

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Egidijus
ŠIMOLIŪNAS

Molekulinių mechanizmų tyrimai ląstelėse, sąveikaujančiose su dirbtiniais karkasais

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
Biochemija (N 004)

VILNIUS 2021

Disertacija rengta 2016–2020 metais Gyvybės mokslų centre, Biochemijos institute.

Mokslinė vadovė:

dr. Daiva Baltriukienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

VILNIUS UNIVERSITY

Egidijus
ŠIMOLIŪNAS

Study of molecular mechanisms induced by cell-scaffold interaction

DOCTORAL DISSERTATION

Nature Sciences,
Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2021

This dissertation was written between 2016 and 2020 at the Vilnius University, Life Sciences Center, Institute of Biochemistry.

Academic supervisor:

PhD Daiva Baltriukienė (Vilnius University, Nature Sciences, Biochemistry N 004).

TURINYS

SANTRUMPOS	9
ĮVADAS	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA	16
1.1. Mechanobiologija.....	16
1.1.1. Mechanojutimas ir signalo perdavimas.....	17
1.1.1.1. Užląstelinis užpildas	19
1.1.1.2. Integrinai	21
1.1.1.3. Fokalinės adhezijos.....	22
1.1.1.4. Adhezinės jungtys.....	22
1.1.1.5. Citoskeletas	23
1.1.1.6. Branduolys	23
1.2. Audinių inžinerija ir ląstelių terapija.....	24
1.2.1. Audinių inžinerija	25
1.2.1.1. Medžiagos naudojamos audinių inžinerijoje.....	26
1.2.1.2. 3D spausdinimo technologijos	27
1.2.1.3. Kamieninės ląstelės, naudojamos audinių inžinerijoje	27
1.2.2. Ląstelių terapija.....	29
1.2.2.1. Kamieninės ląstelės naudojamos ląstelių terapijoje.....	31
1.2.3. Audinių gijimas ir uždegimas	33
1.2.3.1. Signaliniai keliai dalyvaujantys žaizdų gijime.....	34
1.2.3.2. Oksidacinis stresas	35
1.3. Vėžiniai susirgimai	35
1.3.1. Vėžio aplinka	37
1.3.2. Krūties vėžys.....	38
1.3.3. Krūties vėžio MCF-7 linija	39
1.3.4. Priešvėžinis vaistas doksorubicinas	40
1.3.5. Vėžys ir mechanobiologija.....	41
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	46
2.1. Medžiagos	46

2.2. Metodai	47
2.2.1. Ląstelių išskyrimas.....	47
2.2.2. Ląstelių kultivavimas	48
2.2.3. Ląstelių paviršiaus žymenų tyrimas tėkmės citometru	48
2.2.4. Ląstelių diferenciacinio potencialo vertinimas	49
2.2.5. MTT metodas	50
2.2.6. DMKL gyvybingumo vertinimas po poveikio vandenilio peroksidu	50
2.2.7. MCF-7 gyvybingumo vertinimas po poveikio doksorubicinu	51
2.2.8. Ląstelių adhezijos tyrimas.....	51
2.2.9. Ląstelių proliferacijos tyrimas DAPI metodu	52
2.2.10. Ląstelių baltymų raiškos ir fosforilinimo tyrimai.....	52
2.2.10.1. Ląstelių lizavimas	52
2.2.10.2. Baltymų kiekio nustatymas Bradfordo reagentu.....	53
2.2.10.3. Baltymų denatūracija	53
2.2.10.4. NDS-PAGE.....	53
2.2.10.5. Imunoblotingo analizė	54
2.2.11. MAP kinazių vaidmens tyrimai.....	55
2.2.12. Kontroliuojamo kietumo poliakrilamidinių gelių gamyba	55
2.2.13. Poliakrilamidinių gelių kietumo matavimas AJM.....	56
2.2.14. 2,5D ir 3D karkasų gamyba.....	56
2.2.15. Statistinė analizė.....	57
3. REZULTATAI.....	58
3.1. Metodo, ląstelių skaičiaus vertinimui 2D ir 3D aplinkose, sukūrimas	58
3.1.1. Ląstelių lizės buferinių tirpalų efektyvumo vertinimas.....	58
3.1.2. Darbinių DAPI koncentracijų nustatymas	60
3.1.3. DAPI fluorescencijos signalo priklausomybė nuo ląstelių skaičiaus.	61
3.1.4. Ląstelių skaičiaus vertinimas 2D, 2,5D ir 3D aplinkose	66
3.2. Paviršiaus kietumo įtaka DMKL atsakui į oksidacinį stresą.....	68
3.2.1. DMKL charakterizavimas.....	68
3.2.2. DMKL diferenciacijos potencialo įvertinimas	69
3.2.3. Poliakrilamidinių gelių kietumo vertinimas.....	71

3.2.4. DMKL adhezijos ant skirtingo kietumo paviršių kinetika	71
3.2.5. Paviršiaus kietumo įtaka DMKL morfologijai	72
3.2.6. DMKL suformuotų fokolinių adhezijų skaičiaus priklausomybė nuo auginimo paviršiaus kietumo	74
3.2.7. DMKL proliferacija ant skirtingų kietumo paviršių	75
3.2.8. Paviršiaus kietumo įtaka DMKL vandenilio peroksido jautrumui.....	76
3.2.9. MAPK raiškos ir fosforilavimo pokyčiai DMKL atsakant į oksidacinį stresą skirtingo kietumo aplinkose	79
3.2.10. Transkripcijos veiksnio AP-1 raiškos ir aktyvinimo pokyčiai skirtingo kietumo aplinkose oksidacinio streso metu.....	81
3.2.11. MAPK vaidmuo DMKL atsakant į oksidacinį stresą	83
3.3. Paviršiaus kietumo įtaka krūties vėžio ląstelių linijos MCF-7 jautrumui priešvėžiniam vaistui doksorubicinui.....	84
3.3.1. MCF-7 adhezijos ant skirtingo kietumo paviršių kinetika	85
3.3.2. MCF-7 morfologija ant skirtingo kietumo paviršių	87
3.3.3. Skirtingų kietumų paviršių įtaka MCF-7 adhezijai	88
3.3.4. Paviršių kietumo įtaka MAPK raiškai ir aktyvinimui MCF-7 ląstelėse	90
3.3.5. MCF-7 proliferacija ant skirtingo kietumų paviršių	94
3.3.6. MCF-7 ląstelių jautrumas doksorubicinui.....	94
3.3.7. Paviršiaus kietumo įtaka MAP kinazių vaidmeniui MCF-7 atsakant į doksorubicino poveikį	96
3.3.8. Mechaninio stimuliavimo įtaka MCF-7 morfologijai	97
3.3.9. Mechaninio stimuliavimo įtaka MCF-7 ląstelių proliferacijai	98
3.3.10. Mechaninio stimuliavimo įtaka MCF-7 ląstelių jautrumui doksorubicino poveikiui.....	99
4. REZULTATŲ APTARIMAS	101
4.1. Metodas ląstelių skaičiaus įvertinimui 2D–3D aplinkose	101
4.2. DMKL jautrumas oksidaciniam stresui skirtingo kietumo mechaninėse aplinkose	103
4.3. Paviršiaus kietumo įtaka MCF-7 ląstelių atsparumui doksorubicinui.....	106
IŠVADOS.....	110

MOKSLINIAI PASIEKIMAI	112
FINANSINĖ PARAMA.....	116
PADĖKA.....	117
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	118
PRIEDAI	163

