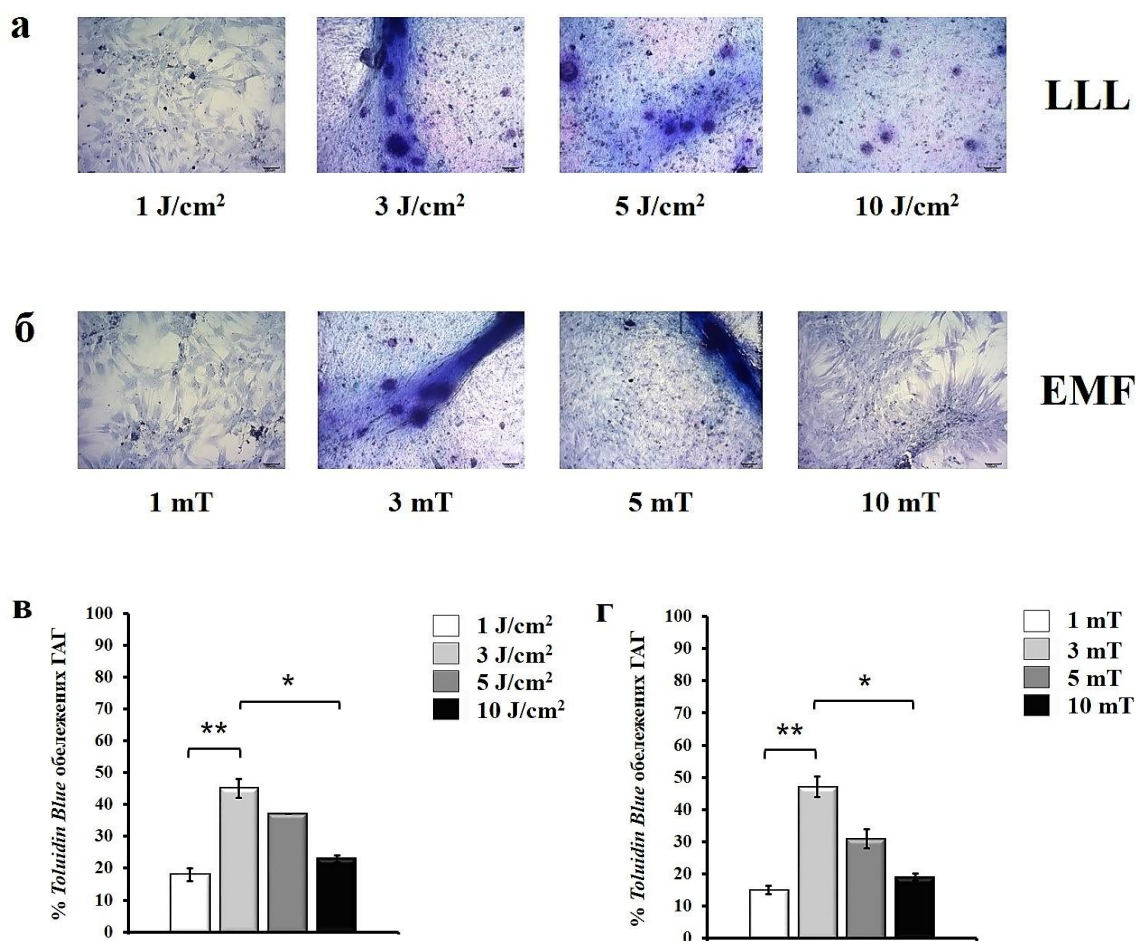
Слика 18. Репрезентативне слике адипогене диференцијације hAT-MSCs третираних различитим дозама LLL-а (**а**) и EMF-а (**б**) и квантификација диференцијације помоћу софтвера *ImageJ*-а након третмана LLL-ом (**в**) и EMF-ом (**г**). Резултати су представљени кад средња вредност ± стандардна девијација; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$;

Остеогена диференцијација, такође је спроведена током три седмице. Ћелије су гајене у остеогеном медијуму и сваког дана третиране посебно LLL-ом густине енергије 1 J/cm², 3 J/cm², 5 J/cm² и 10 J/cm² и EMF-ом густине енергије 1 mT, 3 mT, 5 mT и 10 mT. Након 21 дан, урађена је квантификација анализом добијених слика помоћу софтвера *ImageJ*. Код ћелија које су стимулисане диференцијационим медијумом и третиране LLL-ом густине енергије 3 J/cm² и 5 J/cm² (Слика 19а) и EMF-ом густине енергије 3 mT и 5 mT (Слика 19б), након бојења са *Alizarin Red* регистрована је ефикаснија диференцијација у виду агрегата калцијум-фосфата у екстрацелуларном матриксу који су се бојили црвеном бојом у односу на друге параметре LLL-а и EMF-а (Слика 19в и 19г).



Слика 19. Репрезентативне слике остеогене диференцијације hAT-MSCs третираних различитим дозама LLL-а (а) и EMF-а (б) и квантификација диференцијације помоћу софтвера *ImageJ*-а након третмана LLL-ом (в) и EMF-ом (г). Резултати су представљени кад средња вредност ± стандардна девијација; *p < 0.05; **p < 0.01.

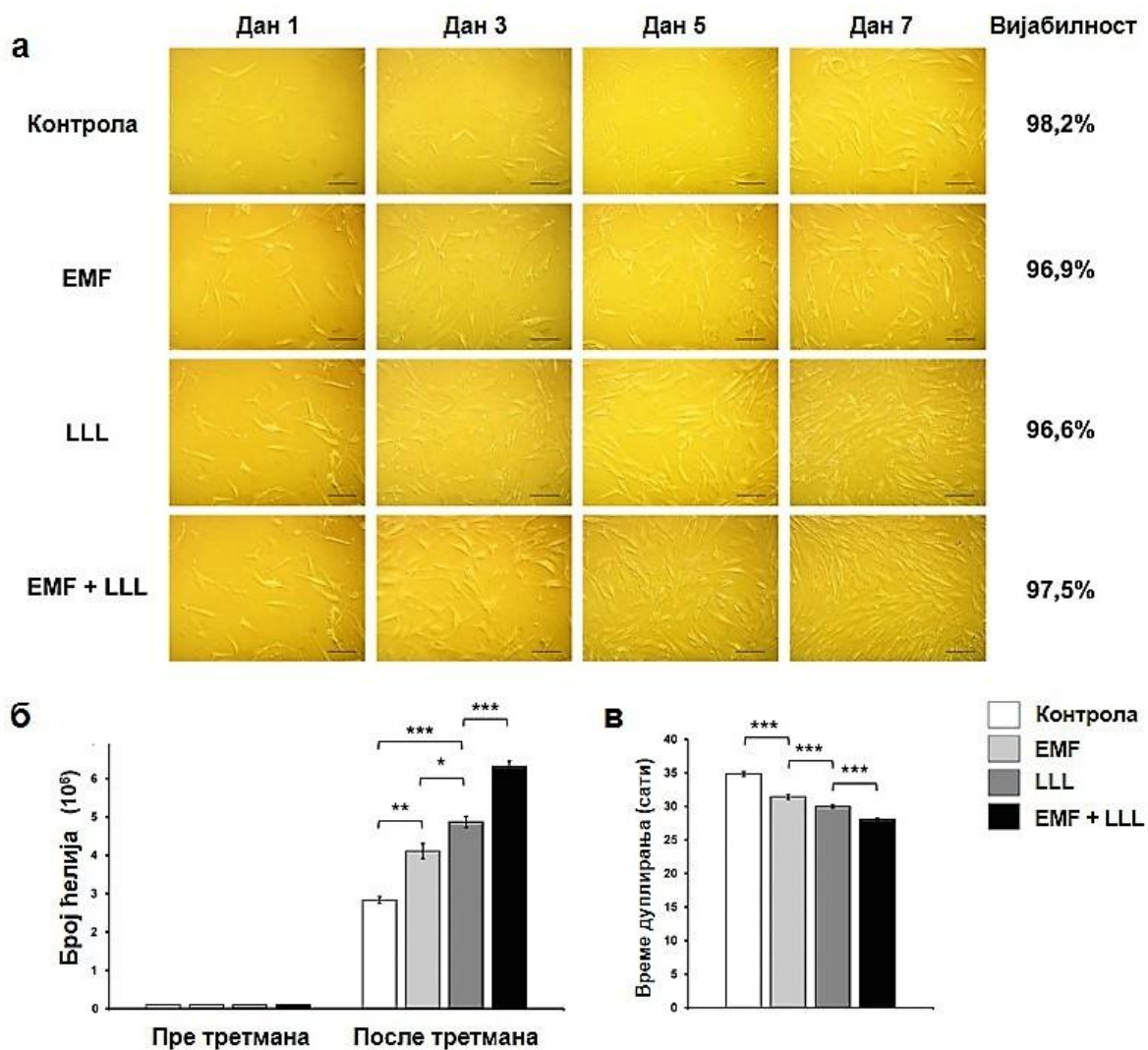
Хондрогена диференцијација упоредо је реализована за три седмице. Ћелије су гајене у хондрогеном медијуму и сваког дана третиране посебно LLL-ом и EMF-ом на исти начин, различитим параметрима, као у претходним примерима. Након планираног процеса диференцијације, урађена је квантификација анализом добијених слика помоћу софтвера *ImageJ*. Код ћелија које су стимулисане диференцијационим медијумом и третиране LLL-ом густине енергије 3 J/cm² и 5 J/cm² (Слика 20а) и EMF-ом густине енергије 3 mT и 5 mT (Слика 20б), након бојења са *Toluidin Blue* регистрована је ефикаснија диференцијација у виду обележених ГАГ у екстрацелуларном матриксу који су се бојили плавом бојом у односу на друге параметре LLL-а и EMF-а (Слика 20в и 20г).



Слика 20. Репрезентативне слике хондрогене диференцијације hAT-MSCs третираних различитим дозама LLL-а (**а**) и EMF-а (**б**) и квантификација диференцијације помоћу софтвера *ImageJ*-а након третмана LLL-ом (**в**) и EMF-ом (**г**). Резултати су представљени кад средња вредност ± стандардна девијација; *p < 0.05; **p < 0.01.

4.5. Комбиновани третман изолованих hAT-MSCs LLL-ом и EMF-ом побољшава пролиферацију третираних ћелија

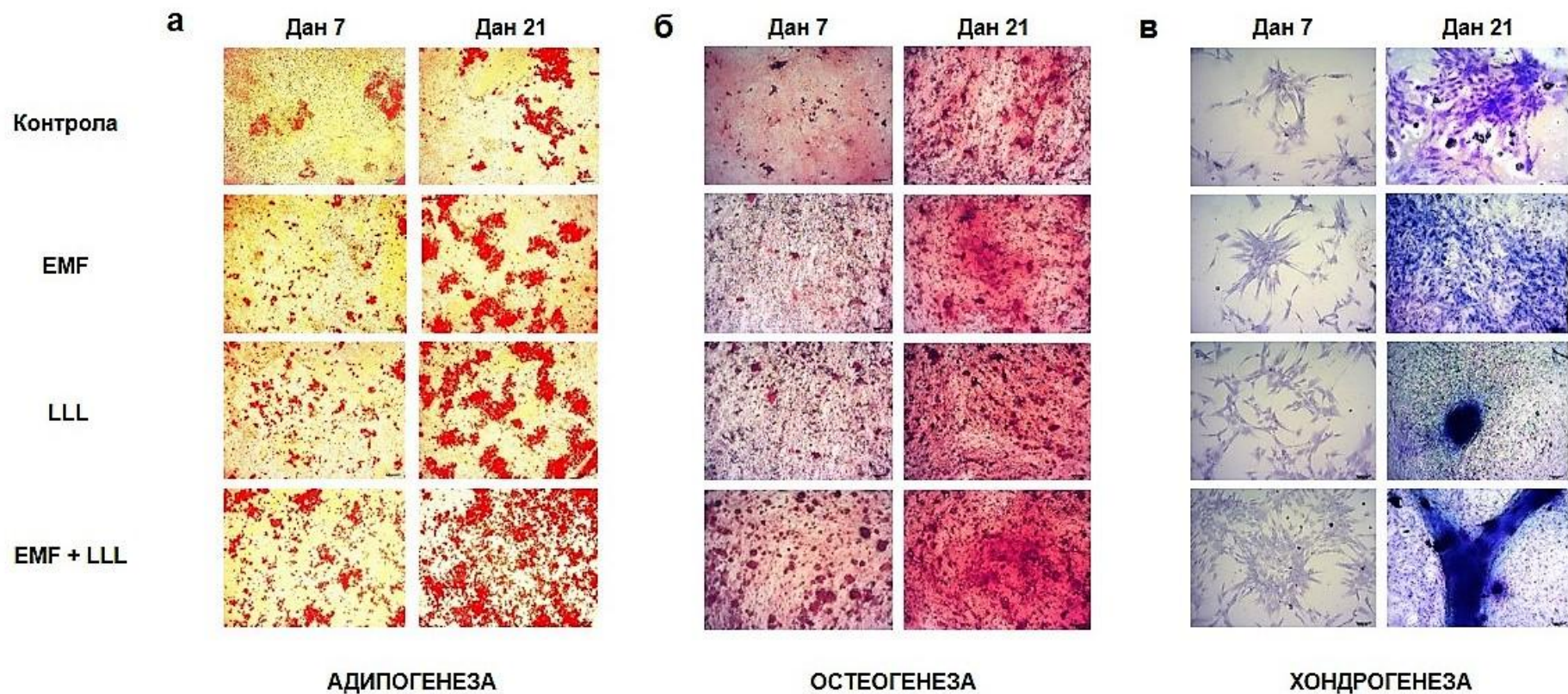
Након што су одређене дозе LLL-а и EMF-а које на најбољи начин појединачно побољшавају пролиферацију и диференцијацију hAT-MSCs, експерименти су даље настављени са циљем да се испита комбиновани ефекат ових доза два физикална терапијска модалитета на поменуте карактеристике и способности ћелија. Морфологија је праћена сваког другог дана, а након 7 дана третмана учињен је пресек стања и анализа. Резултати су приказани на слици 21 и указују да утицај LLL-а и EMF-а није био цитотоксичан и да се вијабилност ћелија високо одржала. Осим тога, показано је да је PDT LLL-ом и EMF-ом третираних hAT-MSCs значајно краће у односу на ћелије које су третиране само LLL-ом. То је значило и да је број ћелија након комбинованог дејства LLL-а и EMF-а био већи у односу на групу која је стимулисана само LLL-ом. Нешто мање ћелија је било у групи која је стимулисана само EMF-ом, па је PDT LLL-ом третираних ћелија било значајно краће у односу на EMF-ом третираних ћелија, док је PDT EMF-ом третираних ћелија било значајно краће у односу на контролну групу.