SANTRUMPOS

AA – akrilamidas;
AP – aprotininas;
AP-1 – aktyvuojantis baltymus (*activator protein 1*)
APS – amoniopersulfatas;
BIS – bisakrilamidas;
CAF – *vėžinio audinio fibroblastai (cancer-associated fibroblasts)*;
DAMP – su pažeidimu asocijuoti molekuliniai žymenys (*damage-associated molecular patterns*);
DAPI – 4', 6-diamidino-2-fenilindolis;
DMEM – *Dulbecco* modifikuota *Eagle* terpė;
DMKL – dantenų mezenchiminės kamieninės ląstelės;
DMSO – dimetilsulfoksidas;
DPKL – dantų pulpos mezenchiminės kamieninės ląstelės;
DTT – ditionitritolis;
ECL – chemoluminescencijos tirpalai;
EDTA – etilendiamintetraacto rūgštis;
ER – estrogeno receptorius;
ERK – užląstelinių signal reagiuojama kinazė (*extracellular signal-regulated kinase*);
FAK – fokalinės adhezijos kinazė;
FBT – Fosfatinis buferinis tirpalas;
FDM – lydyto nusėdimo modeliavimas (*fused deposition modeling*);
FVS – fetalinis veršelio serumas;
HIF1/2- α – hipoksijos įjungiamas veiksnys 1/2 α (*hypoxia induced factor 1/2 α*);
HRP – krienų peroksidazė (*horseradish peroxidase*);
IMDM – *Iscove* modifikuota *Dulbecco* terpė;
JNK – c-Jun N galo kinazė;
KS10 – 10 dienų ląstelių stimuliacija kietu paviršiumi;
KT – kambario temperatūra;
MAPK – mitogenų aktyvuojamos baltymų kinazės (*mitogen activated protein kinase*);
MKL – mezenchiminės kamieninės ląstelės;
MS10 – 10 dienų ląstelių stimuliacija minkštu paviršiumi;

NCBT – natrio citrato buferinis tirpalas;
NDS – natrio dodecilsulfatas;
PCL – polikaprolaktonas (*polycaprolactone*);
PDMS – polidimetilsulfoksidas;
PEG – polietilenglikolis;
PLA – polilaktinės rūgšties polimeras (*polylactic acid*);
PMSF – fenilmetilsulfonilfloridas;
PR – progesterone receptorių;
PRR – žymenys atpažįstantys receptoriai (*patterns recognition receptors*);
PVDF – polivinildenfluoridas;
ROS – reaktyvios deguonies formos (*reactive oxygen species*);
SLA – Stereolitografija;
TEMED – tetrametiletildiaminas;
TGF- β – audinių augimo veiksnys β (*Tissue growth factor β*);
VEGF - kraujagyslių endotelio augimo veiksnys (*Vascular Endothelial Growth Factor*);
VSA – veršelio serumo albuminai;
ŽEAV2R – žmogaus epidermio augimo veiksnio 2 receptorių;

IVADAS

Skirtingų audinių ląstelėms būdinga labai savita augimo aplinka. Nuo audinio tipo priklauso ar audinyje dominuoja tarpląstelinės sąveikos ar ląstelių sąveikos su užląstelinio užpildo. Be to, skirtingi audiniai taip pat pasižymi ir specifinėmis užląstelinio užpildo savybėmis, kurios lemia skirtingą audinių kietumą. Vieni minkščiausių audinių organizme yra smegenys, kurių kietumas siekia vos 0,1–1 kPa, vidutiniu kietumu pasižymi raumens audinys, jo standumas svyruoja nuo 5 iki 12 kPa, o kietiausi mūsų kūno audiniai yra kremzlės ir kaulai – nuo 40 kPa iki 4 GPa. Tačiau audinių kietumas nėra pastovus, o ypač dideli pokyčiai vyksta vystantis organizmui. Ši mechaninė savybė pasitarnauja kaip signalinis stimulus reguliuojantis ląstelių migraciją, diferenciaciją bei kitus gyvybinius procesus. Ląstelių aplinkos mechaninių savybių pokyčiai vyksta ir įvairių ligų patogenezės metu.

Mechaninės aplinkos jutime – mechanojutime, dalyvauja labai daug ląstelės komponentų, kuriuos galima suskirstyti į penkias pagrindines grupes: i) fokalinės adhezijos, ii) baltymų kompleksus, dalyvaujančius tarpląstelinės sąveikos užtikrinime, iii) į mechanines deformacijas reaguojančius jonų kanalus, iv) ląstelės citoskeletą ir v) branduolį. Visi jie padeda mechaninius signalus paversti biocheminiais. Šiuos procesus, pradedant mechaninio signalo priėmimu, baigiant ląstelės atsaką į stimulą, tiria dar pakankamai jauna mokslo sritis mechanobiologija, kurios atsiradimą lėmė visa eilė pastebėjimų apie mechaninių poveikių milžinišką įtaką ląstelių procesams. Paviršiaus mechaninės bei topografinės savybės reguliuoja įvairias ląstelių savybes, pradedant proliferacija, migracija, baigiant ląstelių diferenciacija ir net žūties procesų reguliavimu. Taip pat, pastebėta, kad įvairių ligų vystymosi metu smarkiai pakinta audinio mechaninės savybės, o tai ypač svarbu tolimesnei ligos eigai ir gydymo efektyvumui. Dėl šių priežasčių, mechanobiologija pastaruoju metu sulaukia vis daug dėmesio, tiriant įvairių ligų patogenezės mechanizmus, taip pat į mechaninės aplinkos poveikį vis dažniau atsižvelgiama ir sprendžiant regeneracinės medicinos problemas.

Regeneracinė medicina – tai medicinos sritis, kurios tikslas yra atkurti pažeistus ar užauginti naujus audinius. Šią medicinos sritį galima skirstyti į dvi šakas: ląstelių terapiją ir audinių inžineriją. Ląstelių terapija orientuota į audinių ar jų funkcijų atstatymą, naudojant kamienines ląsteles ar jų išskiriamas medžiagas. Ši tyrimų šaka yra plačiai tyrinėjama – yra atliekama visa eilė klinikinių ir ikiklinikinių tyrimų, skirtų, neurologinių, širdies ir kraujagyslių, autoimuninių ir kt. ligų gydymui. Nemažai pasistūmėjo ir audinių inžinerijos sritis. Kitaip nei ląstelių terapija, šios mokslo srities tikslas

yra sukurti naujus, funkcionalius dirbtinius audinius, o ne atkurti pažeistus. Dėl to, be kamieninių ląstelių, čia labai svarbų vaidmenį atlieka ir dirbtinis karkasas, kuris suteikia audiniui formą bei aplinką ląstelėms sąveikauti ir migruoti. Nors šiai mokslo šakai dar tik 30 metų, tačiau per šį laikotarpį pasiekta daug svarbių atradimų, visgi, dabartinės žinios ir technologijos leidžia sukurti ir regeneruoti tik pakankamai paprastus audinius – kaulus, kremzles, odą. Todėl, mechanobiologijos tyrimai yra labai svarbūs, norint stimuliuoti regeneracines, imunomoduliacines kamieninių ląstelių funkcijas, tiksliai valdyti ląstelių diferenciaciją ir migraciją.

Viena pagrindinių žmonių mirties priežasčių pasaulyje išlieka vėžiniai susirgimai. Šiuos susirgimus lemia nekontroliuojamai besidalinančios ląstelės, kurios sukelia įvairių audinių pažeidimus ir galiausiai lemia individo mirtį. Ši liga gali prasidėti bet kuriame audinyje, kai dėl mutacijos ar genetinių veiksnių ląstelės įgyja galimybę neribotai daugintis. Vėžiniai susirgimai skirstomi pagal tai kuriame audinyje atsirado pirmosios vėžinės ląstelės. Daugiausiai pasaulyje diagnozuojama krūties vėžio atveju, o daugiausiai gyvybių nusineša plaučių vėžys. Pastarųjų metų duomenys rodo, kad vėžiniai susirgimai nėra vien tik vėžinių ląstelių nulemta liga. Labai svarbų vaidmenį ligos vystymesi ir jos gydymo efektyvumui turi vėžio aplinka, kurią be vėžinių ląstelių sudaro vėžinio audinio fibroblastai, įvairios kamieninės ląstelės, imuninės ląstelės ir kt. Vėžinio audinio mechaninė aplinka taip pat atlieka labai svarbią funkciją ir keičiasi kartu su besivystančiu vėžiniu audiniu. Ši vėžinio audinio ypatybė netgi yra naudojama vėžio diagnostikai ir vadinama palpacija. Vėžiniai audiniai dažniausiai yra kietesni už atitinkamą sveiką audinį. Nustatyta, kad mechaninė aplinka koreliuoja su vėžio stadija bei išgyjimo tikimybe.