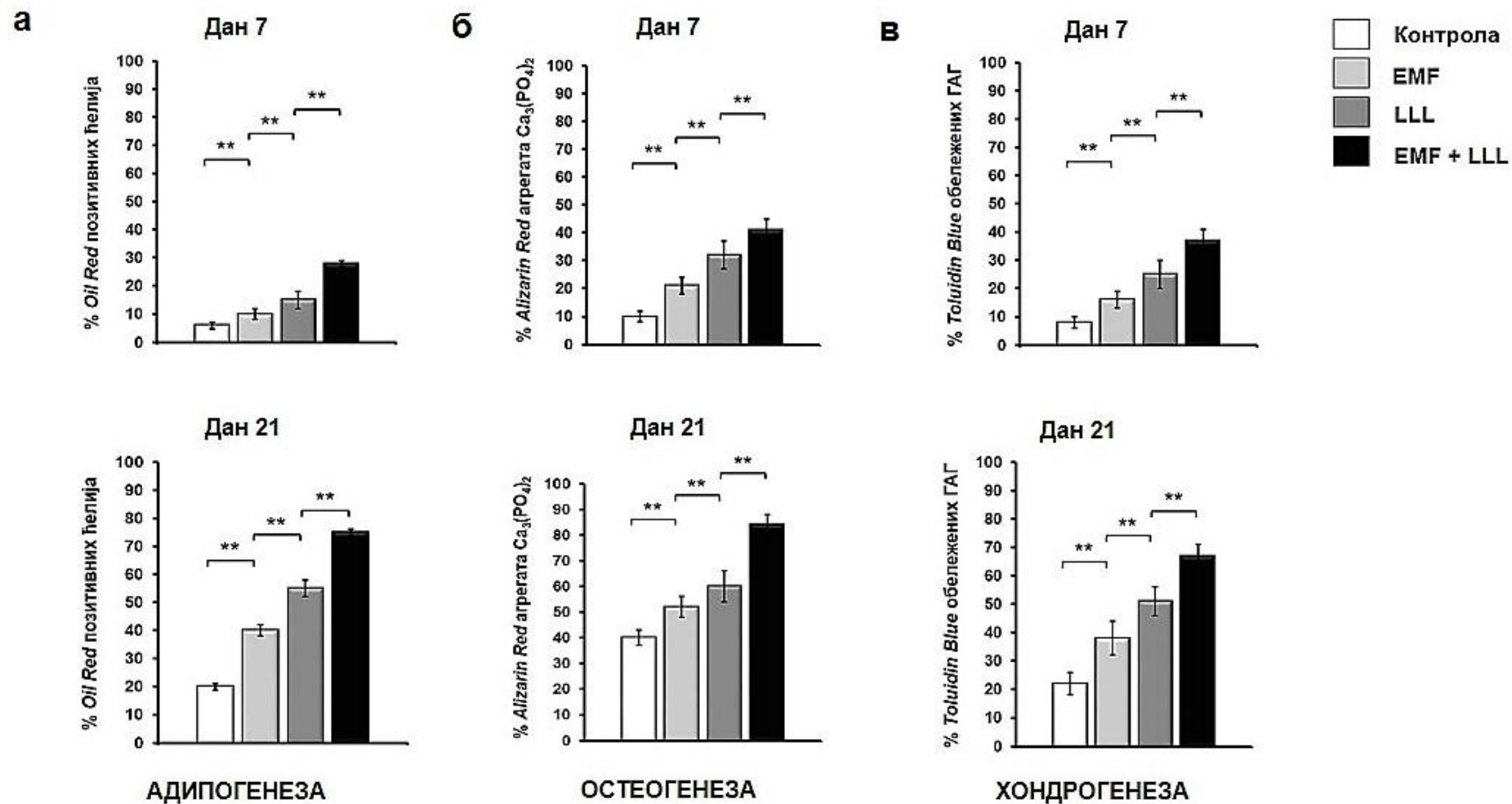
Слика 21. LLL и/или EMF значајно повећавају број и скраћују време дуплирања hAT-MSCs након третмана, без утицаја на вијабилност. **а)** репрезентативне слике култивисаних контролних и LLL и/или EMF третираних hAT-MSCs током 7-одневне стимулације; **б)** број hAT-MSCs пре и после LLL и/или EMF третмана; **в)** PDT анализирано у 3. и 4. пасажи. PDT LLL и EMF третираних hAT-MSCs је значајно краће у односу на LLL третиране ћелије, а PDT LLL третираних ћелија је значајно краће у односу на EMF третиране ћелије, док је PDT EMF третираних ћелија значајно краће у односу на контролу. Процент вијабилних hAT-MSCs одређен је *Trypan blue assay*-ем након LLL и/или EMF третмана. Резултати су представљени кад средња вредност \pm стандардна девијација; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. *Scale bar* = 200 μm .

4.6. Комбиновани третман изолованих hAT-MSCs LLL-ом и EMF-ом побољшава диференцијацију третираних ћелија

У наставку истраживања пратила се диференцијација третираних ћелија. Након 7 и 21 дан третмана учињен је пресек стања и анализа. Резултати су приказани на слици 22 и показују да је комбиновани ефекат LLL-а и EMF-а у дозама од 3 J/cm^2 и 3 mT био супериоран у односу на појединачне третмане и контролну групу.



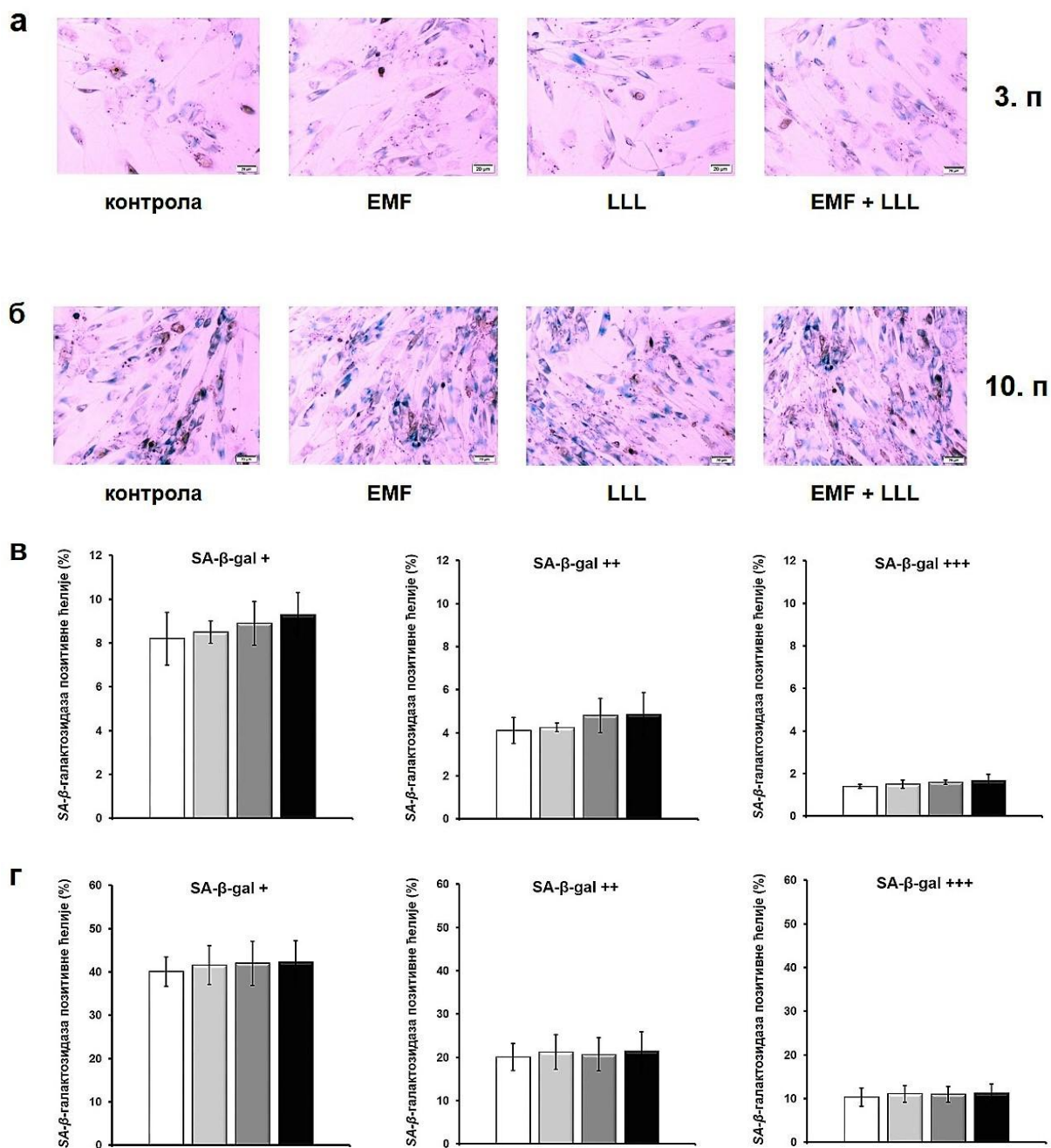
Слика 22. Репрезентативне слике трилинеарне диференцијације LLL-ом и EMF-ом третираних hAT-MSCs након 7. и 21. дана. Јасна је разлика у адипогеној (**а**), остеогеној (**б**) и хондрогеној (**в**) диференцијацији након стимулације комбинованим утицајем LLL-а и EMF-а у одабраним дозама од 3 J/cm^2 и 3 mT .



Слика 23. Квантификација остеогене (а), остеогене (б) и хондрогене (в) диференцијације помоћу софтвера *ImageJ*-а након третмана LLL-ом и EMF-ом. Резултати су представљени кад средња вредност ± стандардна девијација; ** $p < 0.01$.

4.7. Појединачни и комбиновани LLL и EMF третман изолованих hAT-MSCs LLL није утицао на старење третираних ћелија

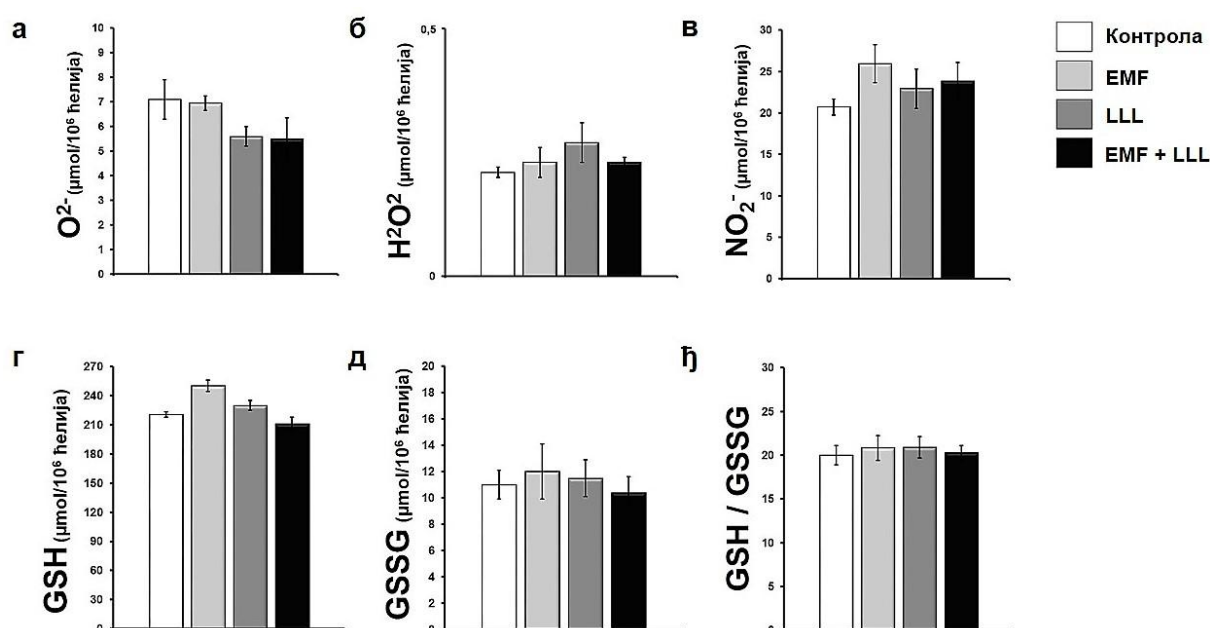
Имајућу у виду да је старења матичних ћелија проблем и ограничење у њиховој потенцијалној примени, након што је у низу експеримената показано да LLL и EMF третман успешно побољшава пролиферацију и диференцијацију третираних hAT-MSCs, без утицаја на одрживост, истраживање је настављено у смеру испитивања старења ћелија након третмана. Резултати указују да није било разлике у проценту ћелија које експримирају SA- β -галактозидазу у контролној и експерименталним групама, без обзира да ли се ради о слабој, умереној или високој експресији. Анализа је рађена у 3. и 10. пасажи након 7 дана третмана ћелија поменутих физикалним агенсима. Резултати су приказани на слици 23.



Слика 24. Репрезентативни приказ бојења третираних hAT-MSCs SA-β-галактозидазом. Приказане су конfluентне hAT-MSCs након 7-одневног третмана EMF-ом и LLL-ом у 3. пасажи (**а**) и 10. пасажи (**б**). У цитоплазми ћелија уочава се присуство зелено обојене SA-β-галактозидазе. *Scale bar* = 20 μm. Семиквантитативним одређивањем активности SA-β-галактозидазе установљено је да не постоји разлика између контролних и експерименталних група ћелија које показују слабу, умерену и високу активност SA-β-галактозидазе у трећој пасажи (**в**) и да се тај тренд одржао до 10. пасаже (**г**). Резултати су представљени кад средња вредност ± стандардна девијација.

4.8. Појединачни и комбиновани LLL и EMF третман изолованих hAT-MSCs LLL није утицао на оксидативни стрес третираних ћелија

Даље испитивање ограничавајућих фактора након стимулационог третмана hAT-MSCs усмерило се према оксидативном стресу и антиоксидативној заштити. Резултати након 7-одневног третмана су показали да LLL и EMF у одабраним дозама од 3 J/cm² и 3 mT не повећавају оксидативни стрес, нити утичу на антиоксидативну заштиту, што је још један позитиван аспект стимулације hAT-MSCs овим физикалним модалитетима. Резултати су приказани на слици 24.

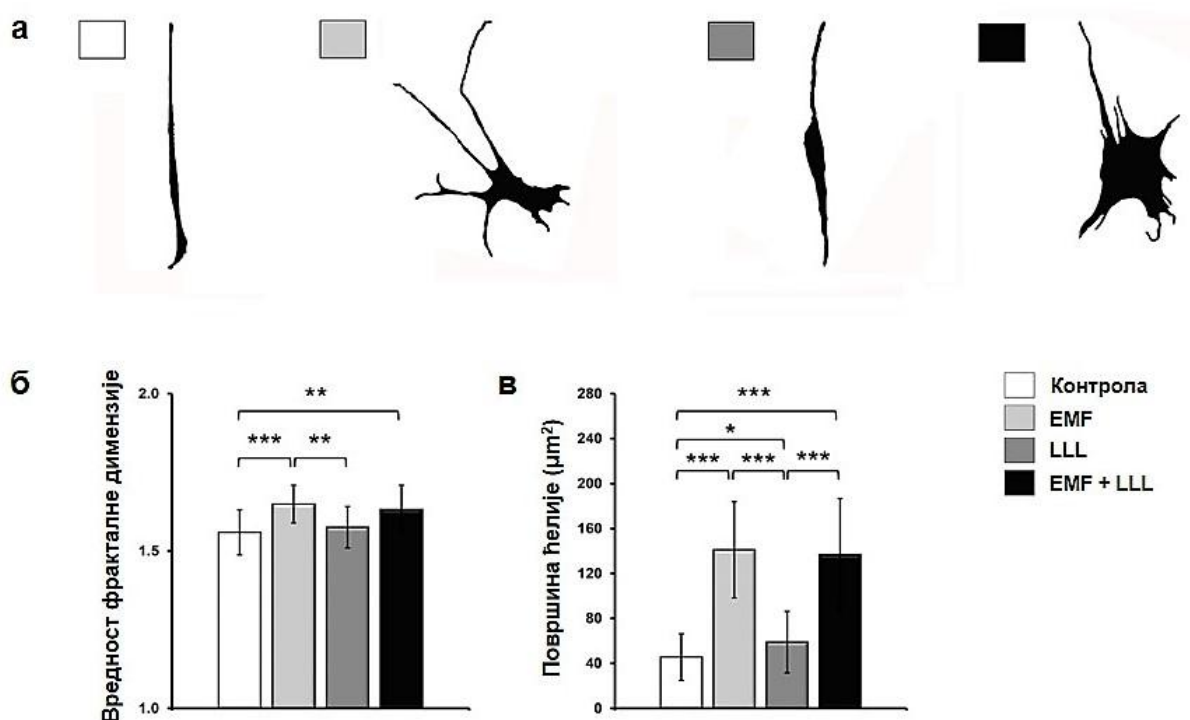


Слика 25. Није било статистички значајне разлике између контролне и експерименталних (третираних) група hAT-MSCs након 7 дана стимулације LLL-ом и EMF-ом у концентрацији супероксид-анјона (O_2^-) (а), водород пероксида (H_2O_2) (б) и нитрита (NO_2^-) (в), као ни фактора антиоксидативне заштите, редукованог (GSH) (г), оксидованог глутатиона (GSSG) (д) и њиховог односа (ђ).

4.9. Комбиновани LLL и EMF третман мења фракталну димензију и величину третираних hAT-MSCs

До сада се ретко испитивала морфологија третираних или разним факторима стимулираних MSCs у смислу предности или мана за евентуалну клиничку примену. Врло су занимљиви резултати добијени анализом фракталне димензије LLL-ом и EMF-ом третираних hAT-MSCs.

ФД hAT-MSCs у групи EMF и LLL била је значајно већа у односу на ћелије из контролне групе ($p < 0.01$), док није било разлике у ФД hAT-MSCs између контролне и LLL групе. Такође, није утврђена статистичка разлика између EMF и EMF и LLL група, што указује на то да ласерски третман није утицао на вредност ФД hAT-MSCs. Површина hAT-MSCs из EMF и EMF и LLL групе била је значајно већа у поређењу са величином ћелија из контролне групе ($p < 0.001$), а није утврђена статистичка разлика између EMF и EMF и LLL група, што такође указује на то да ласерски третман није утицао на величину hAT-MSCs.