Taigi, šiame darbe tyrėme, kaip mechaninė aplinka veikia mezenchiminių kamieninių ląstelių ir krūties vėžio ląstelių savybes bei jų gebėjimą reaguoti įvairius citotoksinius ar terapinius poveikius. Pirmuoju atveju vertiname mezenchiminių kamieninių ląstelių atsparumą oksidaciniam stresui, priklausomai nuo aplinkos kietumo. Oksidacinį stresą sukelia oksidantų ir antioksidantų disbalansas, lemiantis reaktyvių deguonies formų padidėjimą. Šios reaktyvios deguonies formos, reaguodamos su ląstelių komponentais, sukelia įvairius pažeidimus: inaktyvuoja baltymus, sukelia DNR mutacijas, padidina membranų pralaidumą ir kt. Oksidacinis stresas yra ir vienas pirmųjų veiksnių, kurį patiria ląstelių terapijos metu į pažeistą audinį grąžintos ląstelės. Nuo to, kaip ląstelės reaguos į oksidacinį stresą, priklauso jų išgyvenamumas, imunomoduliacinės funkcijos, diferenciacijos ir atsinaujinimo potencialas.

Vystantis vėžiui, audinio mechaninės savybės kinta dėl vėžinio audinio fibroblastų sintetinių užląstelinio užpildo komponentų. Literatūros duomenys rodo, kad audinio mechaninė aplinka svarbi vystantis vėžinių ląstelių atsparumui priešvėžiniams vaistams. Pavyzdžiui, dėl padidėjusio vėžinio audinio kietojo kūno spūdzio ir tarpląstelinio skysčio slėgio yra užspaudžiamos audinio kraujagyslės, taip iš naviko „išplaunant“ priešvėžinius vaistus. Toks vėžinis susirgimas tampa atsparus tiek spindulinei (dėl hipoksinių sąlygų) terapijai, tiek chemoterapijai. Be šių jėgų, vėžinį audinį veikia ir jo paties kietumas. Dėl to, šio darbo metu vertinome krūties vėžio ląstelių linijos MCF-7 jautrumą chemoterapinio vaisto doksorubicino poveikiui, priklausomai nuo paviršiaus mechaninių savybių.

Darbo tikslas – įvertinti paviršiaus mechaninės aplinkos savybių įtaką sveiko (mezenchimininių kamieninių ląstelių) bei vėžinio (krūties vėžio ląstelių linijos MCF-7) audinio kilmės ląstelių savybėms ir jautrumui citotoksiniams poveikiams.

Uždaviniai:

1. Sukurti metodą, leidžiantį įvertinti ląstelių skaičių 2,5D ir 3D aplinkose;
2. Įvertinti paviršiaus mechaninių savybių poveikį žmogaus dantenų mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms ir jų jautrumui oksidaciniam stresui;
3. Nustatyti mitogenų aktyvuojamų baltymų kinazių (angl. *Mitogen-activated protein kinases*, MAPK) vaidmenį dantenų mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms atsakant į oksidacinį stresą skirtingo kietumo aplinkose;
4. Įvertinti vėžinių ląstelių elgseną ant skirtingo kietumo paviršių ir nustatyti, ar mechaninė aplinka daro įtaką MCF-7 ląstelių atsparumui doksorubicino poveikiui;
5. Ištirti MAPK vaidmenį MCF-7 ląstelėms atsakant į doksorubicino poveikį skirtingo kietumo aplinkose;
6. Palyginti, kaip mechaninis stimuliavimas minkšta (1 kPa) ir kieta (10 GPa) aplinka veikia MCF-7 ląsteles ir jų atsaką į doksorubicino poveikį.

Darbo mokslinis naujumas ir aktualumas

Mechanobiologija – tai mokslo sritis, kuri tiria kaip išorinės ir viduląstelinės mechaninės jėgos prisideda prie vystymosi, ląstelių diferenciacijos, audinių homeostazės bei įvairių ligų patogenezės. Tai palyginti nauja mokslo sritis, kuri jungia platų spektrą kitų mokslo disciplinų, tokių kaip vystymosi biologija, regeneracinė medicina, vėžio biologija ir kt. Mechanobiologija intensyviai pradėta tyrinėti tik šio tūkstantmečio pradžioje, atsiradus technologijoms, leidžiančioms įvertinti ir generuoti labai mažas jėgas. Per beveik du dešimtmečius buvo parodyta, kad mechaninė aplinka daro milžinišką poveikį audinio ląstelėms, nuo jos savybių priklauso ląstelių proliferacija, migracija, diferenciacija, imunomoduliacija ir net genų raiška. Evoliucijos eigoje, ląstelėse susiformavo ne vienas mechanizmas, kurio pagalba ląstelės geba jausti ir atsakyti į mechaninius veiksnus.

Vis daugiau tyrimų parodo, kad įvairios ligos nėra sukeltos ar nulemtos vieno veiksnio – dažnu atveju tai yra sąveika keleto skirtingų veiksnių. Pavyzdžiui, plaučių fibrozės atveju, dėl įvairių priežasčių sukeltas plaučių audinio sukietėjimas aktyvuoja plaučių audinio fibroblastus, kurie, sintetindami užląstelinio užpildo komponentus, dar labiau kietina plaučių audinį. Taip inicijuojama grandininė reakcija – audiniui kietėjant aktyvuojama dar daugiau audinio fibroblastų, kurie dar labiau skatina audinio kietėjimą. Taigi, net pašalinus pradinį audinio sukietėjimą indukavusį veiksni, išlikusi pakitusi mechaninė aplinka toliau skatina ligos vystymąsi. Panašūs procesai stebimi ir vėžinių susirgimų atveju, kurių metu po remisijos stebimas recidyvavęs vėžinis susirgimas. Yra manoma, kad likusi pakitusi vėžinio audinio aplinka gali skatinti naujo vėžinio susirgimo susiformavimą ir vystymąsi. Dėl to labai svarbu suprasti, kaip mechaninės aplinkos savybės veikia vėžines ląsteles ir jų jautrumą priešvėžiniams vaistams. Iki šiol, kiek mums žinoma, nebuvo atlikta tyrimų, kurių metu būtų vertinta kaip minkštus, vidutinio kietumo ir kietus audinius atitinkantys paviršiai veiks krūties vėžio ląstelių liniją MCF-7. Yra duomenų su kitomis ląstelių linijomis, pavyzdžiui, tiriant krūties vėžio linijos MDA-MB-231 ląsteles ir kasos vėžio ląsteles parodyta, kad jų jautrumas priešvėžinių vaistų poveikiui priklauso nuo aplinkos mechaninių savybių. Tačiau MDA-MB-231 krūties ląstelių linija atitinka tik nedidelės dalies, apie 10–15 % krūties vėžio atvejų fenotipą, kai tuo tarpu MCF-7 ląstelių linija – net 70 % vėžio atvejų fenotipą. Mūsų tyrimas parodė, kad MCF-7 ląstelių linija, kaip ir MDA-MB-231 yra veikiamas jas supančios aplinkos mechaninių savybių, tačiau, MCF-7 ląstelių jautrumas chemoterapiniam vaistui doksorubicinui nepriklausė nuo aplinkos kietumo.

Taigi, skirtingų fenotipų krūties vėžio ląstelės į aplinkos mechanines savybes atsako skirtingai.

Regeneracinėje medicinoje įvairiais tikslais naudojama daug įvairios kilmės kamieninių ląstelių, tarp kurių populiariausios yra mezenchiminės kamieninės ląstelės, nes jos pasižymi aukštu diferenciacijos potencialu, imunomoduliacinėmis ir oksidacinį stresą slopinančiomis savybėmis. Dantų mezenchiminės kamieninės ląstelės nėra labai plačiai tyrinėtos, tačiau sulaukia nemažai dėmesio dėl galimo jų panaudojimo terapiniams tikslams. Šiame darbe įvertinome jų sąveiką su skirtingais organizmo audinių kietumus atitinkančiais paviršiais ir pirmą kartą parodėme, kad mezenchiminių kamieninių ląstelių jautrumas oksidaciniam stresui priklauso nuo mechaninių aplinkos savybių. Gauti tyrimų duomenys leidžia teigti, kad skirtingų šaltinių mezenchiminės kamieninės ląstelės gali būti atsparesnės stresiniams, jų gyvybingumą veikiantiems faktoriams, aplinkoje, artimoje jų kilmės audinio kietumui. Tokia mezenchiminių kamieninių ląstelių savybė, vien tinkamai pasirinkus šių ląstelių šaltinį, leistų smarkiai pagerinti regeneracinės medicinos efektyvumą.