Слика 26. Комбиновани LLL и EMF третман мења фракталну димензију и величину hAT-MSCs; **(а)** Приказане су репрезентативне црно-беле слике hAT-MSCs припремљене за фракталну анализу; **(б)** ФД hAT-MSCs у групи EMF и LLL била је значајно већа у односу на ћелије из контролне групе, док није било разлике у ФД hAT-MSCs између контролне и LLL групе. Такође, није утврђена статистичка разлика између EMF и EMF и LLL група, што указује на то да ласерски третман није утицао на вредност ФД hAT-MSCs; **(в)** Површина hAT-MSCs из EMF и EMF и LLL групе била је значајно већа у поређењу са величином ћелија из контролне групе. Није утврђена статистичка разлика између EMF и EMF и LLL група, што такође указује на то да ласерски третман није утицао на величину hAT-MSCs. Резултати су представљени кад средња вредност ± стандардна девијација; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

5. ДИСКУСИЈА

Резултати овог рада показују да MSCs изоловане из хуманог масног ткива здравих добровољаца средњег животног доба поседују висок пролиферативни капацитет и способност да се диференцирају у адипоците, остеобласте и хондроците. Третман добијених ћелија терапијским физикалним модалитетима, LLL и EMF у дозама које се користе у клиничкој пракси за лечење пацијената може значајно да убрза пролиферацију, побољша диференцијацију, без утицаја на одрживост, старење и оксидативни стрес. Третман је такође показао да се морфологија hAT-MSCs мења у зависности од тога који се агенс користи, те ће то бити значајно у начину апликације при евентуалној терапијској примени.

Други важан резултат добијен у овом раду је допринос у разјашњењу дејства физикалних агенаса који се користе годинама уназад и имају терапијско дејство које још увек није детаљно јасно. Резултати могу бити важни и представљати основу за претретман и припрему MSCs за апликацију, као и побољшавање енграфтмента додатним третманом LLL-ом и EMF-ом пацијента коме су трансплантиране ћелије.

5.1. Изоловане ћелије показале су добар пролиферативни капацитет и фибробластоидне морфолошке карактеристике

Масно ткиво је лако доступно и обезбеђује обиље MSCs, које се могу лако култивисати, умножити *in vitro* и користити у регенеративној медицини (1, 19, 20). Бирани су добровољци средњег животног доба, без болести које би утицале на карактеристике матичних ћелија. Сведен је број фактора који би евентуално утицао на судбину изолованих MSCs на минимум, чиме се желело утврдити јасно стање ћелија пре третмана. Све испитиване ћелије показале су уједначену пролиферациону кинетику приказану у табели 9. Из сваког узорка добијено је просечно $1,125 \times 10^6$ ћелија, од којих је један део чинио матичне ћелије узетог ткива. Процесом култивације ћелије које немају способност асиметричне деобе и одржавања нису опстајале, док су се MSCs лепиле за пластичну подлогу, делиле и увећавале свој број. Култивација је трајала просечно 20-35 дана, за добијање ћелија од друге до четврте пасаже. Просечно време

дупликације ћелија у култури (PDT) износило је 34,67 сати и није било статистички значајне разлике између узорака и пасажа. Овај податак је у складу са литературним подацима (269-271). Пролиферативни капацитет зависи од година донора, врсте и локације масног ткива, начина изолације, услова култивације и састава медијума (251, 272-273).

Ћелије су постепено добијале фибробласту сличну структуру и попуњавале дно пластичне посуде правилно (Слика 12), што је такође одговарало резултатима ранијих експеримената (269-274).

5.2. Изоловане ћелије експримирале су маркере за MSCs

Упркос чињеници да су до сада идентификовани бројни MSCs површински маркери, и даље недостају јединствени и широко прихваћени површински маркери за јасну идентификацију MSCs, као што је маркер CD34 за HSCs. Поред тога, постоји велика разлика у експресији маркера MSCs које су изоловане из различитих ткива, као и различитих врста и локација масног ткива.

Резултати овог рада су показали да је експресија CD29, CD73 и CD146 (99.01, 99.19 и 91.18%, редом), хомогена у изолованој групи ћелија, а да истовремено на површини ћелија нису постојали антигени карактеристичне за незреле ћелије хематопоетске лозе, CD34 и CD106 (0.56 и 1.7%, редом) (Слика 13). С обзиром да се наведени маркери појединачно налазе на површини и неких других ћелија (нпр. перицити, ендотелне ћелије) (274, 275), сматра се да се оваквом комбинацијом позитивних и негативних маркера, уз остале критеријуме (141) са високим степеном сигурности може говорити о култури MSCs.

Култивацијом ћелија од P2 до P4 није дошло до промена у експресији наведених антигена, што је такође у складу са литературним подацима (269-275).

5.3. Изоловане ћелије поседовале су способност трилинеарне диференцијације

Резултати ових истраживања показују да су се изоловане ћелије кроз све испитиване пасаже (P2 до P4) успешно диференцирале у правцу адипоцита, остеобласта и

хондроцита. Ћелије гајене у адипогеном медијуму испољиле су фенотип карактеристичан за ћелије масног ткива, тј. депоновале су масне капи у својој цитоплазми (Слика 14). hAT-MSCs имају значајан капацитет да се диференцирају у адипоците (276-278), што је веома важно за репарацију дефеката меког ткива, нарочито након онколошке хирургије (279). Адипогени индукциони медијум садржи инсулин или IGF-1, тријодотиронин, трансферин, изобутилметилксантин, хидрокортизон или дексаметазон, индометацин или тиазолидиндион, пантотенат и серум (280, 281). Током култивације у таквом медијуму у цитоплазми ћелија акумулирају се вакуоле које садрже липиде који се могу детектовати црвеним бојама *Oil Red O* (Слика 14) или *Nile Red* (282-284), а ћелије експримирају неколико гена и протеина, укључујући активирани рецептор γ пероксизмалне пролиферације, адипоцитни маст-везујући протеин и лептин, који учествују у биосинтези липида, метаболизму и акумулацији масти.

Остеогени медијум код једне групе ћелија развио је остеобластни фенотип акумулирањем депозита калцијум-фосфата у екстрацелуларном матриксу (Слика 15). У *in vitro* условима остеогени медијум који садржи BMP-2, аскорбинску киселину, β -глицерофосфат, дексаметазон и/или 1,25 дихидрокси-холекалциферол може усмерити недиференциране MSCs према остеогенези (285, 286). MSCs култивисане у присуству ових фактора изражавају гене, протеине и фенотип остеобласта, укључујући алкалну фосфатазу, колаген типа I, остеопонтин, остеонектин, Runx2, BMP-2, BMP-4 и BMP рецептор I и II (285-288). Током култивације, између 14-ог и 28-ог дана, hAT-MSCs почињу да производе минерале калцијум-фосфата у оквиру екстрацелуларног матрикса, што се региструје *Alizarin Red* (Слика 15) или *von Kossa* бојењем (289).

Раније студије су показале способност hAT-MSCs да пролазе хондрогену диференцијацију (290-292) култивацијом у медијуму који садржи инсулински фактор раста, аскорбат-2-фосфат, дексаметазон, L-пролина, BMP-6, BMP-7 и TGF- β (293, 204). На крају процеса култивације у хондрогеном медијуму ћелије показују експресију протеина екстрацелуларног матрикса хрскавице, укључујући Col-2, Col-4 и агрекан (293-295). У складу са ранијим извештајима, у овом истраживању показано је присуство хондроитин-сулфата у екстрацелуларном матриксу бојењем по *Toluidin Blue* (Слика 16).

5.4. Третман добијених hAT-MSCs LLL-ом и EMF-ом побољшао је пролиферацију и диференцијацију, без утицаја на вијабилност ћелија

Током последњих деценија вршене су бројне студије у области регенеративне медицине и рехабилитације. Велике наде се полажу у истраживања терапије за артритис, оштећења хрскавице, коштане дефекте и руптуре тетива. За сада, лечење је хируршко или је засновано на конвенционалној уградњи имплантата. Дакле, оваква терапија није довољно ефикасна, па пацијенти често остају непокретни и зависни од туђе помоћи. Као последица тога, велика средства се улажу у систем здравствене заштите широм света (296). Обзиром да смо упознати са предностима и манама евентуалне апликације ембрионалних матичних ћелија и индукованих плурипотентних матичних ћелија, јасно је зашто је највећи број истраживања потенцијалне терапије у рехабилитацији био усмерен на испитивање примене MSCs. Супституциона ћелијска терапија (енгл. „*cell therapy*“) има за циљ да поврати интегритет и функцију оштећеног ткива примаоца. Дакле, суспензија ћелија се убризгава директно у оштећено ткиво или у циркулацију. Други начин рехабилитације функције органа је ткивни инжењеринг (енгл. „*tissue engineering*“). Комплекснији је и подразумева конструисање делова органа или читавих органа у вештачким условима, како би се трансплантирали пацијенту (296, 297). У међувремену, истраживачи траже методе за побољшање пролиферације и диференцијације и боље прихватање апликованих матичних ћелија. Од раније се зна да један велики број хемијских фактора, примарно цитокина и фактора раста имају значајну улогу у стимулацији пролиферације и диференцијације MSCs (1, 2, 298-300). За примену у регенеративној медицини, неки од претходно идентификованих солубилних фактора костне сржи, масног ткива или зубне пулпе појединачно су тестирани у MSCs култури (301). Међутим, већина ових студија се фокусира на испитивање ефеката појединачног молекула од интереса, уместо комбинације више молекула, каква је ситуација у *in vivo* условима. Фибробластни фактор раста 2 (енгл. *fibroblast growth factors 2*, FGF2), један од најзаступљенијих солубилних фактора у костној сржи, у великој мери је проучаван ради стимулације пролиферације и повећања хондрогеног капацитета MSCs (301-303).

Значајно мањи број истраживања бави се утицајем физичких фактора на MSCs, а врло су ретки научни радови у којима се испитује комбиновани ефекат два или више физичких фактора на карактеристике и потенцијал hAT-MSCs. До овог тренутка није

било научних података о комбинованом ефекту LLL-а и EMF-а на hAT-MSCs, па је ово истраживање први покушај објашњења како различите дозе два терапијска физикална модалитета утичу на hAT-MSCs.

Параметри LLL-а и EMF-а третмана су исти или слични онима који су се користили у претходним студијама (304-309).

Од раније је познато да LLL има повољан терапијски ефекат на бројне болести. Након апсорпције фотона на акцепторским местима на ћелијској мембрани, LLL генерише ефекте фотобиостимулације, што активира секундарни гласник да започне каскаду интрацелуларних сигнала који утичу на метаболичке процесе (29). Током протеклих неколико година, *Abrahamse*-ина група се фокусирала на утицај LLL-а на матичне ћелије (29, 256, 310). Они су показали да зрачење LLL-ом индукује активност hAT-MSCs, повећава одрживост, миграцију и пролиферацију, стимулише експресију протеина и побољшање диференцијацију (29, 256, 310). Поред тога, показало се да LLL, када се користи у комбинацији са EGF-ом, повећава пролиферацију hAT-MSCs (256). Без обзира на различите параметре који се користе у студијама (таласна дужина, ширина импулсног снопа, снага и др.), ласерско зрачење може повећати пролиферацију MSCs и потенцијал диференцијације.

Клиничка ефикасност EMF-а се углавном односи на опоравак повреда и оштећења костију. У почетку се веровало да слаба електрична енергија коју генерише EMF убрзава формирање коштаног матрикса (311, 312). Међутим, недавно истраживање је показало да MSCs вероватно имају главну улогу у опоравку костију. Студије испитивања утицаја пулсног EMF-а на MSCs добијене из костне сржи и хумане епидермалне матичне ћелије показале су да је пролиферације ових ћелија значајно боља након деловања EMF (313, 314). С друге стране, *Tsai* и сарадници (315) показали су да EMF стимулација не мења пролиферацију матичних ћелија, али може да побољша остеогенезу повећањем нивоа раних остеогених маркера укључујући Runx2/Cbfa1 и алкалну фосфатазу. Неколико каснијих студија допринело је полемици и истакло да резултати од утицаја EMF на MSCs нису увек били конзистентни (311-316).

У складу са ранијим истраживањима, ови експерименти показују да је 7-дневни третман hAT-MSCs LLL-ом у дози од 3 J/cm^2 супериоран и статистички значајно боље стимулише пролиферацију ћелија у односу на ниже и више дозе, тј. предате густине енергије: 1 J/cm^2 , 5 J/cm^2 и 10 J/cm^2 (континуирани режим рада, снага 200 mW) (График 1). Истовремено, исти број ћелија, 1×10^5 , третиран је 7 дана EMF-ом интензитета 1 mT,

3 mT, 5 mT и 10 mT, а резултати су показали да је доза од 3 mT интензитета била најделотворнија у стимулацији пролиферације (Графикон 2). Анализирајући и време дуплирања ћелија, види се да су ове дозе LLL-а и EMF-а биле сигнификантно ефикасније у скраћењу тог периода, у односу на друге.

Исте дозе LLL-а и EMF-а употребљене су за испитивање утицаја на трилинеарну диференцијацију hAT-MSCs.

Адипогена диференцијација спроводила се током три седмице, по раније утврђеном протоколу (18). Ћелије су гајене у адипогеном медијуму и сваког дана третиране посебно LLL-ом густине енергије 1 J/cm², 3 J/cm², 5 J/cm² и 10 J/cm² и EMF-ом густине енергије 1 mT, 3 mT, 5 mT и 10 mT. Након спроведене диференцијације, урађена је квантификација анализом добијених слика помоћу софтвера *ImageJ*. Код ћелија које су стимулисане диференцијационим медијумом и третиране LLL-ом густине енергије 3 J/cm² (Слика 18а) и EMF-ом густине енергије 3 mT (Слика 18б), након бојења са *Oil Red O*, регистрована је ефикаснија диференцијација у виду крупних масних капљица које су се бојиле црвено у односу на друге параметре LLL-а и EMF-а (Слика 18в). Ови подаци у складу су са раније објављеним научним радовима (313, 317-322).

Исти протокол коришћен је код остеогене диференцијације, а на слици 19а приказано је да се код ћелија које су стимулисане LLL-ом густине енергије 3 J/cm² и 5 J/cm² регистровала значајно ефикаснија диференцијација у виду агрегата калцијум-фосфата у екстрацелуларном матриксу који су се бојили црвеном бојом у односу на друге параметре LLL-а. Идентична ситуација одиграла се са EMF-ом густине енергије 3 mT и 5 mT (Слика 19б), након бојења са *Alizarin Red*. Квантификације је то и потврдила (Слика 19в и 19г). *Bloise* и сарадници су показали да LLL третман поспешује регенерацију коштаног ткива тако што убрзава пролиферацију остеогених ћелија (323), а *Incerti Parenti* са својим тимом је показала дозно-зависни ефекат LLL-а, тако што је ласерско зрачење са малом дозом 2 J/cm² имало биостимулативни ћелијски одговор у поређењу са истом таласном дужином при високој дози (324). С друге стране, наши резултати се разликују у односу на *Safari* и његове колеге који су у експериментима утврдили да EMF густине енергије од 0,4 mT смањује вијабилност, успорава пролиферацију и индукује диференцијацију BM-MSCs (325).

Хондрогена диференцијација била је најуспешнија при стимулацији LLL-ом густине енергије 3 J/cm² и 5 J/cm² (Слика 20а) и EMF-ом густине енергије 3 mT и 5 mT (Слика 20б). То је потврђено квантификацијом обележених ГАГ у екстрацелуларном матриксу

који су се бојили плавом бојом након *Toluidin Blue* бојења (Слика 20в и 20г). Када се упореде ови резултати са резултатима других истраживача види се корелација, уз делимична одступања (326-329). Занимљиви су резултати истраживања *Fathi* и *Farahzadi* (326). Они су показали да екстремно ниска фреквенција EMF смањује пролиферацију AT-MSCs изолованих из пацова (енгл. *rat adipose-derived mesenchymal stem cells* – rAT-MSCs), али да се додатком цинк-сулфата, ZnSO₄, пролиферација значајно убрзава (326). *Marycz* и колеге пријавили су побољшање хондрогене диференцијације и повећање секреције BMP-2 и колагена тип II, а смањење концентрације колагена I након излагања hAT-MSCs нискофреквентним магнетним вибрацијама (327). Да импулсно EMF нема цитотоксичан ефекат и не утиче на вијабилност ћелија потврдили су пре неколико година *Chen* и сарадници. (328). Осим тога, они су показали да утицај EMF повећава и експресију гена за хондрогенезу: SOX-9, колагена тип II и агрекана (328). С друге стране, о утицају LLL-а на хондрогену диференцијацију hAT-MSCs до сада нема научних података. Зна се да LLL побољшава ангиогенезу, експресију ангиогених фактора и терапијски ефекат трансплантације hAT-MSCs за третман периферне васкуларне болести (329).

Ова докторска теза по први пут приказује резултате комбинованог утицаја LLL-а и EMF-а на карактеристике и потенцијал hAT-MSCs. На сликама 21, 22 и 23 приказан је синергистички позитиван ефекат LLL-а и EMF-а на пролиферацију и диференцијацију третираних hAT-MSCs. Резултати указују да је PDT LLL-ом и EMF-ом третираних hAT-MSCs значајно краће у односу на LLL-ом третиране ћелије, а да је PDT LLL-ом третираних ћелија значајно краће у односу на PDT EMF-ом стимулисане ћелије, док је PDT EMF-ом третираних ћелија значајно краће у односу на контролну групу ћелија која није третирана ни LLL-ом, ни EMF-ом. Осим тога, проценат вијабилних hAT-MSCs одређен *Tryan blue assay*-ем након LLL и/или EMF третмана се није значајно мењао, што потврђује нетоксичано дејство ова два физикална терапијска модалитета.

5.5. hAT-MSCs након третмана LLL-ом и EMF-ом нису брже старале

У планираним експериментима користећи ране пасаже ћелија избегнуто је старење као фактор ограничења у карактеристикама и способности hAT-MSCs. Но, свакако је било важно испитати да ли LLL и EMF третман, појединачно или комбиновано утиче на старење стимулисан ћелија. Резултати који су добијени су обећавајући, јер није било одступања у проценту SA- β -галактозидаза позитивних ћелија у контролним и експерименталним групама. Једно од вероватних објашњења је кратак период третмана. Свега је неколико научних радова који се баве старењем матичних ћелија након примене EMF, а не постоје научни извештаји о утицају LLL, па самим тим и о комбинованом дејству LLL и EMF на старење матичних ћелија, посебно hAT-MSCs. Резултати ове тезе по први пут описује те ефекте (Слика 24).

Наизглед супротно очекиваном, да ласерско зрачење може убрзати старење, *Odinokov* и *Hamblin* су објавили резултате да фотобиостимулација тимуса може успорити његову инволуцију, тј. зауставити његово старење (330). Амбициозно су закључили да фотобиостимулација може побољшати имунски статус старих особа и продужити животни век. Наши резултати нису указали на успоравање старења матичних ћелија након третмана ласером, али посматрајући шире, с обзиром да се убрзава пролиферација и диференцијација, без утицаја на старење ћелија, можемо закључити да се ради о позитивном ефекту LLL-а. С друге стране, *Fathi* са сарадницима у низу експеримената је потврдио да екстремно нискофреквентно EMF повећава проценат старих rAT-MSCs у популацији (326, 331). Наши резултати не потврђују њихове налазе, уз податак да се ипак ради о различим фреквенцама EMF-а.

5.6. Третман добијених hAT-MSCs LLL-ом и EMF-ом не утиче на оксидативни стрес, нити мења активност ензима антиоксидативне заштите

Оксидативни стрес и антиоксидативна заштита матичних ћелија, посебно hAT-MSCs обрађивани су последњих неколико година са посебном пажњом. Резултати нису конзистентни. Поједини аутори заступају став да MSCs имају нижу активност ензима антиоксидативне заштите у односу на диференциране ћелије, јер су имунопривилеговане и смештене у својим нишама, далеко од штетних фактора микросредине (332). Постоје и друга мишљења. *Valle-Prieto* и сарадници су показали да MSCs, у *in vitro* условима, поседује ефикасне ензимске и неензимске механизме посредством којих детоксикују слободне радикале (333). Недиференциране MSCs имају знатно ниже концентрације слободних радикала и у складу са тим већу заступљеност незасићених метаболита (334). Наши резултати указују да није било статистички значајне разлике између контролне и експерименталних (третираних) група hAT-MSCs након 7 дана стимулације LLL-ом и EMF-ом у концентрацији O_2^- , H_2O_2 и NO_2^- , као ни фактора антиоксидативне заштите, GSH, GSSG и њиховог односа (Слика 25).

5.7. hAT-MSCs након третмана LLL-ом и EMF-ом су се значајно морфолошки мењале

Матичне ћелије се налазе дубоко у ткивима, у својим нишама, и EMF и ласерски зрак *in vivo* морају продрети кроз неколико слојева ткива како би стигли до њих. Познато је да кожа и поткожно масно ткиво апсорбују одређену количину EMF-а и LLL-а, али да и постоји довољна количина субдермалне енергије да утиче на патолошке процесе и стимулишу поправљање ткива (335-337). Обзиром да је у овим експериментима испитиван утицај EMF-а и LLL-а на матичне ћелије преко поклопаца пластичне плоче, а да се ово сматра као корак ка *in vivo* и клиничким студијама, третман на овај начин не умањује значајност резултата (Слике 17 и 26). Пенетрација EMF-а и ласерског зрака кроз танки пластични поклопац плоче и танког слоја медијума се не разликује значајније од директног утицаја EMF-а и LLL-а на морфологију, пролиферацију и одрживост матичних ћелија у *in vivo* условима. Штавише, овај приступ је омогућио одржавање стерилних услова током третмана.

Морфолошки ефекти EMF-а на структуру плазма мембране су раније објављени (30, 84, 308, 338, 339). Међутим, ово је прва студија која испитује промене морфологије MSCs након комбинованог дејства EMF-а и LLL-а. Поред стандардне морфометријске анализе, као што је површина ћелија, примењена је и фрактална анализа добијених фотографија третираних hAT-MSCs.

Фрактална анализа је метода која се користи за мерење сложености одређене геометријске фигуре. Сложеност се квантификује помоћу ФД, што представља основни параметар у фракталној анализи (265, 268). Вредност ФД објекта зависи од робустности и неправилности његових граница, а такође се користи да опише карактеристике испуњавања простора (265, 268). Упркос својој богатој примени у другим областима биологије и медицине (265-268), ова метода и даље није довољно присутна у истраживању матичних ћелија. Једна од области у истраживању матичних ћелија где је примена фракталне анализе показала велику вредност је диференцијација MSCs, где је у стању да квантификује и детектује промене структурне сложености током процеса диференцирања (287, 288). У овој студији показали смо да EMF значајно повећава површинску и ФД hAT-MSCs, које се микроскопски могу описати као ћелије полигоналног облика са гранулираном цитоплазмом. Ове микроскопске промене могу се објаснити променама пермеабилности мембране и интеракцијом интрацелуларних структура, које изазива EMF, што на крају води до другачије фосфолипидне организације (278, 279, 281). Поред тога, EMF стимулише активност калцијумских јонских канала на ћелијској мембрани, што утиче на ћелијску хомеостазу. Нарушавање равнотеже електролита доводи до промене морфологије ћелија и добијања полигоналних облика (278).

Осим тога, резултати су показали да није било статистички значајне разлике између EMF и EMF+LLL група, што указује на то да ласерски третман није утицао на површину hAT-MSCs (Слика 25), док су ефекти на ФД били минимални и на ивици статистичке значајности ($p=0.046$). Тако третиране hAT-MSCs повећане ћелијске површине могу имати побољшану адхезивну способност (340-342), што може бити веома значајно за будућу терапијску примену. Наиме, претходни налази показују да интравенска примена MSCs са пречником више од 25 μm доводи до микроваскуларне оклузије (340-342), те стога, на основу ових резултата, може се закључити да EMF третман MSCs пре интравенске администрације није препоручљив. За разлику од тога,

третман LLL-ом је пожељан, због повећања пролиферације и убрзања диференцијације, без пратећих промена у ћелијској морфологији и одрживости.

Ослањајући се на раније познате податке (313), резултати овог истраживања иду у прилог ефикасној локалној примени овако увећаних ћелија, нпр. за лечење дефеката хрскавице и несраслог прелома (340-342). Знајући да MSCs након примене могу имати смањену пролиферацију и лош енграфтмент (340-342), може се разматрати EMF и/или LLL третман пацијената којима су трансплантиране MSCs. Механизме убрзања ћелијских деоба, побољшавање пролиферације и диференцијације третираних ћелија треба још детаљније разјаснити, али ови резултати указују да је третман LLL-ом валидан приступ за претретман MSCs-a *in vitro* пре интравенске примене ћелија, а у комбинацији са EMF након апликације MSCs (Схема 4) (343).

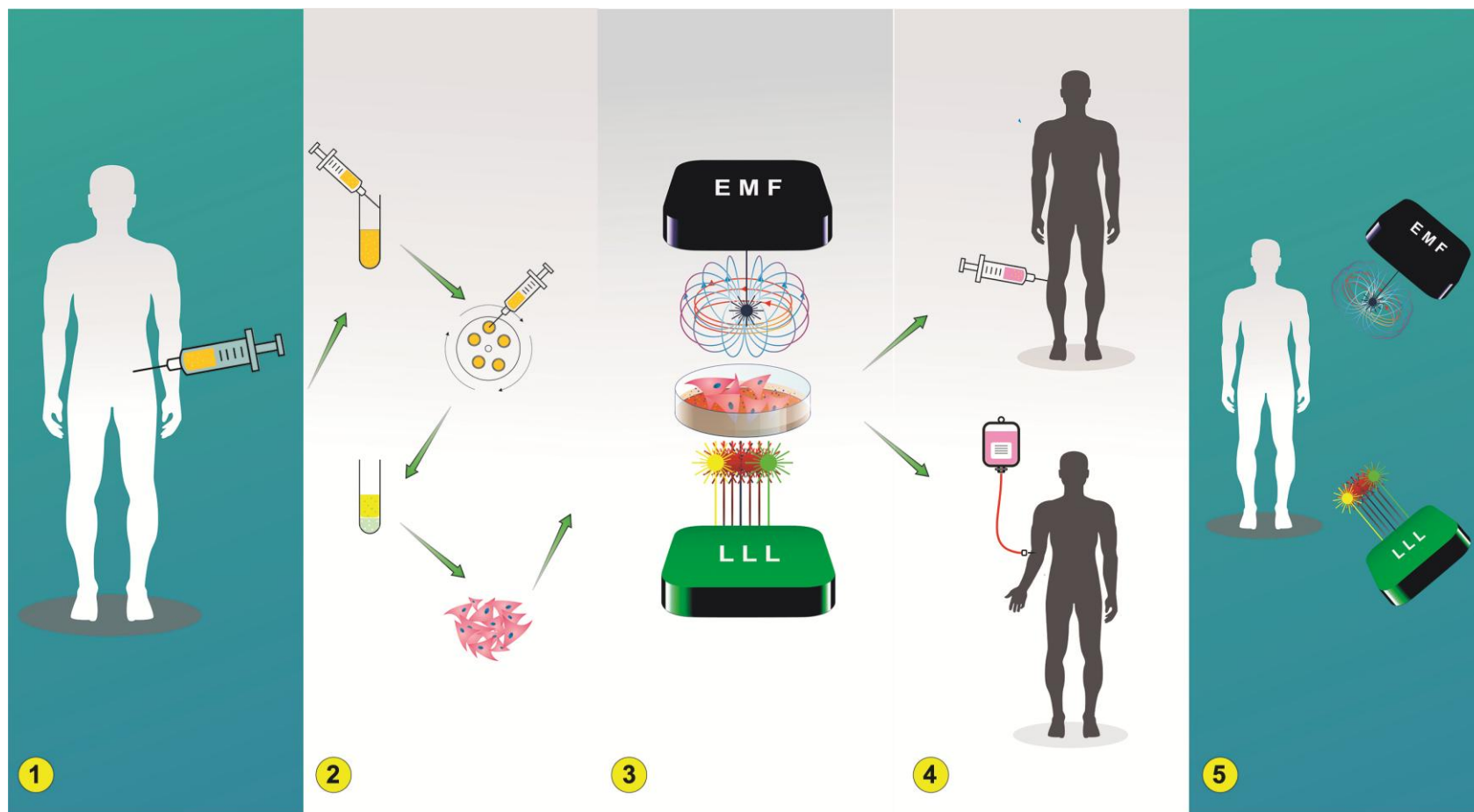


Схема 4. Приказ потенцијалне примене LLL-а и EMF-а у ћелијском инжењерингу. **1** – Сакупљање поткожног масног ткива од добровољаца; **2** – изолација и карактеризација hAT-MSCs; **3** - претретман hAT-MSCs LLL-ом и EMF-ом; **4** – Локална апликација третираних hAT-MSCs EMF-ом и системска апликација третираних hAT-MSCs LLL-ом; **5** - LLL и EMF третман пацијента након апликације hAT-MSCs

6. ЗАКЉУЧАК

Ови резултати показују да се hAT-MSCs успешно могу умножити комбинованим EMF и LLL третманом. Овај третман, такође, може побољшати њихову диференцијацију, без утицаја на вијабилност, старење и оксидативни стрес. Због свог ефекта, овај третман матичних ћелија представља нови корак у регенеративној медицини, који се односи на област ткивног инжењеринга. У даљем истраживању биће неопходне клиничке студије, ради потврде позитивних терапијских ефеката и евентуалног откривања ограничења овог третмана матичних ћелија.

Осим тога, ови резултати доприносе бољем разумевању ефеката два терапијска физикална модалитета, те се може закључити да EMF и LLL могу да стимулишу пролиферацију и диференцијацију ендогених ткивно-специфичних матичних ћелија

7. РЕФЕРЕНЦЕ

1. Nurkovic J, Dolicanin Z, Mustafic F, Mujanovic R, Memic M, Grbovic V, Jurisic Skevin A, Nurkovic S. Mesenchymal stem cells in regenerative rehabilitation. *J Phys Ther Sci* **2016**, 28: 1943–1948.
2. Volarevic V, Nurkovic J, Arsenijevic N, Stojkovic M. Concise review: therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis. *Stem Cells* **2014**, 32: 2818–2823.
3. De Coppi P. Regenerative medicine for congenital malformations. *J Pediatr Surg* **2013**, 48: 273–280.
4. Nagoshi N, Okano H. Applications of induced pluripotent stem cell technologies in spinal cord injury. *J Neurochem* **2017**; 141: 848-860.
5. Tricomi BJ, Dias AD, Corr DT. Stem cell bioprinting for applications in regenerative medicine. *Ann N Y Acad Sci* **2016**; 1383: 115-124.
6. Viganò M, Sansone V, d'Agostino MC, Romeo P, Perucca Orfei C, de Girolamo L. Mesenchymal stem cells as therapeutic target of biophysical stimulation for the treatment of musculoskeletal disorders. *J Orthop Surg Res* **2016**; 11:163.
7. Wang F, Shi R, Cai F, Wang YT, Wu XT. Stem Cell Approaches to Intervertebral Disc Regeneration: Obstacles from the Disc Microenvironment. *Stem Cells Dev* **2015**; 24:2479-2495.
8. Perez-Terzic C, Childers MK. Regenerative rehabilitation: a new future? *Am J Phys Med Rehabil* **2014**; 93:S73-78.
9. Head PL. Rehabilitation Considerations in Regenerative Medicine. *Phys Med Rehabil Clin N Am* **2016**; 27:1043-1054.
10. Frisoni GB, Boccardi M, Barkhof F, Blennow K, Cappa S, Chiotis K, Démonet JF, Garibotto V, Giannakopoulos P, Gietl A, Hansson O, Herholz K, Jack CR Jr, Nobili F, Nordberg A, Snyder HM, Ten Kate M, Varrone A, Albanese E, Becker S, Bossuyt P, Carrillo MC, Cerami C, Dubois B, Gallo V, Giacobini E, Gold G, Hurst S, Lönneborg A, Lovblad KO, Mattsson N, Molinuevo JL, Monsch AU, Mosimann U, Padovani A, Picco A, Porteri C, Ratib O, Saint-Aubert L, Scerri C, Scheltens P, Schott JM, Sonni I,