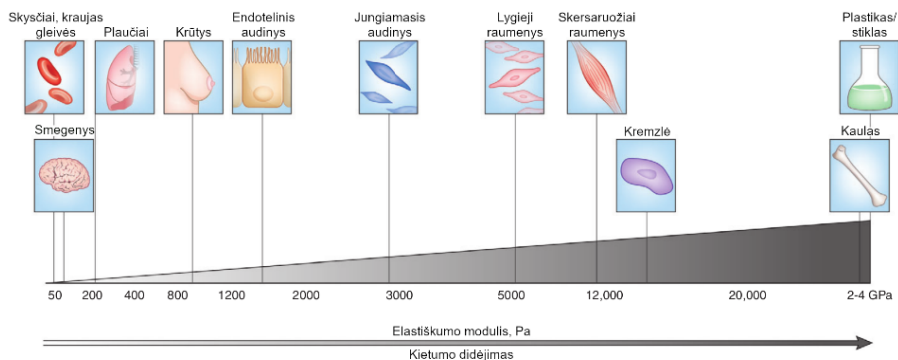
Taip pat, šio tiriamojo darbo pradžioje buvo sukurtas metodas, kurio pagalba galima įvertinti ląstelių skaičių tiek paprastose 2D aplinkose, tiek sudėtingose 3D struktūrose. Šis metodas yra pagrįstas DNR specifiniu DAPI dažu, kurio fluorescencijos ekstinkcijos koeficientas saveikoje su DNR išauga ~20 kartų. Mes parodėme, kad metodas yra suderinamas su vėžinėmis, kamieninėmis ir pirminėmis kamieninėmis ląstelėmis. Jo jautrumas priklauso nuo atitinkamos ląstelių linijos. Visgi, metodas nėra tinkamas ląstelių skaičiaus vertinimui citotoksiniuose tyrimuose, nes juo negalima atskirti gyvų ir žuvusių ląstelių.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Mechanobiologija

Mechanobiologija – tai mokslo sritis, kuri tiria kaip išorinės bei viduląstelinės mechaninės jėgos prisideda prie vystymosi, ląstelių diferenciacijos, audinių homeostazės ir įvairių ligų patogenezės. Nors pirmasis tiriamasis darbas teigiantis, kad mechaninės jėgos lemia kaulinio audinio struktūrinius pokyčius buvo publikuotas beveik prieš 120 metų, tačiau intensyvūs šios srities tyrimai prasidėjo tik XXI amžiuje [1–3]. Tai galėjo būti susiję su tyrimams reikiamų įrankių stoka – pagrindiniai molekulinės biologijos įrankiai, skirti vertinti mechanobiologijos procesus buvo sukurti XX amžiuje. Be to, tik XX amžiaus pabaigoje buvo sukurtos technologijos leidžiančios tirti itin mažų jėgų poveikį ląstelėms.

Mūsų organizme kiekvienas audinys turi jam specifinę mechaninę aplinką, kuri yra būtina to audinio funkcijos ir homeostazės užtikrinimui (1.1 pav.). Net maži audinio standumo nuokrypiai gali lemti įvairių ligų išsivystymą, pavyzdžiui, normalus plaučių audinio kietumas yra apie 0,5 kPa, tačiau pasiekus didesnę nei 3 kPa standumą yra aktyvuojami plaučių audinio fibroblastai, kurie pradeda sintetinti užląstelinio užpildo baltymus ir tokiu būdu skatina plaučių fibrozės vystymąsi [4].



1.1 pav. Skirtingų audinių kietumo palyginimas. Parengta pagal [5].

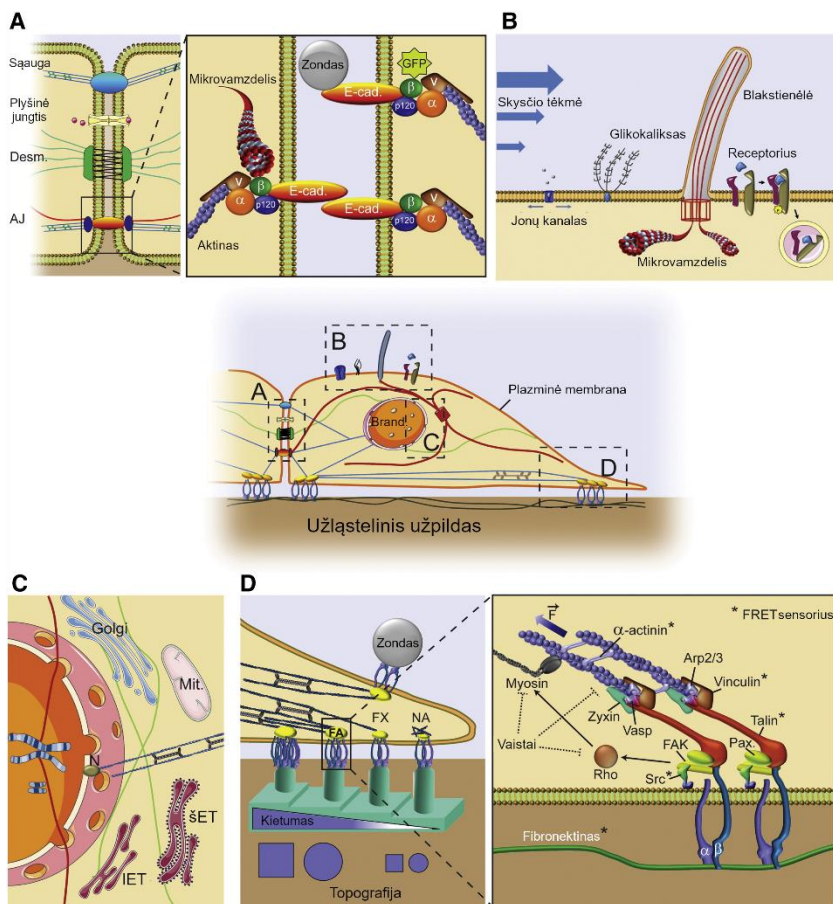
Audinio mechaninės savybės taip pat kinta ir įvairių vėžinių susirgimų metu [6,7]. Vėžiui vystantis jo užląstelinis užpildas vis tankėja, nekontroliuojamai besidalinančios ląstelės dar labiau padidina šių audinių kietumą [8,9]. Ši savybė yra pritaikoma net vėžinių susirgimų diagnostikai – palpacijos metodu atliekama standesnių audinio sričių paieška. Vėžinio audinio mechaninės savybės yra svarbios tiek paties vėžinio susirgimo

vystymuisi, tiek ir jo atsparumo priešvėžiniams vaistams susidarymui [10–12].

Dėl šių priežasčių yra labai svarbu suprasti, kaip ląstelės jaučia ir atsako į mechaninės aplinkos pokyčius. Šios žinios pasitarnaus ne tik audinių inžinerijos ar ląstelių terapijos srityse, bet ir vėžio gydyme. Baltymai dalyvaujantys mechanojutime gali tapti naujais terapiniais taikiniais, taip pat didesnis dėmesys bus skiriamas ir karkasų mechaninėms savybėms, kurios leistų dar tiksliau kontroliuoti ląstelių infiltracijos, proliferacijos ir diferenciacijos procesus.

1.1.1. Mechanojutimas ir signalo perdavimas

Mechanobiologija tiria ląstelių mechanojutimus t.y. kaip jos ląsteliniame lygmenyje jaučia, perduoda, supranta ir atsako į mechanines jėgas. Visi gyvi organizmai evoliucijos eigoje įgijo molekulinės struktūros leidžiančias jausti ir reaguoti į mechanines jėgas (1.2 pav.).



1.2 pav. Mechaninio signalo perdavimas ląstelėje. Centre – ląstelių sąveikos su aplinka suvestinė. **A** – tarpląstelių sąveikų būdai, **B** – membraniniai mechanojutimo komponentai, **C** – branduolio ir citoskeleto sąveika, **D** – mechaninio signalo perdavimas per fokalias adhezijas (FA). Parengta pagal [3].

Ląstelės organizme veikia įvairių tipų jėgos: tempimo, gniuždymo, šlyties, hidrostatinio slėgio, standumo, elastingumo ir viskoelastingumo jėgos. Jas jaučia ir į jas atsako skirtingi ląstelių komponentai (1 lentelė) [13–22].

1 lentelė. Ląstelės veikiančios jėgos ir baltymai, dalyvaujantys jų jutime.

Jėga	Baltymai
Tempimo (angl. traction)	Miozinas II, integrinai, FAK, F-aktinas, Ifs, ZO-1, E-kadherinas, Lmn A/C, Arp2/3, vinkulinas, kolafenai, elastinai, fibrilinas, mikrovamzdeliai

Gniuždymo (angl. <i>compression</i>)	Kolagenai, vimentinas, F-aktinas, ROCK, lengvoji miozino grandinė, Wnt/ β -kateninas
Šlities (angl. <i>shear</i>)	PECAM1, VEGFR, ERK1/2, PGTS2, IER3, EGR1, IGF1, IGFBP1, integrinai, TGF- β , β -kateninas, MAPK, lamininas 5, F-aktinas, PI3K
Hidrostatinio slėgio (angl. <i>hydrostatic pressure</i>)	Shc1, integrinai, kolagenai, TGF- β , F-aktinas
Standumo (angl. <i>stiffness</i>)	α 2 integrinas, fibronektinas, kolagenai, α -aktinas, Rho signalinė kaskada, talinas, vinkulinas, FAK, BMPR, F-aktinas, Iks vimentinas, mikrovamzdeliai, filaminas, lamininas A/C, emerinas, YAP
Elastiškumo (angl. <i>elastic</i>)	Kolagenas IV, tenascinai, titinas, elastinas, fibriliniai, integrinai, F-aktinas, mikrovamzdeliai, miozinas II
Viskoelastiškumo (angl. <i>viscoelastic</i>)	Kolagenai, elastinai, ICAM-1, F- aktinas.

1.1.1.1. Užląstelinis užpildas

Užląstelinio užpildo poveikis ląstelių funkcijoms yra intensyviai tiriamas. Cheminės, mechaninės ir topologinės užląstelinio užpildo savybės daro įtaką ląstelių adhezijai, morfologijai, migracijai, taip pat signalinių kelių, kurie reguliuoja ląstelių proliferaciją ir likimą, aktyvavimui [23,24]. Užląstelinį užpildą sudaro struktūrinių makromolekulių tinklas, kuris sukuria karkasą, leidžiantį ląstelėms sąveikauti jo viduje [23–25]. Jis yra sudarytas iš kietos fazės (fibrilinių baltymų (kolagenų, elastino, laminino, fibrinektino ir kt.), glikozaminoglikanų (hialurono rūgšties), proteoglikanų (chondroino sulfato, heparano sulfato, keratino sulfato) ir sindekano) bei tirpių komponentų (citokinų, augimo veiksnių, proteazių), kurie veikia kaip mediatoriai tarp ląstelių ir užląstelinės aplinkos (2 lentelė) [23–28]. Pagal užląstelinio užpildo struktūrą ir sudėtį jis gali būti skirstomas į dvi grupes: į pamatinę membraną ir jungiamojo audinio karkasą. Pamatinė membrana sukuria 2D pamatą ląstelėms. Ji daugiausia yra sudaryta iš laminino, IV tipo kolageno, nidogeno ir heparano sulfato. Jungiamojo audinio užląstelinis

užpildas suformuoja 3D tinklą, leidžiantį ląstelėms formuoti audinio struktūrą. Jis dažniausiai susideda iš fibrilinių kolagenų, proteoglikanų ir gliukozaminoglikanų [26,27,29,30].

2 lentelė. Užląstelinio užpildo komponentai.

Komponentas	Aprašymas
Kolagenai	Pagrindiniai užląstelinio užpildo komponentai. Jie sąveikauja su kitais užląstelinio užpildo komponentais bei ląstelių integriniais. Kolagenai suformuoja 10-300 nm diametro fibriles (I, II ir III tipo kolagenai) arba tinklines struktūras (IV tipo kolagenas). Fibriliniai kolagenai atsakingi už mechanines užląstelinio užpildo savybes, o IV tipo kolagenas, kartu su kitais užląstelinio užpildo komponentais suformuoja pamatinę laminą.
Fibronektinas	Vienas pagrindinių dimerinių fibrilinių užląstelinio užpildo glikoproteinų. Jis sąveikauja su kitais užląstelinio užpildo komponentais, ląstelių integriniais, glikozaminoglikanais ir su kitomis fibronektino molekulėmis.
Elastinas (Tropelastinas)	Hidrofobinis, daug glicino ir prolino turintis baltymas. Į užląstelinį užpildą ląstelių sekretuojamas tirpioje formoje kur polimerizuojamas į netirpius elastines fibriles ar klostes. Šios struktūros yra atsakingos už užląstelinio užpildo formos atsistatymą po deformacijos.
Lamininai	Didelės molekulinės masės heterotrimerai sudaryti iš α , β , γ subvienetų kurių deriniai sudaro 15 skirtingų tipų detetrimerus. Jie yra pagrindiniai nekolageniniai pamatinės laminos komponentai.
Hialurono rūgštis	Polisacharidas sudarytas iš D-gliukurininės rūgšties ir N-acetilgliukozamino pasikartojimų. Tai vienas pagrindinių užląstelinio užpildo komponentų, atsakingų už pasipriešinimą spaudimo deformacijai. Šis polisacharidas suriša daug vandens molekulių ir tai padeda amortizuoti įvairias deformacijas. Hialurono rūgštis vaidina labai svarbų vaidmenį embriogenezeje, žaizdų gyjime, uždegimo ir vėžio metastazavimo procesuose.
Chondroino sulfatas	Proteoglikanas atsakingas už užląstelinio užpildo kompresines savybes. Jis lemia kremzlių, raiščių, sausgyslių tamprumą, dalyvauja neuroplastiškumo procesuose

Heparinas/Heparino sulfatas	Proteoglikanas dalyvaujantis ląstelių adhezijos, migracijos, proliferacijos, angiogenezės, kraujotakos krešėjimo, vėžio metastazavimo ir vystymosi procesuose. Yra dažnas virusų receptoriaus.
Keratano sulfatas	Reguliuoja užląstelinio užpildo fibrilių diametrą ir jų išsidėstymą.
Sindekanai	Keturis narius turinti baltymų šeima, kuriai būdingas vienas transmembrinis domenas. Šie baltymai turi nuo trijų iki penkių heparano ir chondroitino sulfatų grandinių, kurių pagalba sąveikauja su augimo veiksniais: fibronektinu ir antitrombinu 1.

Elastiniai pluoštai, fibriliniai kolagenai, gliukozaminoglikanai ir proteoglikanai nulemia užląstelinio užpildo mechanines savybes, tuo tarpu elastiniai baltymai (elastinas, kolagenas) suteikia užląsteliniam užpildui elastingumą [23,24]. Dėl to keičiantis sudėčiai, užląstelinis užpildas gali būti tiek labai minkštas ir elastingas, tiek labai kietas ir netamprus. Užląstelinio užpildo sudėtis bei architektūra yra unikali kiekvienam audiniui ir kontroliuoja ląstelių specifinę diferenciaciją [3,23–31].

Užląstelinis užpildas priklauso nuo savo sudėties įgauna savitą geometrinę konformaciją, kuri veikia kaip topografinis ir mechaninis kamieninių ląstelių dirgiklis, galintis daryti įtaką ląstelių fenotipui [23,24,30]. Visgi, užląstelinis užpildas nėra statinė struktūra. Su juo sąveikaudamos ląstelės, keičia tiek užląstelinio užpildo sudėtį, tiek ir jo mechanines savybes bei architektūrą. Tai ląstelės atlieka dėka jų sintetinamų naujų užpildo struktūrinių komponentų, metalo proteazių bei keisdamos tempimo jėgą (sąveikos jėgą) [32]. Todėl sudėties ir reguliacinių molekulių pokyčiai tiesiogiai veikia užląstelinio užpildo biochemines ir fizikines savybes. O nuokrypiai nuo normos, savo ruožtu, paveikia ląstelių funkcijas bei inicijuoja procesus, kurių metu dar labiau keičiamos užląstelinio užpildo savybės, o tai skatina tolimesnius ląstelių funkcijų pokyčius, kurie galiausiai sukelia organų funkcijų sutrikimus. Šie procesai labai gerai ištirtini vėžinių susirgimų ir audinių fibrozės atvejais, kai užląstelinio užpildo pokyčiai yra kritiniai ligų progresavimui [31,33,34].