- Teipel S, Vineis P, Visser PJ, Yasui Y, Winblad B. Strategic roadmap for an early diagnosis of Alzheimer's disease based on biomarkers. *Lancet Neurol* **2017**; 16:661-676.
11. Peruzzi M, De Falco E, Abbate A, Biondi-Zoccai G, Chimenti I, Lotrionte M, Benedetto U, Delewi R, Marullo AG, Frati G. State of the Art on the Evidence Base in Cardiac Regenerative Therapy: Overview of 41 Systematic Reviews. *Biomed Res Int* **2015**; 2015:613782.
 12. Volarevic V, Bojic S, Nurkovic J, Volarevic A, Ljujic B, Arsenijevic N, Lako M, Stojkovic M. Stem Cells as New Agents for the Treatment of Infertility: Current and Future Perspectives and Challenges. *BioMed Res Int* **2014**; 2014:507234.
 13. Todorović V, Đukanović D. Matične ćelije, regenerativna medicina i starenje. U: Hristo Anđelski et al. *Gerontostomatologija*. Pančevo: Stomatološki fakultet **2012**; 16:255-299.
 14. Gazdic M, Volarevic V, Arsenijevic N, Stojkovic M. Mesenchymal stem cells: a friend or foe in immune-mediated diseases. *Stem Cell Rev* **2015**; 11:280-287.
 15. Witten CM, McFarland RD, Simek SL. Concise Review: The U.S. Food and Drug Administration and Regenerative Medicine. *Stem Cells Transl Med* **2015**; 4:1495-1499.
 16. Volkman R, Offen D. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells in Neurodegenerative Diseases. *Stem Cells* **2017**; 35:1867-1880.
 17. Girdlestone J. Mesenchymal stromal cells with enhanced therapeutic properties. *Immunotherapy* **2016**; 8:1405-1416.
 18. Nurković J, Dolićanin Z, Tutić I, Hajrović Š, Mustafić F, Todorović V, Kovačević-Filipović M. Mezenhimalne matične ćelije iz masnog tkiva – izolacija, kultivacija i ciljana diferencijacija. *Praxis Medica* **2013**; 42: 45-50.
 19. Romagnoli C, Brandi ML. Adipose mesenchymal stem cells in the field of bone tissue engineering. *World J Stem Cells* **2014**; 6:144-152.
 20. Bertheuil N, Chaput B, Ménard C, Varin A, Garrido I, Grolleau JL, Sensébé L, Watier E, Tarte K. Adipose-derived stromal cells: history, isolation, immunomodulatory properties and clinical perspectives. *Ann Chir Plast Esthet* **2015**; 60:94-102.
 21. Yong KW, Choi JR, Wan Safwani WK. Biobanking of Human Mesenchymal Stem Cells: Future Strategy to Facilitate Clinical Applications. *Adv Exp Med Biol* **2016**; 951:99-110.
 22. Nurkovic J, Volarevic V, Lako M, Armstrong L, Arsenijevic N, Stojkovic M. Aging of stem and progenitor cells: mechanisms, impact on the therapeutic potential and rejuvenation. *Rejuvenation Res* **2016**; 19:3-12.

23. Khan M, Adil SE, Olson AL. The role of mesenchymal stem cells in oncology and regenerative medicine. *Future Oncol* **2017**; 13:821-831.
24. Salazar GT, Ohneda O. Review of biophysical factors affecting osteogenic differentiation of human adult adipose-derived stem cells. *Biophys Rev* **2013**; 5:11-28.
25. Patil S, Paul S. A comprehensive review on the role of various materials in the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells with a special focus on the association of heat shock proteins and nanoparticles. *Cells Tissues Organs* **2014**; 199:81-102.
26. Richards MM, Maxwell JS, Weng L, Angelos MG, Golzarian J. Intra-articular treatment of knee osteoarthritis: from anti-inflammatories to products of regenerative medicine. *Phys Sportsmed* **2016**; 44:101-108.
27. Sobacchi C, Palagano E, Villa A, Menale C. Soluble Factors on Stage to Direct Mesenchymal Stem Cells Fate. *Front Bioeng Biotechnol* **2017**; 5:32.
28. Saliev T, Mustapova Z, Kulsharova G, Bulanin D, Mikhalovsky S. Therapeutic potential of electromagnetic fields for tissue engineering and wound healing. *Cell Prolif* **2014**; 47:485-493.
29. Abrahamse H. Regenerative medicine, stem cells, and low-level laser therapy: future directives. *Photomed Laser Surg* **2012**; 30:681-682.
30. El-Makakey AM, El-Sharaby RM, Hassan MH, Balbaa A. Comparative study of the efficacy of pulsed electromagnetic field and low level laser therapy on mitogen-activated protein kinases. *Biochem Biophys Rep* **2017**; 9:316-321.
31. Mihajlović V. Terapijski fizikalni modaliteti, četvrto izdanje, Unireks, Podgorica, **2011**; 358-373.
32. Frontera WR. DeLisa's Physical Medicine and Rehabilitation. 5th ed. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Phyladelphia, **2013**; 1691-1712.
33. Belanger A-Y. Therapeutic Electrophysical Agents, Evidence Behind Practice. 2nd ed. Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Williams, Baltimore, Maryland, **2010**; 196-226.
34. Đurović A. Fizijatrija, prvo izdanje, Medija Centar Odbrana, Beograd, **2014**; 195-201.
35. Vesović Potić V. Osnovi fizikalne medicine i rehabilitacije, prvo izdanje, Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd, **2009**; 72-74.
36. https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1964/
37. Maiman TH. Stimulated optical radiation in Ruby. *Nature* **1960**; 187:493–494.

38. Mester E, Szende B, Gärtner P. The effect of laser beams on the growth of hair in mice. *Radiobiologia, Radiotherapia* **1968**; 9:621–626.
39. Stewart N, Lim AC, Lowe PM, Goodman G. Lasers and laser-like devices: part one. *Australas J Dermatol* **2013**; 54:173-183.
40. Moskvina SV. Low-Level Laser Therapy in Russia: History, Science and Practice. *J Lasers Med Sci* **2017**; 8:56-65.
41. Vladimirov YA, Osipov AN, Klebanov GI. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Mosc)* **2004**; 69:81-90.
42. Baratto L, Calzà L, Capra R, Gallamini M, Giardino L, Giuliani A, Lorenzini L, Traverso S. Ultra-low-level laser therapy. *Lasers Med Sci* **2011**; 26:103-112.
43. Prindeze NJ, Moffatt LT, Shupp JW. Mechanisms of action for light therapy: a review of molecular interactions. *Exp Biol Med (Maywood)* **2012**; 237:1241-1248.
44. Takac S, Stojanović S. Characteristics of laser light. *Med Pregl* **1999**; 52:29-34.
45. da Silva JP, da Silva MA, Almeida APF, Lombardi Junior I, Matos AP. Laser therapy in the tissue repair process: a literature review. *Photomedicine and Laser Surgery*. **2010**; 28:17–21.
46. Karu T. Photobiology of low-power laser effects. *Health Phys* **1989**; 56:691-704.
47. Gigo-Benato D, Geuna S, Rochkind S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: a review of the literature. *Muscle and Nerve* **2005**; 31:694–701.
48. Alayat MS, Elsodany AM, El Fiky AA. Efficacy of high and low level laser therapy in the treatment of Bell's palsy: a randomized double blind placebo-controlled trial. *Lasers Med Sci* **2014**; 29(1):335-342.
49. Alayat MS, Atya AM, Ali MM, Shosha TM. Long-term effect of high-intensity laser therapy in the treatment of patients with chronic low back pain: a randomized blinded placebo-controlled trial. *Lasers Med Sci* **2014**; 29(3):1065-1073.
50. Hsieh YL, Cheng YJ, Huang FC, Yang CC. The fluence effects of low-level laser therapy on inflammation, fibroblast-like synoviocytes, and synovial apoptosis in rats with adjuvant-induced arthritis. *Photomed Laser Surg* **2014**; 32(12):669-677.
51. Sommer AP, Pinheiro AL, Mester AR, Franke RP, Whelan HT. Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system. *J Clin Laser Med Surg* **2001**; 19(1):29-33.
52. Lubart R, Lavi R, Friedmann H, Rochkind S. Photochemistry and photobiology of light absorption by living cells. *Photomed Laser Surg* **2006**; 24(2):179-185.

53. Fallah A, Mirzaei A, Gutknecht N, Demneh AS. Clinical effectiveness of low-level laser treatment on peripheral somatosensory neuropathy. *Lasers Med Sci* **2017**; 32(3):721-728.
54. de Paula Eduardo C, de Freitas PM, Esteves-Oliveira M, Aranha AC, Ramalho KM, Simões A, Bello-Silva MS, Tunér J. Laser phototherapy in the treatment of periodontal disease. A review. *Lasers Med Sci* **2010**; 25(6):781-792.
55. Hamblin MR. Mechanisms and applications of the anti-inflammatory effects of photobiomodulation *AIMS Biophys* **2017**; 4(3):337-361.
56. Tomaz de Magalhães M, Núñez SC, Kato IT, Ribeiro MS. Light therapy modulates serotonin levels and blood flow in women with headache. A preliminary study. *Exp Biol Med (Maywood)* **2016**; 241(1):40-45.
57. Tatmatsu-Rocha JC, Ferraresi C, Hamblin MR, Damasceno Maia F, do Nascimento NR, Driusso P, Parizotto NA. Low-level laser therapy (904nm) can increase collagen and reduce oxidative and nitrosative stress in diabetic wounded mouse skin. *J Photochem Photobiol B* **2016**; 164:96-102.
58. Kubsik A, Klimkiewicz P, Woldańska-Okońska M. Application of laser therapy in the physiotherapy of patients with multiple sclerosis. *Wiad Lek* **2012**; 65(1):55-61.
59. Chow RT, Armati PJ. Photobiomodulation: Implications for Anesthesia and Pain Relief. *Photomed Laser Surg* **2016**; 34(12):599-609.
60. Oron A, Oron U. Low-Level Laser Therapy to the Bone Marrow Ameliorates Neurodegenerative Disease Progression in a Mouse Model of Alzheimer's Disease: A Minireview. *Photomed Laser Surg* **2016**; 34(12):627-630.
61. Clijisen R, Brunner A, Barbero M, Clarys P, Taeymans J. Effects of low-level laser therapy on pain in patients with musculoskeletal disorders: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Phys Rehabil Med* **2017**; 53(4):603-610.
62. Huang Z, Chen J, Ma J, Shen B, Pei F, Kraus VB. Effectiveness of low-level laser therapy in patients with knee osteoarthritis: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* **2015**; 23(9):1437-1444.
63. Jang H, Lee H. Meta-analysis of pain relief effects by laser irradiation on joint areas. *Photomed Laser Surg* **2012**; 30(8):405-417.
64. Yates B, Que SK, D'Souza L, Suchecki J, Finch JJ. Laser treatment of periocular skin conditions. *Clin Dermatol* **2015**; 33(2):197-206.

65. Fukada E, Yasuda I. On the Piezoelectric Effect of Bone. *J Phys Soc Jpn* **1957**; 12:1158-1162.
66. Bassett CAL, Pawluk RJ, Becker RO. Effects of Electric Currents on Bone In Vivo. *Nature* **1964**; 204:652–654.
67. Hyland GJ. Physical basis of adverse and therapeutic effects of low intensity microwave radiation. *Indian J Exp Biol*. **2008**; 46(5):403-419.
68. Hammerschlag R, Levin M, McCraty R, Bat N, Ives JA, Lutgendorf SK, Oschman JL. Biofield Physiology: A Framework for an Emerging Discipline. *Glob Adv Health Med* **2015**; 4:35-41.
69. Pasek J, Pasek T, Sieroń-Stołtny K, Cieślar G, Sieroń A. Electromagnetic fields in medicine - The state of art. *Electromagn Biol Med* **2016**; 35(2):170-175.
70. Colbert AP, Markov MS, Souder JS. Static magnetic field therapy: dosimetry considerations. *J Altern Complement Med* **2008**; 14(5):577-582.
71. Markov MS. Magnetic field therapy: a review. *Electromagn Biol Med* **2007**; 26(1):1-23.
72. Hiscock A, Miller S, Rothwell J, Tallis RC, Pomeroy VM. Informing dose-finding studies of repetitive transcranial magnetic stimulation to enhance motor function: a qualitative systematic review. *Neurorehabil Neural Repair* **2008**; 22:228-249.
73. Huang LQ, He HC, He CQ, Chen J, Yang L. Clinical update of pulsed electromagnetic fields on osteoporosis. *Chin Med J (Engl)* **2008**; 121(20):2095-2099.
74. Odell RH Jr, Sorgnard RE. Anti-inflammatory effects of electronic signal treatment. *Pain Physician* **2008**; 11(6):891-907.
75. Buchachenko A. Why magnetic and electromagnetic effects in biology are irreproducible and contradictory? *Bioelectromagnetics* **2016**; 37(1):1-13.
76. Chang F, Minc N. Electrochemical control of cell and tissue polarity. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2014**; 30:317-336.
77. Behari J, Paulraj R. Biomarkers of induced electromagnetic field and cancer. *Indian J Exp Biol* **2007**; 45(1):77-85.
78. Lisi A, Ledda M, de Carlo F, Pozzi D, Messina E, Gaetani R, Chimenti I, Barile L, Giacomello A, D'Emilia E, Giuliani L, Foletti A, Patti A, Vulcano A, Grimaldi S. Ion cyclotron resonance as a tool in regenerative medicine. *Electromagn Biol Med* **2008**; 27(2):127-133.

79. Destefanis M, Viano M, Leo C, Gervino G, Ponzetto A, Silvagno F. Extremely low frequency electromagnetic fields affect proliferation and mitochondrial activity of human cancer cell lines. *Int J Radiat Biol* **2015**; 91(12):964-972.
80. Kim KE, Park SK, Nam SY, Han TJ, Cho IY. Potential therapeutic mechanism of extremely low-frequency high-voltage electric fields in cells. *Technol Health Care* **2016**; 24(3):415-427.
81. De Ninno A, Pregnolato M. Electromagnetic homeostasis and the role of low-amplitude electromagnetic fields on life organization. *Electromagn Biol Med* **2017**; 36(2):115-122.
82. Saliev T, Tachibana K, Bulanin D, Mikhalovsky S, Whitby RD. Bio-effects of non-ionizing electromagnetic fields in context of cancer therapy. *Front Biosci (Elite Ed)* **2014**; 6:175-184.
83. Bagkos G, Koufopoulos K, Piperi C. Mitochondrial emitted electromagnetic signals mediate retrograde signaling. *Med Hypotheses* **2015**; 85(6):810-818.
84. Hansen EL, Sozer EB, Romeo S, Frandsen SK, Vernier PT, Gehl J. Dose-dependent ATP depletion and cancer cell death following calcium electroporation, relative effect of calcium concentration and electric field strength. *PLoS One* **2015**; 10(4):e0122973.
85. Vincenzi F, Ravani A, Pasquini S, Merighi S, Gessi S, Setti S, Cadossi R, Borea PA, Varani K. Pulsed Electromagnetic Field Exposure Reduces Hypoxia and Inflammation Damage in Neuron-Like and Microglial Cells. *J Cell Physiol* **2017**; 232(5):1200-1208.
86. Pokorný J, Pokorný J, Kobilková J. Postulates on electromagnetic activity in biological systems and cancer. *Integr Biol (Camb)* **2013**; 5(12):1439-1446.
87. Yamabhai M, Chumseng S, Yoohat K, Srila W. Diverse biological effects of electromagnetic-treated water. *Homeopathy* **2014**; 103(3):186-192.
88. Vadalà M, Vallelunga A, Palmieri L, Palmieri B, Morales-Medina JC, Iannitti T. Mechanisms and therapeutic applications of electromagnetic therapy in Parkinson's disease. *Behav Brain Funct* **2015**; 11:26.
89. Sun J, Kwan RL, Zheng Y, Cheing GL. Effects of pulsed electromagnetic fields on peripheral blood circulation in people with diabetes: A randomized controlled trial. *Bioelectromagnetics* **2016**; 37(5):290-297.
90. Redeker JI, Schmitt B, Grigull NP, Braun C, Büttner A, Jansson V, Mayer-Wagner S. Effect of electromagnetic fields on human osteoarthritic and non-osteoarthritic chondrocytes. *BMC Complement Altern Med* **2017**; 17(1):402.