1.1.1.2. Integrinai

Integrinai yra pagrindinė transmembrinių baltymų klasė, atsakinga už mechaninių signalų priėmimą ir perdavimą į branduolį [35,36]. Jie yra lokalizuoti ląstelių membranos ir užląstelinio užpildo sandūroje (1.2 pav. D) [27]. Integrinui prisijungus prie užląstelinio užpildo komponentų (kolagenų,

fibronektino, elastino, lamininų) pasikeičia jų viduląstelinės baltymo dalies konformacija, pradeda formuotis fokalinės adhezijos kompleksas [36,37].

1.1.1.3. Fokalinės adhezijos

Fokalinės adhezijos kompleksai yra sudaryti iš daugiau nei 700 skirtingų baltymų, jų sudėtis kinta priklausomai nuo įvairių veiksnių (1.2 pav. D). Šių kompleksų baltymams yra būdingi kalpoino, plekstrino, src 2 ir 3 homologijos, FERM ir LIM domenai, kuriais šie baltymai sąveikauja tiek su ląstelių citoskeleto aktinu, tiek su integrinų citozoliniu domenu [38–40]. Fokalinės adhezijos veikia kaip tiltas, jungiantis užląstelinį užpildą su ląstelių citoskeletu [41,42].

Vinkulinas, paksilinas, talinas ir fokalinės adhezijos kinazė (FAK) yra pagrindiniai fokalinų adhezijų komponentai. Fokalinės adhezijos susirinkimas priklauso nuo jėgų perduodamų per užląstelinio užpildo–integrino jungtis [37]. Pavyzdžiui, ląstelių sąveikos su kietu paviršiumi metu generuojamos įtempimo jėgos inicijuoja vinkulino sąveiką su talinu [27,35,42–45]. Taip pat, talinas 1 savo ROD domenu inicijuoja bei stabilizuoja ląstelės ir užląstelinio užpildo adhezijos procesą, o esant išorinių jėgų poveikiui sustiprina integrino–citoskeleto sąveiką [41,46,47]. Taip pat yra manoma, kad nuo jėgos tipo ir jos stiprumo priklauso kokie baltymai sudarys fokalinės adhezijos kompleksą [48]. Taigi, jei suprasime kaip mechaninės jėgos daro įtaką fokalinų adhezijos kompleksų sudėčiai, galėsime išsiaiškinti kaip mechaniniai signalai yra perduodami ir kokią įtaką jie turi ląstelės funkcijoms [48].

1.1.1.4. Adhezinės jungtys

Mechaninės jėgos per audinį keliauja ir dalyvaujant ląstelė–ląstelė sąveikos kompleksams (1.2 pav. A). Šios adhezinės jungtys yra atsakingos už audinių persitvarkymo, morfogenetinio vystymosi, žaizdų gijimo koordinaciją ir audinio elongacijos procesus [49,50]. Pagrindiniai šių adhezijų kompleksų baltymai yra kadherinai. I tipo kadherinai viduląstelinis ląstelė–ląstelė adhezijos domenais sujungia su aktino filamentais. Šios tipo kadherinai yra sintetinami visose organizmo ląstelėse ir jiems yra priskiriami E-kadherinai, P-kadherinai (epitelinų ląstelių), VE-kadherinai (endotelinių ląstelių), N-kadherinai (kitose nei epitelinėse ląstelėse) [50]. Šie baltymai vienas nuo kito skiriasi kintančia užląstelinio domeno seka. Konservatyvūs kadherino pasikartojimai turi kalcį surišančią seką, kuri kontroliuoja ląstelė–ląstelė jungties susidarymą ir suirimą. Dažniausiai E-kadherinai jungiasi su kitos ląstelės E-kadherinais, N-kadherinai – su kitos ląstelės N-kadherinais [49,51,52]. Be kadherinų, į ląstelė–ląstelė adhezijos kompleksų sudėtį įeina

bei dalyvauja mechaninių signalų perdavime kateninai, nektinai ir kiti baltymai [50,53,54].

1.1.1.5. Citoskeletas

Iš ląstelės išorės atėjęs mechaninis signalas toliau perduodamas per ląstelės citoskeletą [55–57]. Reguluojant citoskeleto įtempį, jėgos toliau perduodamos kitiems ląstelės komponentams. Ši dinaminė struktūra, sudaryta iš F-aktino mikrofilamentų (G-aktino polimeras), mikrovamzdelių ($\alpha\beta$ -tubulinų dimerų polimeras), tarpinių filamentų bei juos rišančių baltymų, sukuria tridimensinę aplinką, kuri ne tik palaiko ląstelės formą, bet ir reguliuoja viduląstelinį transportą [56]. Citoskeleto mechaninės savybės tiesiogiai priklauso nuo jo dinamiškumo, geometrijos ir poliariškumo. F-aktinas formuoja lanksčią struktūrą, kuri priešinasi viduląsteliniam stresui; esant tempimui, jis yra aktyvuojamas ir padidina viduląstelinį citoskeleto įtempį bei suteikia ląstelėms standumo [56,58]. Mikrovamzdeliai yra standūs ir, apskritai, labai jautrūs išilginiams, sukamiesiems tempimams [56]. Kai mikrovamzdeliai yra tempiami, padidėja jų susisukimas, o tai turi įtakos viduląsteliniam transporto greičiui [55]. Dar viena grupė svarbių citoskeleto komponentų yra tarpiniai filamentai. Tai labai lankstūs ir lengvai deformuojami elementai [57].

Citoskeleto įtempis yra kontroliuojams dalyvaujant aktomiozino filamentų tinklui. F-aktinas ir neraumeninis miozinas-II sąveikos metu sukuria tempimo jėgas [58,59]. Jie sudaro 10–30 nm streso pluoštus, prie kurių jungiasi ir kiti baltymai (A-aktininas, fascinas, filaminas, spektrinas, distrofinas, Arp2/3, profilinas, ADF/kofilinas, fimbrinas, profilinas, vilinas, forminų šeimos nariai ir tropomiozinai) [58,59]. Šie streso pluoštai yra tiesiogiai susieti su užląstelinio užpildu per fokalinės adhezijos kompleksą arba netiesiogiai per kitus su užląstelinio užpildu sąveikaujančius baltymus, pavyzdžiui, CD44 [58,59]. Citoskeleto įtempis ir mechaninės jėgos branduoliui perduodamos per aktomiozino skaidulas. Ši sąveika yra kontroliuojama fosforilinant miozino lengvąją grandinę [59,60].

1.1.1.6. Branduolys

Mechaninės jėgos, ląstelę pasiekusios arba per užląstelinį užpildą ir fokalinės adhezijas, arba per ląstelė-ląstelė jungtis, keliauja ląstelės citoskeletu ir galų gale pasiekia branduolį (1.2 pav. C). Ląstelės citoplazmoje yra mechaniniams signalams jautrūs baltymai. Veikiami išorinių ar vidinių jėgų, jie keičia savo konformaciją ir sekos, nukreipiančios juos į branduolį, pradedamos eksponuoti baltymo išorėje. Tai galiausiai lemia šių baltymų pernešimą į branduolį. Branduolyje jie arba sąveikauja su transkripcijos

veiksniais, arba patys tiesiogiai reguliuoja genų raišką [61–64]. Vieni iš jų – YAP ir TAZ baltymai, priklausantys Hippo signaliniam keliui. Ląstelėse jie veikia kaip reostatai, kuo kietesnėje aplinkoje auginamos ląstelės, tuo didesnė dalis YAP/TAZ būna ląstelės branduolyje [65,66]. Kanoninė šių baltymų funkcija yra valdyti kamieninių ląstelių regeneracines ir atsinaujinimo funkcijas. Be to, jie dalyvauja ir įvairių ligų vystymesi, pavyzdžiui, arteriosklerozės, fibrozės, plaučių hipertenzijos, uždegimo, raumenų distrofijos ir įvairių vėžinių susirgimų [67]. Kiti transkripcijos veiksniai, pavyzdžiui, NKX-2.5, priešingai, yra aktyvuojami reaguojant į mažą citoskeleto įtempimą ir, patekę į branduolį, jie slopina genų raišką atsakingą už standžios ląstelės būsenos palaikymą [62].

Mechaniniai signalai iš ląstelės citoskeleto į branduolį gali būti perduodami ir tiesiogiai [64,68,69]. Ląstelių branduolys yra susijungęs su citoskeletu per LINC kompleksus [68,70]. Branduolys taip pat turi branduolinį skeletą, susiformavusį ties vidine branduolio membrana. Į jo sudėtį įeina tarpiniai filamentai lamininai A, B ir C, kurie dar ir tiesiogiai jungiasi su DNR bei telkia ją ties vidine branduolio membrana [71,72]. LINC kompleksas, kuris jungia ląstelės citoskeletą su branduolio lamininiais, sudarytas iš baltymų, turinčių SUN ir KASH domenų [73,74]. Mechaninių signalų perdavimo metu šie baltymai patiria konformacinius pokyčius, kurie lemia tiesioginius chromatinio išsidėstymo pokyčius branduolyje bei genų ekspresijos pokyčius [68,70].

1.2. Audinių inžinerija ir ląstelių terapija

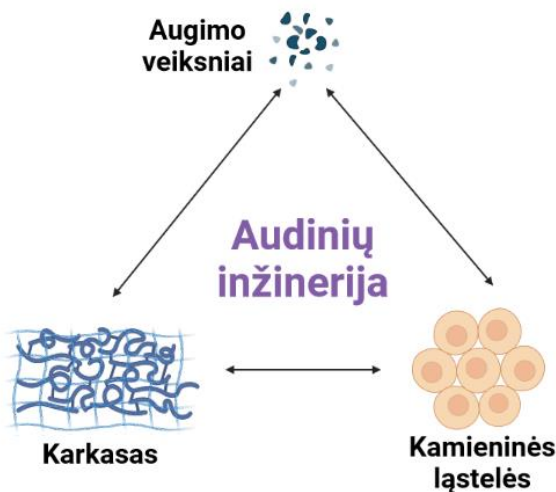
Audinių inžinerija ir ląstelių terapija ilgą laiką buvo tik fantastinių filmų ir romanų objektai. Tačiau situacija iš esmės pasikeitė XX a. pabaigoje, suintensyvėjus kamieninių ląstelių tyrimams. Pastaruoju metu rinkoje atsiranda vis daugiau naujų šiomis technologijomis pagrįstų produktų. Visgi, kol kas medicinoje yra pritaikomi tik palyginti nesudėtingi produktai, pavyzdžiui, pasitelkiant audinių inžinerijos principus sukurti odos ir uretros lopai ar kamieninės ląstelės hematologinių susirgimų, autoimuninių ligų gydymui. Tačiau dažniausiai mūsų audiniai yra sudaryti iš keliolikos skirtingų ląstelių tipų, kuriems unikalių funkcijų atlikimui reikia specifinės aplinkos. Be to, audiniai turi turėti išvystytą kraujagyslių tinklą, o tai kol kas yra vienas iš pagrindinių iššūkių audinių inžinerijoje, stabdančių tolimesnį šių technologijų taikymą. Taip pat, didžioji dalis ląstelių po gražinimo į organizmą žūva dėl deguonies trūkumo, uždegimo ir kitų, neigiamai ląstelių gyvybingumą veikiančių procesų. Tačiau, ši tyrimų sritis yra kaip niekad populiari ir,

tikėtina, šie sunkumai ateityje bus išspręsti. Kai kurias iš šių problemų gali padėti išspręsti mechanobiologija.

1.2.1. Audinių inžinerija

Audinių inžinerijos terminas pirmą kartą paminėtas beveik prieš 30 m. - 1993 m. Šios mokslo srities tikslas – funkcionalių dirbtinių audinių ar organų sukūrimas [75]. Šiuo metu organų transplantacijos dažnu atveju yra vienintelis gydymo būdas, galintis pacientui išgelbėti gyvybę, suteikti galimybę jam grįžti į normalų gyvenimą. Tačiau dėl organų trūkumo visame pasaulyje yra nusidriekusi milžiniškos eilės jų laukiančių žmonių. 2017 m. duomenimis, vien JAV sąrašuose laukė virš 120 000 žmonių, kai tuo tarpu tik 5200 sulaukė savo donoro [76]. Visgi, net gavus donorinį organą dar nereiškia, kad liga bus įveikta. Nors prieš transplantaciją atliekami plataus spektro audinių suderinamumo tyrimai, kartais donoro audiniai vis tiek būna atmetami, net ir naudojant imunosupresinius vaistus [77]. Dėl šių priežasčių audinių inžinerija susilaukia ypatingai daug mokslininkų dėmesio. Dirbtiniai audiniai išspėtų donorų trūkumo problemas, be to, jų gamybai panaudojus recipiento ląsteles būtų išvengta atmetimo reakcijos ir imunosupresinių vaistų naudojimo [78,79].

Audinių inžinerija yra pagrįsta svarbia triada, būtina funkcionalaus audinio sukūrimui (1.3 pav.).



Created in BioRender.com bio

1.3 pav. Audinių inžinerijos triada. Nupiešta Biorender.com puslapyje.

Ją sudaro (i) karkasas, suteikiantis audiniui formą ir ląstelėms atramą, (ii) ląstelės, užpildančios karkaso tūrį ir prisitaikančios atlikti audinio funkciją, bei (iii) biomolekulės, leidžiančios ląstelėms sąveikauti viena su kita bei su užląsteliniu užpildu [80].

1.2.1.1. Medžiagos naudojamos audinių inžinerijoje

Audinių inžinerijoje yra tiriami trijų tipų karkasai: nuląstelinti audiniai [81], nestruktūrizuoti ir struktūrizuoti karkasai [82]. Natūralūs nuląstelinti audinių karkasai turi daug privalomų lyginant su kitomis grupėmis, nes pasižymi fiziologinėmis užląstelinio užpildo savybėmis, juos naudojant buvo gauti įspūdingi rezultatai [78]. Naudojant pelių nuląstelintus širdies, plaučių ir inkstų audinius mokslininkams jau pavyko sukurti dalinai funkcionalius organus [83–85]. Šių karkasų privalumas – išlikęs dalinai nepakitęs užląstelinis užpildas, kuris savo sudėtimi ir topografija geba reguliuoti kryptingą recipiento ląstelių migraciją, proliferaciją ir diferenciaciją. Tačiau jų pagrindinis minusas – prieinamumas. Jie neišsprendžia donorų trūkumo problemos, tačiau, naudojant šią technologiją daugiau donorinių audinių būtų galima panaudoti kuriant audinius, nes donoro audinio ląstelių būklė, šiuo atveju, nėra tokia kritiškai svarbi. Be to, dėl natūralaus karkaso variabilumo labai sunku kontroliuoti naujų audinių gavimą [78].