91. Kumar S, Dey S, Jain S. Extremely low-frequency electromagnetic fields: A possible non-invasive therapeutic tool for spinal cord injury rehabilitation. *Electromagn Biol Med* **2017**; 36(1):88-101.
92. Wierzcholski K, Miszczak A. Magneto-therapy of human joint cartilage. *Acta Bioeng Biomech* **2017**; 19(1):115-124.
93. Taylor EM, Hardy KL, Alonso A, Pilla AA, Rohde CH. Pulsed electromagnetic fields dosing impacts postoperative pain in breast reduction patients. *J Surg Res* **2015**; 193(1):504-510.
94. https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/
95. https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/
96. Glicken MD. *Social Work in the 21st Century: An Introduction to Social Welfare, Social Issues, and the Profession*, 2nd Ed. SAGE publishing, Phoenix, USA, **2010**. ISBN: 978-1412975780
97. McClelland Descalzo DL, Ehnes DD, zur Nieden NI. Stem cells for osteodegenerative diseases: current studies and future outlook. *Regen Med* **2014**; 9(2):219-230.
98. Senarath-Yapa K, McArdle A, Renda A, Longaker MT, Quarto N. Adipose-derived stem cells: a review of signaling networks governing cell fate and regenerative potential in the context of craniofacial and long bone skeletal repair. *Int J Mol Sci* **2014**; 15(6):9314-9330.
99. Takahashi H, Ishikawa H, Tanaka A. Regenerative medicine for Parkinson's disease using differentiated nerve cells derived from human buccal fat pad stem cells. *Hum Cell* **2017**; 30(2):60-71.
100. Czarzasta J, Habich A, Siwek T, Czapliński A, Maksymowicz W, Wojtkiewicz J. Stem cells for ALS: An overview of possible therapeutic approaches. *Int J Dev Neurosci* **2017**; 57:46-55.
101. Sanluis-Verdes A, Sanluis-Verdes N, Manso-Revilla MJ, Castro-Castro AM, Pombo-Otero J, Fraga-Mariño M, Sanchez-Ibañez J, Doménech N, Rendal-Vázquez ME. Tissue engineering for neurodegenerative diseases using human amniotic membrane and umbilical cord. *Cell Tissue Bank* **2017**; 18(1):1-15.
102. Stoltz JF, Bensoussan D, De Isla N, Zhang L, Han Z, Magdalou J, Huselstein C, Ye JS, Leballe B, Decot V, Reppel L. Stem cells and vascular regenerative medicine: A mini review. *Clin Hemorheol Microcirc* **2016**; 64(4):613-633.

103. Zhang C, Cao J, Li X, Xu H, Wang W, Wang L, Zhao X, Li W, Jiao J, Hu B, Zhou Q, Zhao T. Treatment of multiple sclerosis by transplantation of neural stem cells derived from induced pluripotent stem cells. *Sci China Life Sci* **2016**; 59(9):950-957.
104. Weiner LP. Definitions and criteria for stem cells. *Methods Mol Biol* **2008**; 438:3-8.
105. ALPHA Scientists In Reproductive Medicine; ESHRE Special Interest Group Embryology. Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Reprod Biomed Online* **2011**; 22(6):632-646.
106. Keating A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol* **2006**; 13(6):419-425.
107. Lanza R, ed. *Essentials of Stem Cell Biology*. 2nd ed. Elsevier Academic Press **2009**. ISBN: 978-0123747297
108. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell* **2012**; 10(6):709-716.
109. Antoniou A, Hébrant A, Dom G, Dumont JE, Maenhaut C. Cancer stem cells, a fuzzy evolving concept: a cell population or a cell property? *Cell Cycle* **2013**; 12(24):3743-3748.
110. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration* **2013**; 85(1):3-10.
111. Rezza A, Sennett R, Rendl M. Adult stem cell niches: cellular and molecular components. *Curr Top Dev Biol* **2014**; 107:333-372.
112. Bianco P. "Mesenchymal" stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2014**; 30:677-704.
113. Morokoff A, Ng W, Gogos A, Kaye AH. Molecular subtypes, stem cells and heterogeneity: Implications for personalised therapy in glioma. *J Clin Neurosci* **2015**; 22(8):1219-1226.
114. Singh A, Singh A, Sen D. Mesenchymal stem cells in cardiac regeneration: a detailed progress report of the last 6 years (2010-2015). *Stem Cell Res Ther* **2016**; 7(1):82.
115. Battle E, Clevers H. Cancer stem cells revisited. *Nat Med* **2017**; 23(10):1124-1134.
116. Spencer ND, Chun R, Vidal MA, Gimble JM, Lopez MJ. Mesenchymal stromal cells: past, present, and future. *Vet Surg* **2011**; 40(2):129-139.
117. Saito MT, Silvério KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH Jr. Tooth-derived stem cells: Update and perspectives. *World J Stem Cells* **2015**; 7(2):399-407.
118. Karimineko S, Movassaghpour A, Rahimzadeh A, Talebi M, Shamsasenjan K, Akbarzadeh A. Implications of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **2016**; 44(3):749-757.

119. Li M, Zhao Y, Hao H, Han W, Fu X. Mesenchymal stem cell-based therapy for nonhealing wounds: today and tomorrow. *Wound Repair Regen* **2015**; 23(4):465-482.
120. Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, Lim HC, Scheduling S. Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci* **2016**; 1370(1):109-118.
121. Bukovsky A. Cell commitment by asymmetric division and immune system involvement. *Prog Mol Subcell Biol* **2007**; 45:179-204.
122. Marfia G, Navone SE, Di Vito C, Ughi N, Tabano S, Miozzo M, Tremolada C, Bolla G, Crotti C, Ingegnoli F, Rampini P, Riboni L, Gualtierotti R, Campanella R. Mesenchymal stem cells: potential for therapy and treatment of chronic non-healing skin wounds. *Organogenesis* **2015**; 11(4):183-206.
123. Pleyer L, Valent P, Greil R. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Normal and Dysplastic Hematopoiesis-Masters of Survival and Clonality? *Int J Mol Sci* **2016**; 17(7): E1009.
124. Hansis C. Totipotency, cell differentiation and reprogramming in humans. *Reprod Biomed Online* **2006**; 13(4):551-557.
125. Shanthly N, Aruva MR, Zhang K, Mathew B, Thakur ML. Stem cells: a regenerative pharmaceutical. *Q J Nucl Med Mol Imaging* **2006**; 50(3):205-216.
126. Pessina A, Gribaldo L. The key role of adult stem cells: therapeutic perspectives. *Curr Med Res Opin* **2006**; 22(11):2287-300.
127. Volarevic V, Ljubic B, Stojkovic P, Lukic A, Arsenijevic N, Stojkovic M. Human stem cell research and regenerative medicine – present and future. *Br Med Bull* **2011**; 99:155-168.
128. Yu J, Thomson JA. Embryonic Stem Cells. In: *Regenerative Medicine. Stem Cell Information - National Institutes of Health, USA* **2006**.
129. Denker HW. Potentiality of embryonic stem cells: an ethical problem even with alternative stem cell sources. *J Med Ethics* **2006**; 32(11):665-671.
130. Larijani B, Esfahani EN, Amini P, Nikbin B, Alimoghaddam K, Amiri S, Malekzadeh R, Yazdi NM, Ghodsi M, Dowlati Y, Sahraian MA, Ghavamzadeh A. Stem cell therapy in treatment of different diseases. *Acta Med Iran* **2012**; 50(2):79-96.
131. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* **1968**; 6(2):230–247.

132. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* **1963**; 197(4866):452–454.
133. Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Comp Physiol* **1963**; 62(3):327–336.
134. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* **2006**; 119(11):2204–2213.
135. Kassis I, Zangi L, Rivkin R, Levdansky L, Samuel S, Marx G, Gorodetsky R. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant* **2006**; 37(10):967–976.
136. Zou Z, Zhang Y, Hao L, Wang F, Liu D, Su Y, Sun H. More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body. *Expert Opin Biol Ther* **2010**; 10(2):215–230.
137. Armstrong L, Lako M, Buckley N, Lappin TR, Murphy MJ, Nolte JA, Pittenger M, Stojkovic M. Editorial: Our top 10 developments in stem cell biology over the last 30 years *Stem Cells* **2012**; 30:2-9.
138. Hombach-Klonisch S, Panigrahi S, Rashedi I, Seifert A, Alberti E, Pocar P, Kurpisz M, Schulze-Osthoff K, Mackiewicz A, Los M. Adult stem cells and their trans-differentiation potential--perspectives and therapeutic applications. *J Mol Med* **2008**; 86(12):1301–1314.
139. Kindler V. Postnatal stem cell survival: does the niche, a rare harbor where to resist the ebb tide of differentiation, also provide lineage-specific instructions? *J Leukoc Biol* **2005**; 78:836–844.
140. Dominici M, Paolucci P, Conte P, Horwitz EM. Heterogeneity of multipotent mesenchymal stromal cells: from stromal cells to stem cells and vice versa. *Transplantation* **2009**; 87(9):S36–42.
141. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**; 8(4):315–317.
142. Gronthos S, Simmons PJ, Graves SE, Robey PG. Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. *Bone* **2001**; 28(2):178–181.

143. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* **2007**; 25(11):2739–2749.
144. Lennon DP, Caplan AI. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* **2006**; 34:1604-1605.
145. Matsuzaki Y, Sato Y. [Bone and Stem Cells. Isolation and immunomodulation of mesenchymal stem cells. *Clin Calcium* **2014**; 24(4):575-583.
146. Li H, Ghazanfari R, Zacharaki D, Lim HC, Scheduling S. Isolation and characterization of primary bone marrow mesenchymal stromal cells. *Ann N Y Acad Sci* **2016**; 1370(1):109-118.
147. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* **2004**; 103:1669-1675.
148. Forraz N, McGuckin CP. The umbilical cord: a rich and ethical stem cell source to advance regenerative medicine. *Cell Prolif* **2011**; 44(Suppl 1):60-69.
149. Kovacevic-Filipovic M, Debeljak-Martacic J, Petakov M, Markovic D, Milenkovic A, Karadzic I, Mitrovic O, Vignjevic S, Drndarevic N, Micic M, Glibetic M, Todorovic V. Isolation and characterization of dental pulp stem cells. *Autour de la Cellule Souche*, 17-19 Mars **2010**, Universite Victor Segal, Bordeaux, France; Abstracts 09(P42).
150. Tobita M, Orbay H, Mizuno H. Adipose-derived stem cells: current findings and future perspectives. *Discov Med* **2011**; 11:160-170.
151. Asatrian G, Pham D, Hardy WR, James AW, Peault B. Stem cell technology for bone regeneration: current status and potential applications. *Stem Cells Cloning* **2015**; 8:39-48.
152. Petriz J. Flow cytometry of the side population (SP). *Curr Protoc Cytom* **2013**; 9:9.23.
153. Suchánek J, Visek B, Soukup T, El-Din Mohamed SK, Ivancaková R, Mokry J, Aboul-Ezz EH, Omran A. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth--isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **2010**; 53(2):93-99.
154. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* **2006**; (174):249-282.
155. Koutna I, Peterkova M, Simara P, Stejskal S, Tesarova L, Kozubek M. Proliferation and differentiation potential of CD133+ and CD34+ populations from the bone marrow and mobilized peripheral blood. *Ann Hematol* **2011**; 90(2):127-137.

156. Aggarwal S, Moggio A, Bussolati B. Concise review: stem/progenitor cells for renal tissue repair: current knowledge and perspectives. *Stem Cells Transl Med* **2013**; 2(12):1011-1019.
157. El Omar R, Beroud J, Stoltz JF, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng Part B Rev* **2014**; 20(5):523-544.
158. Hoch AI, Leach JK. Concise review: optimizing expansion of bone marrow mesenchymal stem/stromal cells for clinical applications. *Stem Cells Transl Med* **2014**; 3(5):643-652.
159. Ruetze M, Richter W. Adipose-derived stromal cells for osteoarticular repair: trophic function versus stem cell activity. *Expert Rev Mol Med* **2014**; 16:e9.
160. Kindler V. Postnatal stem cell survival: does the niche, a rare harbor where to resist the ebb tide of differentiation, also provide lineage-specific instructions? *J Leukoc Biol* **2005**; 78:836–844.
161. Gaur M, Dobke M, Lunyak VV. Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue in Clinical Applications for Dermatological Indications and Skin Aging. *Int J Mol Sci* **2017**; 18(1).
162. Srinageshwar B, Maiti P, Dunbar GL, Rossignol J. Role of Epigenetics in Stem Cell Proliferation and Differentiation: Implications for Treating Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* **2016**; 17(2). pii: E199.
163. Abdulrazzak H, Moschidou D, Jones G, Guillot PV. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissue. *J R Soc Interface* **2010**; 7:S689-S706.
164. Xiao L, Tsutsui T. Human dental mesenchymal stem cells and neural regeneration. *Hum Cell* **2013**; 26(3):91-96.
165. Nuti N, Corallo C, Chan BM, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Rev* **2016**; 12(5):511-523.
166. Polymeri A, Giannobile WV, Kaigler D. Bone Marrow Stromal Stem Cells in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Horm Metab Res* **2016**; 48(11):700-713.
167. Yang YJ, Li XL, Xue Y, Zhang CX, Wang Y, Hu X, Dai Q. Bone marrow cells differentiation into organ cells using stem cell therapy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2016**; 20(13):2899-2907.

168. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* **2006**; 116:1195-1201.
169. Yoshida S, Sukeno M, Nabeshima Y. A vasculature associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis. *Science* **2007**; 317:1722–1726.
170. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance through life. *Cell* **2008**; 132:598-611.
171. Laverdet B, Micallef L, Lebreton C, Mollard J, Lataillade JJ, Coulomb B, Desmoulière A. Use of mesenchymal stem cells for cutaneous repair and skin substitute elaboration. *Pathol Biol (Paris)* **2014**; 62(2):108-117.
172. Kode JA, Mukherjee S, Joglekar MV, Hardikar AA. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy* **2009**; 11(4):377-391.
173. Le Blanc K, Ringdén O. Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **2005**; 11(5):321-334.
174. Tan K, Zheng K, Li D, Lu H, Wang S, Sun X. Impact of adipose tissue or umbilical cord derived mesenchymal stem cells on the immunogenicity of human cord blood derived endothelial progenitor cells. *PLoS One* **2017**; 12(5):e0178624.
175. Consentius C, Reinke P, Volk HD. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: what has been seen in vitro and in vivo? *Regen Med* **2015**; 10(3):305-315.
176. Li M, Sun X, Kuang X, Liao Y, Li H, Luo D. Mesenchymal stem cells suppress CD8⁺ T cell-mediated activation by suppressing natural killer group 2, member D protein receptor expression and secretion of prostaglandin E2, indoleamine 2, 3-dioxygenase and transforming growth factor- β . *Clin Exp Immunol* **2014**; 178(3):516-524.
177. El-Badawy A, El-Badri N. Clinical Efficacy of Stem Cell Therapy for Diabetes Mellitus: A Meta-Analysis. *PLoS One* **2016**; 11(4):e0151938.
178. Xu J, Ming Q, Wang X, Zhang W, Li Z, Wang S, Li Y, Li L. Mesenchymal stem cells moderate immune response of type 1 diabetes. *Cell Tissue Res* **2017**; 368(2):239-248.
179. Pistoia V, Raffaghello L. Mesenchymal stromal cells and autoimmunity. *Int Immunol* **2017**; 29(2):49-58.
180. Ansboro S, Roelofs AJ, De Bari C. Mesenchymal stem cells for the management of rheumatoid arthritis: immune modulation, repair or both? *Curr Opin Rheumatol* **2017**; 29(2):201-207.

181. Yamaoka K. Potential of bone regenerative therapy with mesenchymal stem cells in rheumatoid arthritis. *Clin Calcium* **2016**; 26(5):758-762.
182. Tanaka Y. Human mesenchymal stem cells as a tool for joint repair in rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* **2015**; 33(4 Suppl 92):S58-62.
183. Papadopoulou A, Yiangou M, Athanasiou E, Zogas N, Kaloyannidis P, Batsis I, Fassas A, Anagnostopoulos A, Yannaki E. Mesenchymal stem cells are conditionally therapeutic in preclinical models of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* **2012**; 71(10):1733-1740.
184. Berglund S, Magalhaes I, Gaballa A, Vanherberghen B, Uhlin M. Advances in umbilical cord blood cell therapy: the present and the future. *Expert Opin Biol Ther* **2017**; 17(6):691-699.
185. Moioli EK, Bolotin D, Alam M. Regenerative Medicine and Stem Cells in Dermatology. *Dermatol Surg* **2017**; 43(5):625-634.
186. Rao RC, Dedania VS, Johnson MW. Stem Cells for Retinal Disease: A Perspective on the Promise and Perils. *Am J Ophthalmol* **2017**; 179:32-38.
187. Chakravarthy K, Chen Y, He C, Christo PJ. Stem Cell Therapy for Chronic Pain Management: Review of Uses, Advances, and Adverse Effects. *Pain Physician* **2017**; 20(4):293-305.
188. Feng LY, Zhang DZ. Clinical application of mesenchymal stem cells in treatment of acute-on-chronic liver failure and related research advances. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* **2017**; 25(9):651-654.
189. Higuchi A, Ku NJ, Tseng YC, Pan CH, Li HF, Kumar SS, Ling QD, Chang Y, Alarfaj AA, Munusamy MA, Benelli G, Murugan K. Stem cell therapies for myocardial infarction in clinical trials: bioengineering and biomaterial aspects. *Lab Invest* **2017**; 97(10):1167-1179.
190. Im GI. Clinical use of stem cells in orthopaedics. *Eur Cell Mater* **2017**; 33:183-196.
191. Kawakami Y, Matsumoto T, Mifune Y, Fukui T, Patel KG, Walker GN, Kurosaka M, Kuroda R. Therapeutic Potential of Endothelial Progenitor Cells in the Field of Orthopaedics. *Curr Stem Cell Res Ther* **2017**; 12(1):3-13.
192. Huselstein C, Rahouadj R, de Isla N, Bensoussan D, Stoltz JF, Li YP. Mechanobiology of mesenchymal stem cells: Which interest for cell-based treatment? *Biomed Mater Eng* **2017**; 28(s1):S47-S56.

193. Waldschmidt JM, Simon A, Wider D, Müller SJ, Follo M, Ihorst G, Decker S, Lorenz J, Chatterjee M, Azab AK, Duyster J, Wäsch R, Engelhardt M. CXCL12 and CXCR7 are relevant targets to reverse cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma. *Br J Haematol* **2017**; 179(1):36-49.
194. Sherman LS, Condé-Green A, Sandiford OA, Rameshwar P. A discussion on adult mesenchymal stem cells for drug delivery: pros and cons. *Ther Deliv* **2015**; 6(12):1335-1346.
195. Mohammadian M, Abasi E, Akbarzadeh A. Mesenchymal stem cell-based gene therapy: A promising therapeutic strategy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **2016**; 44(5):1206-1211.
196. Bari S, Seah KK, Poon Z, Cheung AM, Fan X, Ong SY, Li S, Koh LP, Hwang WY. Expansion and homing of umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitor cells for clinical transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* **2015**; 21(6):1008-1019.
197. Hass R, Kasper C, Böhm S, Jacobs R. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal* **2011**; 9:12.
198. Jin HJ, Bae YK, Kim M, Kwon SJ, Jeon HB, Choi SJ, Kim SW, Yang YS, Oh W, Chang JW. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. *Int J Mol Sci* **2013**; 14(9):17986-8001.
199. Shafiee A, Seyedjafari E, Soleimani M, Ahmadbeigi N, Dinarvand P, Ghaemi N. A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnol Lett* **2011**; 33(6):1257-1264.
200. Freiman A, Shandalov Y, Rozenfeld D, Shor E, Segal S, Ben-David D, Meretzki S, Egozi D, Levenberg S. Adipose-derived endothelial and mesenchymal stem cells enhance vascular network formation on three-dimensional constructs in vitro. *Stem Cell Res Ther* **2016**; 7:5.
201. Rohban R, Reinisch A, Etchart N, Schallmoser K, Hofmann NA, Szoke K, Brinchmann JE, Bonyadi Rad E, Rohde E, Strunk D. Identification of an effective early signaling signature during neo-vasculogenesis in vivo by ex vivo proteomic profiling. *PLoS One* **2013**; 8(6):e66909.

202. Rohban R, Pieber TR. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential. *Stem Cells Int* **2017**; 2017:5173732.
203. Ardeshirylajimi A, Mossahebi-Mohammadi M, Vakilian S, Langroudi L, Seyedjafari E, Atashi A, Soleimani M. Comparison of osteogenic differentiation potential of human adult stem cells loaded on bioceramic-coated electrospun poly (L-lactide) nanofibres. *Cell Prolif* **2015**; 48(1):47-58.
204. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* **2001**; 29(6):532-539.
205. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2000**; 97(25):13625-13630.
206. Batouli S, Miura M, Brahim J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, Robey PG, Shi S. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *J Dent Res* **2003**; 82(12):976-981.
207. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng* **2006**; 12(10):2813-2823.
208. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* **2008**; 34(2):166-171.
209. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* **2009**; 88(9):792-806.
210. <https://www.wmda.info/>
211. Cohen Y, Nagler A. Umbilical cord blood transplantation--how, when and for whom? *Blood Rev* **2004**; 18(3):167-179.
212. Rosado-de-Castro PH, de Carvalho FG, de Freitas GR, Mendez-Otero R, Pimentel-Coelho PM. Review of Preclinical and Clinical Studies of Bone Marrow-Derived Cell Therapies for Intracerebral Hemorrhage. *Stem Cells Int* **2016**; 2016:4617983.
213. Baker KF, Isaacs JD. Prospects for therapeutic tolerance in humans. *Curr Opin Rheumatol* **2014**; 26(2):219-227.
214. Zheng GP, Ge MH, Shu Q, Rojas M, Xu J. Mesenchymal stem cells in the treatment of pediatric diseases. *World J Pediatr* **2013**; 9(3):197-211.

215. Fassas A, Anagnostopoulos A, Kazis A, Kapinas K, Sakellari I, Kimiskidis V, Tsompanakou A. Peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of progressive multiple sclerosis: first results of a pilot study. *Bone Marrow Transplant* **1997**; 20(8): 631–638.
216. Freedman MS. Bone marrow transplantation: does it stop MS progression? *J Neurol Sci* **2007**; 259(1–2): 85–89.
217. Burt RK, Traynor AE, Cohen B, Karlin KH, Davis FA, Stefoski D, Terry C, Lobeck L, Russell EJ, Goolsby C, Rosen S, Gordon LI, Keever-Taylor C, Brush M, Fishman M, Burns WH. T cell-depleted autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis: report on the first three patients. *Bone Marrow Transplant* **1998**; 21(6): 537–541.
218. Saiz A, Carreras E, Berenguer J, Yagüe J, Martínez C, Marín P, Rovira M, Pujol T, Arbizu T, Graus F. MRI and CSF oligoclonal bands after autologous hematopoietic stem cell transplantation in MS. *Neurology* **2001**; 56(8): 1084–1089.
219. Mancardi GL, Saccardi R, Filippi M, Gualandi F, Murialdo A, Inglese M, Marrosu MG, Meucci G, Massacesi L, Lugaresi A, Pagliai F, Sormani MP, Sardanelli F, Marmont A; Italian GITMO-NEURO Intergroup on Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Multiple Sclerosis. Autologous hematopoietic stem cell transplantation suppresses Gd-enhanced MRI activity in MS. *Neurology* **2001**; 57(1): 62–68.
220. Comi G, Kappos L, Clanet M, Ebers G, Fassas A, Fazekas F, Filippi M, Hartung HP, Hertenstein B, Karussis D, Martino G, Tyndall A, van der Meché FG. Guidelines for autologous blood and marrow stem cell transplantation in multiple sclerosis: a consensus report written on behalf of the European Group for Blood and Marrow Transplantation and the European Charcot Foundation. BMT-MS Study Group. *J Neurol* **2000**; 247(5): 376–382.
221. Fassas A, Kimiskidis VK. Stem cell transplantation for multiple sclerosis: what is the evidence? *Blood Rev* **2003**; 17(4): 233–240.
222. Scolding N, Marks D, Rice C. Autologous mesenchymal bone marrow stem cells: practical considerations. *J Neurol Sci* **2008**; 265(1–2): 111–115.
223. Obradović D, Balint B, Dinčić E, Raičević R, Obradović S, Tončev G, Kostić V. Primena matičnih ćelija u lečenju neuroloških oboljenja - da li je budućnost već stigla?. *Vojnosanitetski pregled* **2008**; 65(6):473-480.

224. Fassas A, Passweg JR, Anagnostopoulos A, Kazis A, Kozak T, Havrdova E, Carreras E, Graus F, Kashyap A, Openshaw H, Schipperus M, Deconinck E, Mancardi G, Marmont A, Hansz J, Rabusin M, Zuazu Nagore FJ, Besalduch J, Dentamaro T, Fouillard L, Hertenstein B, La Nasa G, Musso M, Papineschi F, Rowe JM, Saccardi R, Steck A, Kappos L, Gratwohl A, Tyndall A, Samijn J; Autoimmune Disease Working Party of the EBMT (European Group for Blood and Marrow Transplantation). Hematopoietic stem cell transplantation for multiple sclerosis. A retrospective multicenter study. *J Neurol* **2002**; 249(8): 1088–1097.
225. Hamano K, Li TS, Kobayashi T, Hirata K, Yano M, Kohno M, Matsuzaki M. Therapeutic angiogenesis induced by local autologous bone marrow cell transplantation. *Ann Thorac Surg* **2002**; 73(4): 1210-1215.
226. Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, Chiu RC. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* **2001**; 122(4): 699-705.
227. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Tsutsumi Y, Ozono R, Masaki H, Mori Y, Iba O, Tateishi E, Kosaki A, Shintani S, Murohara T, Imaizumi T, Iwasaka T. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* **2001**; 104(9): 1046-1052.
228. Mohamadnejad M, Alimoghaddam K, Mohyeddin-Bonab M, Bagheri M, Bashtar M, Ghanaati H, Baharvand H, Ghavamzadeh A, Malekzadeh R. Phase I trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis. *Arch Iran Med* **2007**; 10:459–466.
229. Kharaziha P, Hellström PM, Noorinayer B, Farzaneh F, Aghajani K, Jafari F, Telkabadi M, Atashi A, Honardoost M, Zali MR, Soleimani M. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: A phase I-II clinical trial. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2009**; 21: 1199–1205.
230. Amer ME, El-Sayed SZ, El-Kheir WA, Gabr H, Gomaa AA, El-Noomani N, Hegazy M. Clinical and laboratory evaluation of patients with end-stage liver cell failure injected with bone marrow-derived hepatocyte-like cells. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **2011**; 23:936–941.

231. Peng L, Xie DY, Lin BL, Zhu HP, Xie C, Zheng YB, Gao ZL. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: Short-term and long-term outcomes. *Hepatology* **2011**; 54:820–828.
232. 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.
233. Johnson K, Zhu S, Tremblay MS, Payette JN, Wang J, Bouchez LC, Meeusen S, Althage A, Cho CY, Wu X, Schultz PG. A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science* **2012**; 336: 717–721.
234. Cao L, Yang F, Liu G, Yu D, Li H, Fan Q, Gan Y, Tang T, Dai K. The promotion of cartilage defect repair using adenovirus mediated Sox9 gene transfer of rabbit bone marrow mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **2011**; 32:3910–3920.
235. Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, Panoskaltsis Mortari A, McElmurry RT, Bell S, Xia L, Zhou N, Riddle M, Schroeder TM, Westendorf JJ, McIvor RS, Hogendoorn PC, Szuhai K, Oseth L, Hirsch B, Yant SR, Kay MA, Peister A, Prockop DJ, Fibbe WE, Blazar BR. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* **2007**; 25:371–379.
236. Le Blanc K, Pittenger M. Mesenchymal stem cells: Progress toward promise. *Cytotherapy* **2005**; 7:36–45
237. Atsma DE, Fibbe WE, Rabelink TJ. Opportunities and challenges for mesenchymal stem cell-mediated heart repair. *Curr Opin Lipidol* **2007**; 18:645–649.
238. Faiella W, Atoui R. Therapeutic use of stem cells for cardiovascular disease. *Clin Transl Med* **2016**; 5(1):34.
239. Li L, Chen X, Wang WE, Zeng C. How to Improve the Survival of Transplanted Mesenchymal Stem Cell in Ischemic Heart? *Stem Cells Int* **2016**; 2016:9682757.
240. Kim N, Cho SG. New strategies for overcoming limitations of mesenchymal stem cell-based immune modulation. *Int J Stem Cells* **2015**; 8(1):54-68.
241. Marcucci F, Rumio C, Lefoulon F. Anti-Cancer Stem-like Cell Compounds in Clinical Development - An Overview and Critical Appraisal. *Front Oncol* **2016**; 6:115.
242. Mimeault M, Batra SK. Recent insights into the molecular mechanisms involved in aging and the malignant transformation of adult stem/progenitor cells and their therapeutic implications. *Ageing Res Rev* **2009**; 8(2):94-112.
243. Cuiffo BG, Karnoub AE. Mesenchymal stem cells in tumor development: emerging roles and concepts. *Cell Adh Migr* **2012**; 6(3):220-230.

244. Collado M, Blasco MA, Serrano M. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* **2007**; 130(2):223-33.
245. Sahin E, Depinho RA. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature* **2010**; 464(7288):520-528.
246. Varela E, Blasco MA. 2009 nobel prize in physiology or medicine: telomeres and telomerase. *Oncogene* **2010**; 29:1561-1565.
247. Rando TA. Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* **2006**; 441:1080-1086.
248. Ilic D. Industry highlights: Stem cell and regenerative medicine. *Regen Med* **2011**; 6(6 Suppl):55-60.
249. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **1999**; 284:143-147.
250. Arai F, Ohneda O, Miyamoto T, Zhang XQ, Suda T. Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J Exp Med* **2002**; 195:1549-1563.
251. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* **2002**; 13:4279-4295.
252. Christodoulou I, Kolisis FN, Papaevangeliou D, Zoumpourlis V. Comparative evaluation of human mesenchymal stem cells of fetal (Wharton's jelly) and adult (adipose tissue) origin during prolonged in vitro expansion: considerations for cytotherapy. *Stem Cells Int* **2013**; 2013:246134.
253. Eyckmans JI, Lin GL, Chen CS. Adhesive and mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation in human bone marrow and periosteum-derived progenitor cells. *Biol Open* **2012**; 1(11):1058-1068.
254. Welter JF, Penick KJ, Solchaga LA. Assessing adipogenic potential of mesenchymal stem cells: a rapid three-dimensional culture screening technique. *Stem Cells Int* **2013**; 2013:806525.
255. Lo Surdo JL, Millis BA, Bauer SR. Automated microscopy as a quantitative method to measure differences in adipogenic differentiation in preparations of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **2013**; 15(12):1527-1540.

256. Mvula B, Moore TJ, Abrahamse H. Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose derived stem cells. *Lasers Med Sci* **2010**; 25(1):33–39.
257. Zhong C, Zhang X, Xu Z, He R. Effects of low-intensity electromagnetic fields on the proliferation and differentiation of cultured mouse bone marrow stromal cells. *Phys Ther* **2012**; 92(9):1208–1219.
258. Martaćić JD, Francuski J, Luzajić T, Vuković N, Mojsilović S, Drndarević N, Petakov M, Glibetić M, Marković D, Radovanović A, Todorović V, Filipović MK. Characterization of deciduous teeth stem cells isolated from crown dental pulp. *Vojnosanit Pregl* **2014**; 71(8):735-741.
259. Longo A, Librizzi M, Naselli F, Caradonna F, Tobiasch E, Luparello C. PTHrP in differentiating human mesenchymal stem cells: transcript isoform expression, promoter methylation, and protein accumulation. *Biochimie* **2013**; 95(10):1888-1896.
260. Crisostomo PR, Wang M, Herring CM, Morrell ED, Seshadri P, Meldrum KK, Meldrum DR. Sex dimorphisms in activated mesenchymal stem cell function. *Shock* **2006**; 26(6):571-574.
261. Jeziarska-Drutel A, Rosenzweig SA, Neumann CA. Role of oxidative stress and the microenvironment in breast cancer development and progression. *Adv Cancer Res* **2013**; 119:107-125.
262. Kornicka K, Marycz K, Tomaszewski KA, Marędziak M, Śmieszek A. The Effect of Age on Osteogenic and Adipogenic Differentiation Potential of Human Adipose Derived Stromal Stem Cells (hASCs) and the Impact of Stress Factors in the Course of the Differentiation Process. *Oxid Med Cell Longev* **2015**; 2015:309169.
263. Islam MS, Stemig ME, Takahashi Y, Hui SK. Radiation response of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and human pluripotent stem cells. *J Radiat Res* **2015**; 56(2):269-277.
264. Takahata Y, Takarada T, Iemata M, Yamamoto T, Nakamura Y, Kodama A, Yoneda Y. Functional expression of beta2 adrenergic receptors responsible for protection against oxidative stress through promotion of glutathione synthesis after Nrf2 upregulation in undifferentiated mesenchymal C3H10T1/2 stem cells. *J Cell Physiol* **2009**; 218(2):268-275.
265. Zaletel I, Milošević NT, Todorović V, Kovačević-Filipović M, Puškaš N (2016) Fractal and gray level co-occurrence matrix texture analysis of senescent and non-senescent

- deciduous teeth stem cells: A pilot study. *Fractal Geometry and Nonlinear Anal in Med and Biol* **2016**; 2(2): 1-6.
266. Milosevic NT, Ristanovic D, Jelinek HF, Rajkovic K. Quantitative analysis of dendritic morphology of the α and δ retinal ganglion cells in the rat: a cell classification study. *J Theor Biol* **2009**; 259:142–150.
267. Zaletel I, Ristanovic D, Stefanovic BD, Puskas N. Modified Richardson's method versus the box-counting method in neuroscience. *J Neurosci Methods* **2015**; 242:93–96.
268. Puskas N, Zaletel I, Stefanovic BD, Ristanovic D. Fractal dimension of apical dendritic arborization differs in the superficial and the deep pyramidal neurons of the rat cerebral neocortex. *Neurosci Lett* **2015**; 589:88–91.
269. Chen SG, Tseng PC, Huang CH, Shen PC, Lo WY, Chan JY. Selective Criteria and Markers in Adipose-Derived Stromal Cells Collection Quality and Expansion Potency. *Ann Plast Surg* **2016**; 76 Suppl 1:S101-107.
270. Bogdanova A, Berzins U, Nikulshin S, Skrastina D, Ezerta A, Legzdina D, Kozlovska T. Characterization of human adipose-derived stem cells cultured in autologous serum after subsequent passaging and long term cryopreservation. *J Stem Cells* **2014**; 9(3):135-148.
271. van der Bogt KE, Schrepfer S, Yu J, Sheikh AY, Hoyt G, Govaert JA, Velotta JB, Contag CH, Robbins RC, Wu JC. Comparison of transplantation of adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the infarcted heart. *Transplantation*. **2009**; 87(5):642-652.
272. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Dragoo JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* **2003**; 174:101–109.
273. Izadpanah R, Trygg C, Patel B, Kriedt C, Dufour J, Gimble JM, Bunnell BA. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* **2006**; 99:1285–1297.
274. Álvaro-Gracia JM, Jover JA, García-Vicuña R, Carreño L, Alonso A, Marsal S, Blanco F, Martínez-Taboada VM, Taylor P, Martín-Martín C, DelaRosa O, Tagarro I, Díaz-González F. Intravenous administration of expanded allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in refractory rheumatoid arthritis (Cx611): results of a

- multicentre, dose escalation, randomised, single-blind, placebo-controlled phase Ib/IIa clinical trial. *Ann Rheum Dis* **2017**; 76(1):196-202.
275. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* **2003**; 18:696-704.
276. Mauney JR, Nguyen T, Gillen K, Kirker-Head C, Gimble JM, Kaplan DL. Engineering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3d scaffolds. *Biomaterials* **2007**; 28:5280-5290.
277. Zhao Y, Lin H, Zhang J, Chen B, Sun W, Wang X, Zhao W, Xiao Z, Dai J. Crosslinked three-dimensional demineralized bone matrix for the adipose-derived stromal cell proliferation and differentiation. *Tissue Eng Part A* **2009**; 15:13-21.
278. Hong L, Colpan A, Peptan IA, Daw J, George A, Evans CA. 17-beta estradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng* **2007**; 13:1197-1203.
279. Brayfield C, Marra K, Rubin JP. Adipose stem cells for soft tissue regeneration. *Handchir Mikrochir Plast Chir* **2010**; 42:124-128.
280. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer EF. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest* **1989**; 84:1663-1670.
281. Sen A, Lea-Currie YR, Sujkowska D, Franklin DM, Wilkison WO, Halvorsen YD, Gimble JM. Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem* **2001**; 81:312-319.
282. Gimble JM, Morgan C, Kelly K, Wu X, Dandapani V, Wang CS, Rosen V. Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* **1995**; 58:393-402.
283. Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, Silva D, Park BH, Liu J, Farmer SR. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. *Biochem J* **2003**; 376:607-613.
284. Won Park K, Halperin DS, Tontonoz P. Before they were fat: adipocyte progenitors. *Cell Metabolism* **2008**; 8:454-457.
285. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, Paschalis EP, Wilkison WO, Gimble JM. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* **2001**; 7:729-741.

286. Halvorsen YC, Wilkison WO, Gimble JM. Adipose-derived stromal cells– their utility and potential in bone formation. *Int J Obes* **2000**; 24(Suppl 4):S41-S44.
287. Lee JH, Rhie JW, Oh DY, Ahn ST. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stromal cells (hascs) in a porous three dimensional scaffold. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**; 370:456-460.
288. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* **2005**; 54:132-141.
289. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Bio Cell* **2002**; 13:4279-4295.
290. Winter A, Breit S, Parsch D, Benz K, Steck E, Hauner H, Weber RM, Ewerbeck V, Richter W. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis and Rheumatism* **2003**; 48:418-429.
291. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**; 290:763-769.
292. Dragoo JL, Samimi B, Zhu M, Thomas BJ, Lieberman JR, Hedrick MH, Benhaim P. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br* **2003**; 85:740-747.
293. Kim HJ, Im GI. Chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: Greater doses of growth factor are necessary. *J Orthop Res* **2009**; 27:612-619.
294. Estes BT, Wu AW, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis and Rheumatism* **2006**; 54:1222-1232.
295. Mahmoudifar N, Doran PM. Chondrogenic differentiation of human adipose-derived stem cells in polyglycolic acid mesh scaffolds under dynamic culture conditions. *Biomaterials* **2010**; 31:3858-3867.

296. Ehnert S, Glanemann M, Schmitt A, Vogt S, Shanny N, Nussler NC, Stöckle U, Nussler A. The possible use of stem cells in regenerative medicine: dream or reality? *Langenbecks Arch Surg* **2009**; 394(6):985-997.
297. Sampogna G, SY Guraya, Forgionea A. Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine. *Journal of Microscopy and Ultrastructure* **2015**; 3(3):101-107.
298. Kovac, M., M. Vaskova, D. Petrackova, Pelková V, Mejstříková E, Kalina T, Žaliová M, Weiser J, Starý J, Hrušák O. Cytokines, growth, and environment factors in bone marrow plasma of acute lymphoblastic leukemia pediatric patients. *Eur. Cytokine Netw* **2014**; 25: 8–13.
299. Zhou Y, Tsai TL, Li WJ. Strategies to retain properties of bone marrow-derived mesenchymal stem cells ex vivo. *Ann N Y Acad Sci* **2017**; 1409(1):3-17.
300. Solchaga, L.A., K. Penick, J.D. Porter, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF. FGF2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* **2005**; 203: 398–409.
301. Handorf AM, WJ Li. Fibroblast growth factor-2 primes human mesenchymal stem cells for enhanced chondrogenesis. *PLoS One* **2011**; 6: e22887.
302. Kaigler D, Krebsbach PH, West ER, Horger K, Huang YC, Mooney DJ. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. *FASEB J* **2005**; 19: 665–667.
303. Sankar S, Sharma CS, Rath SN, Ramakrishna S. Electrospun Fibers for Recruitment and Differentiation of Stem Cells in Regenerative Medicine. *Biotechnol J* **2017**; 12(12).
304. Dehghani Soltani S, Babae A, ShojaeiM, Salehinejad P, Seyedi F, JalalKamali M, Nematollahi-Mahani SN. Different effects of energy dependent irradiation of red and green lights on proliferation of human umbilical cord matrix-derived mesenchymal cells. *Lasers Med Sci* **2016**; 31(2):255–261.
305. Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG. Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg* **1971**; 122(4):532–535.
306. Kushibiki T, Hirasawa T, Okawa S, IshiharaM. Low reactive level laser therapy for mesenchymal stromal cells therapies. *Stem Cells Int* **2015**; 2015:974864.
307. Kim HJ, Jung J, Park JH, Kim JH, Ko KN, Kim CW. Extremely low-frequency electromagnetic fields induce neural differentiation in bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* **2013**; 238(8):923–931.

308. Ross CL, Siriwardane M, Almeida-Porada G, Porada CD, Brink P, Christ GJ, Harrison BS. The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cell Res* **2015**; 15(1):96–108.
309. Zhong C, Zhang X, Xu Z, He R. Effects of low-intensity electromagnetic fields on the proliferation and differentiation of cultured mouse bone marrow stromal cells. *Phys Ther* **2012**; 92(9):1208–1219.
310. de Villiers JA, Houreld NN, Abrahamse H Influence of low intensity laser irradiation on isolated human adipose derived stem cells over 72 hours and their differentiation potential into smooth muscle cells using retinoic acid. *Stem Cell Rev* **2011**; 7(4):869–882.
311. De Haas WG, Watson J, Morrison DM. Non-invasive treatment of ununited fractures of the tibia using electrical stimulation. *J Bone Joint Surg (Br)* **1980**; 62-B:465–470.
312. Aaron RK, Ciombor DM. Acceleration of experimental endochondral ossification by biophysical stimulation of the progenitor cell pool. *J Orthop Res* **1996**; 14(4):582–589.
313. Maziarz A, Kocan B, Bester M, Budzik S, Cholewa M, Ochiya T, Banas A. How electromagnetic fields can influence adult stem cells: positive and negative impacts. *Stem Cell Res Ther* **2016**; 7:54.
314. Zhang M, Li X, Bai L, Uchida K, Bai W, Wu B, Xu W, Zhu H, Huang H. Effects of low frequency electromagnetic field on proliferation of human epidermal stem cells: an in vitro study. *Bioelectromagnetics* **2013**; 34:74–80.
315. Tsai MT, Li WJ, Tuan RS, Chang WH. Modulation of osteogenesis in human mesenchymal stem cells by specific pulsed electromagnetic field stimulation. *J Orthop Res* **2009**; 27(9):1169–1174.
316. Ross CL, Siriwardane M, Almeida-Porada G, Porada CD, Brink P, Christ GJ, Harrison BS (2015) The effect of low-frequency electromagnetic field on human bone marrow stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cell Res* **2015**; 15(1):96–108.
317. Kushibiki T, Hirasawa T, Okawa S, Ishihara M. Low Reactive Level Laser Therapy for Mesenchymal Stromal Cells Therapies. *Stem Cells Int* **2015**; 2015:974864.
318. Wu JY, Wang YH, Wang GJ, Ho ML, Wang CZ, Yeh ML, Chen CH. Low-power GaAlAs laser irradiation promotes the proliferation and osteogenic differentiation of stem cells via IGF1 and BMP2. *PLoS One* **2012**; 7(9):e44027.
319. Soleimani M, Abbasnia E, Fathi M, Sahraei H, Fathi Y, Kaka G. The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow

- mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts--an in vitro study. *Lasers Med Sci* **2012**; 27(2):423-430.
320. Kang KS, Hong JM, Kang JA, Rhie JW, Jeong YH, Cho DW. Regulation of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by controlling electromagnetic field conditions. *Exp Mol Med* **2013**; 45:e6.
321. Luo F, Hou T, Zhang Z, Xie Z, Wu X, Xu J. Effects of pulsed electromagnetic field frequencies on the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Orthopedics* **2012**; 35:e526–31.
322. Mayer-Wagner S, Passberger A, Sievers B, Aigner J, Summer B, Schiergens TS, Jansson V, Müller PE. Effects of low frequency electromagnetic fields on the chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bioelectromagnetics* **2011**; 32:283–290.
323. Bloise N, Ceccarelli G, Minzioni P, Vercellino M, Benedetti L, De Angelis MG, Imbriani M, Visai L. Investigation of low-level laser therapy potentiality on proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells in the absence/presence of osteogenic factors. *J Biomed Opt* **2013**; 18(12):128006.
324. Incerti Parenti S, Panseri S, Gracco A, Sandri M, Tampieri A, Alessandri Bonetti G. Effect of low-level laser irradiation on osteoblast-like cells cultured on porous hydroxyapatite scaffolds. *Ann Ist Super Sanita* **2013**; 49(3):255-260.
325. Safari M, Jadidi M, Baghian A, Hasanzadeh H. Proliferation and differentiation of rat bone marrow stem cells by 400 μ T electromagnetic field. *Neurosci Lett* **2016**; 26;612:1-6.
326. Fathi E, Farahzadi R. Zinc Sulphate Mediates the Stimulation of Cell Proliferation of Rat Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells Under High Intensity of EMF Exposure. *Biol Trace Elem Res* **2017**; [Epub ahead of print].
327. Marycz K, Lewandowski D, Tomaszewski KA, Henry BM, Golec EB, Marędziak M. Low-frequency, low-magnitude vibrations (LFLM) enhances chondrogenic differentiation potential of human adipose derived mesenchymal stromal stem cells (hASCs). *PeerJ* **2016**; 4:e1637.
328. Chen CH, Lin YS, Fu YC, Wang CK, Wu SC, Wang GJ, Eswaramoorthy R, Wang YH, Wang CZ, Wang YH, Lin SY, Chang JK, Ho ML. Electromagnetic fields enhance chondrogenesis of human adipose-derived stem cells in a chondrogenic microenvironment *in vitro*. *J Appl Physiol (1985)* **2013**; 114(5):647-655.

329. Park IS, Chung PS, Ahn JC. Adipose-derived stem cell spheroid treated with low-level light irradiation accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. *Cytherapy* **2017**; 19(9):1070-1078.
330. Odínokov D, Hamblin MR. Aging of lymphoid organs: Can photobiomodulation reverse age-associated thymic involution via stimulation of extrapineal melatonin synthesis and bone marrow stem cells? *J Biophotonics* **2017**; [Epub ahead of print].
331. Fathi E, Farahzadi R, Rahbarghazi R, Samadi Kafil H, Yolmeh R. Rat adipose-derived mesenchymal stem cells aging reduction by zinc sulfate under extremely low frequency electromagnetic field exposure is associated with increased telomerase reverse transcriptase gene expression. *Vet Res Forum* **2017**; 8(2):89-96.
332. Orciani M, Gorbi S, Benedetti M, Di Benedetto G, Mattioli-Belmonte M, Regoli F, Di Primio R. Oxidative stress defense in human-skin-derived mesenchymal stem cells versus human keratinocytes: Different mechanisms of protection and cell selection. *Free Radic Biol Med* **2010**; 49:830-838.
333. Valle-Prieto A, Conget PA. Human mesenchymal stem cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cells Dev* **2010**; 19:1885-1893.
334. Vacanti NM, Metallo CM. Exploring metabolic pathways that contribute to the stem cell phenotype. *Biochim Biophys Acta* **2013**; 1830:2361-2369.
335. Hudson DE, Hudson DO, Wininger JM, Richardson BD. Penetration of laser light at 808 and 980 nm in bovine tissue samples. *Photomed Laser Surg* **2013**; 31(4):163–168.
336. Joensen J, Ovsthus K, Reed RK, Hummelsund S, Iversen VV, Lopes-Martins RÁ, Bjordal JM. Skin penetration timeprofiles for continuous 810 nm and superpulsed 904 nm lasers in a rat model. *Photomed Laser Surg* **2012**; 30(12):688–694.
337. Schwartz Z, Fisher M, Lohmann CH, Simon BJ, Boyan BD. Osteoprotegerin (OPG) production by cells in the osteoblast lineage is regulated by pulsed electromagnetic fields in cultures grown on calcium phosphate substrates. *Ann Biomed Eng* **2009**; 37:437–444.
338. Yan J, Dong L, Zhang B, Qi N. Effects of extremely lowfrequency magnetic field on growth and differentiation of human mesenchymal stem cells. *Electromagn Biol Med* **2010**; 29:165–176.
339. Chalut KJ, Kulangara K, Wax A, Leong KW. Stem cell differentiation indicated by noninvasive photonic characterization and fractal analysis of subcellular architecture. *Integr Biol (Camb)* **2011**; 3(8):863–867.

340. Park SH, Shin JW, Kang YG, Hyun J-S, Oh MJ, Shin J-W. Texture analyses show synergetic effects of biomechanical and biochemical stimulation on mesenchymal stem cell differentiation into early phase osteoblasts. *Microsc Microanal* **2014**; 20(1):219–227
341. Ishikawa K. Intracoronary injection of large stem cells: size matters. *Circ Cardiovasc Interv* **2015**; 8(5).
342. Koç ON. Clinical trials of human mesenchymal stem cells to support hematopoietic stem cell transplantation. In: Nolte JA (ed) *Genetic engineering of mesenchymal stem cells*. Springer, Houten, **2006**; 151–162.
343. Nurković J, Zaletel I, Nurković S, Hajrović Š, Mustafić F, Isma J, Škevin AJ, Grbović V, Filipović MK, Dolićanin Z. Combined effects of electromagnetic field and low-level laser increase proliferation and alter the morphology of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Lasers Med Sci* **2017**; 32(1):151-160.