Struktūrizuotiems ir nestruktūrizuotiems karkasams gaminti gali būti naudojamos tos pačios medžiagos, skiriasi tik gamybos technologija [82]. Šių karkasų gamybai naudojami tiek natūralūs, tiek sintetiniai polimerai [76,82,86]. Pirmuoju atveju dažniausia naudojami: kolagenas, želatina, alginatai, celiuliozė, chitinas, hialurono rūgštis, taip pat, galima naudoti ir specifinių nuląstelintų audinių užląstelinio užpildo komponentų mišinį [81,82]. Sintetinių polimerų įvairovė daug didesnė. Vieni populiariausių yra polilaktinės rūgšties polimeras (PLA), polikaprolaktonas (PCL), polilaktinės rūgšties ir polikaprolaktono kopolimeras (PLA/PCL), polietilenglikolis (PEG), polidimetilsiloksanas (PDMS) ir kt. [82,87]. Tiek natūralūs, tiek sintetiniai polimerai turi savo pliusų ir minusų. Natūralūs polimerai yra lengvai atpažįstami ląstelių membraninių baltymų, šių paviršių nereikia papildomai modifikuoti siekiant pagerinti ląstelių adhezijos savybes. Tačiau, kadangi tai yra natūralūs polimerai, jų savybės kinta priklausomai nuo partijos. Taip pat, šie polimerai turi gana greitą degradavimo laiką, kuris dažnu atveju yra per trumpas pilnai dirbtinio audinio integracijai ir naujo karkaso suformavimui [82,88]. Tuo tarpu, sintetiniai polimerai gali turėti platų spektrą lengvai kontroliuojamų fizikinių ir cheminių savybių. Galima kontroliuoti tiek jų degradacijos laiką, tiek karkaso hidrofiliškumą bei mechanines savybes [82,89]. Tačiau dažnu atveju, pats polimero paviršius yra netinkamas

ląstelėms prisitvirtinti. Dėl to, tokių polimerų karkasai turi būti papildomai modifikuojami, pavyzdžiui, prie paviršiaus prijungiant kolagenus ar RGD sekas [29,90,91]. Kitas sintetinių polimerų trūkumas – per lėtas jų irimas. Pavyzdžiui, PLA polimerui suirti *in vivo* reikia daugiau nei dviejų metų, PCL – net keturių [92–96]. Taip pat, šie polimerai neturi savyje cheminių signalų, kurių pagalba būtų galima kryptingai valdyti ląstelių integraciją. Dėl to, nestruktūrizuoti karkasai, kurių vidinės organizacijos ir komponentų išsidėstymo kontroliuoti negalima, turi daug trūkumų [97]. Siekiant juos pašalinti, yra sukurta daug metodų tokių karkasų gamybai, jų tarpe – druskų išplovimo ar putojimo metodai, liofilizacija. Tačiau tokiu būdu gauti karkasai neturi jokios kryptingos organizacijos [98–101]. Todėl didžiausias dėmesys yra skiriamas struktūrizuotiems karkasams [79,97].

1.2.1.2. 3D spausdinimo technologijos

Audinių inžinerijoje gaminant struktūrizuotus karkasus yra naudojamos įvairios 3D spausdinimo technologijos pagrįstos įvairiomis technikomis: lydyto nusėdimo modeliavimo (angl. *Fused Deposition Modeling* (FDM)), lydalo išstūmimo (angl. *Melted Extrusion*), išstūmimo (*Extrusion*), *InkJet*, stereolitografijos (SLA), miltelinio spausdinimo (angl. *Powder Bed Fusion*), elektroraišymo/elektropynimo [76,102,103]. Šių metodų pagalba galima spausdinti termopolimerus, hidrogelius, keramikas, pavienes ląsteles, metalus [76]. Taip pat, rinkoje jau yra ne vienas spausdintuvas, jungiantis daugiau nei vieną spausdinimo technologiją. Tokie spausdintuvai yra labai galingi įrankiai, nes kombinuojant visiškai skirtingas medžiagas, kurių neįmanoma kartu struktūrizuoti viena technika, gali būti sukuriami karkasai, turintys unikalias tiek mechaniniu, tiek biologiniu atžvilgiu savybes [86,97]. Pavyzdžiui, kuriant dirbtinio kaulo karkasą yra naudojamas termopolimeras PLA, kuris yra praturtintas hidroksiapatitu. Toks karkasas išryškina kiekvieno komponento geriausias savybes – užtikrina PLA mechanines savybes, hidroksiapatito osteoindukcinį potencialą, taip pat neutralizuoja PLA degradacijos metu susidariusius rūgštinius monomerus, mažina uždegimą. Trapios keramikos nedalyvauja struktūros palaikyme, bet užtikrina osteogenezę [104].

1.2.1.3. Kamieninės ląstelės, naudojamos audinių inžinerijoje

Didžiąją dalį audinio tūrio sudaro ląstelės ir jų skaičius audinyje yra milžiniškas. Pavyzdžiui, 1 g kepenų audinio yra apie 100 mln. ląstelių [105]. Dėl to norint regeneruoti pažeistus audinius reikalingas labai didelis ląstelių skaičius. Audinių inžinerijoje yra naudojami keturi pagrindiniai ląstelių šaltiniai: embrioninės ląstelės, vaisiaus ląstelės, suaugusio organizmo

kamieninės ląstelės ir indukuotos pliuripotentinės kamieninės ląstelės gautos iš diferencijavusių somatinių ląstelių (3 lentelė) [106].

3 lentelė. Kamieninių ląstelių tipai naudojami audinių inžinerijoje.
 Parengta pagal [107].

Kamieninės ląstelės	Šaltinis	Diferenciacijos potencialas
Embrioninės	Morula	Totipotentinės
	Blastocista	Pliuripotentinės
Vaisiaus	Vaisiaus	Multipotentinės, pliuripotentinės
	Placenta	Multipotentinės, pliuripotentinės
	Amniotinis skystis	Multipotentinės, pliuripotentinės
	Wharton želė	Multipotentinės, pliuripotentinės
	Virkštelės kraujas	Multipotentinės
	Mezenchiminės kamieninės ląstelės iš įvairių audinių (kaulų čiulpai, riebalinis audinys, dantenos, dantų pulpa, antkaulis, raumenys)	Multipotentinės, pliuripotentinės
Suaugusio organizmo	Hematopoetinės	Oligopotentinės
	Krūties audinio kamieninės ląstelės	Bipotentinės
	Kraujagyslių endotelinės	Multipotentinės
	Žarnyno epitelinės	Oligopotentinės
Indukuotos	Įvairių audinių somatinės diferencijuotos ląstelės (odos fibroblastai, keratinocitai, šlapimtakio epitelinių ląstelių, periferinio kraujo ląstelių)	Pliuripotentinės

Viena iš pagrindinių savybių, skiriančių kamienines ląsteles nuo kitų ląstelių – gebėjimas diferencijuotis. Pagal gebėjimą diferencijuotis, kamieninės ląstelės skirstomos į penkias grupes: totipotentes, pliuripotentines, multipotentines, oligopotentes ir unipotentines [106].

Totipotentinės arba **visagalės** ląstelės – tai mažiausiai diferencijavusios ląstelės. Šiai grupei priklauso apvaisintas oocitas bei ląstelės

susidariusios po pirmų dviejų jo dalijimųsi. Totipotentinės ląstelės gali diferencijuotis į visas organizmo ląsteles ir į užembrioninį audinį – placenta [108].

Pliuripotentinės arba **daugiagalės** ląstelės gali diferencijuotis į visų tipų audinių ir organų ląsteles, kurios išsivysto iš trijų gemalinių lapelių – ektodermos, endodermos ir mezodermos. Pliuripotentinėms ląstelėms, priklauso embrioninės kamieninės ląstelės bei genetiškai perprogramuotos somatinės ląstelės – indukuotos pliuripotentinės/daugiagalės ląstelės [109,110].

Multipotentinės ląstelės yra aptinkamos beveik visuose audiniuose. Šios ląstelės gali diferencijuoti į tų audinių ląsteles, kurios susidaro iš to paties gemalinio lapelio. Joms priklauso mezenchiminės kamieninės (MKL) ląstelės, išskiriamos iš įvairių audinių, pavyzdžiui, kaulų čiulpų, riebalinio audinio, kaulų, kraujo. MKL gali diferencijuotis į įvairius audinius, susidarančius iš mezodermos gemalinio lapelio: riebalinį sluoksnį, kaulinį, kremzlinį, raumeninį ir kt. audinius [111].

Oligopotentinės ląstelės. Dalinantis oligopotentinėms ląstelėms susidaro naujos oligopotentinės kamieninės ląstelės bei kelių linijų specifinės audinių ląstelės. Puikus šios grupės pavyzdys – hematopoetinės kamieninės ląstelės. Jos gali diferencijuotis į mieloidines arba limfoidines ląsteles [106,112].

Unipotentinės ląstelės yra save atnaujinančios ląstelės. Joms dalinantis susidaro nauja unipotentinė kamieninė ląstelė bei tam tikro audinio diferencijuota ląstelė. Pavyzdžiui, dalijantis žarnyno epitelinei kamieninei ląstelei susidaro nauja epitelinė kamieninė ląstelė bei diferencijavusi žarnyno epitelinė ląstelė [106,113].

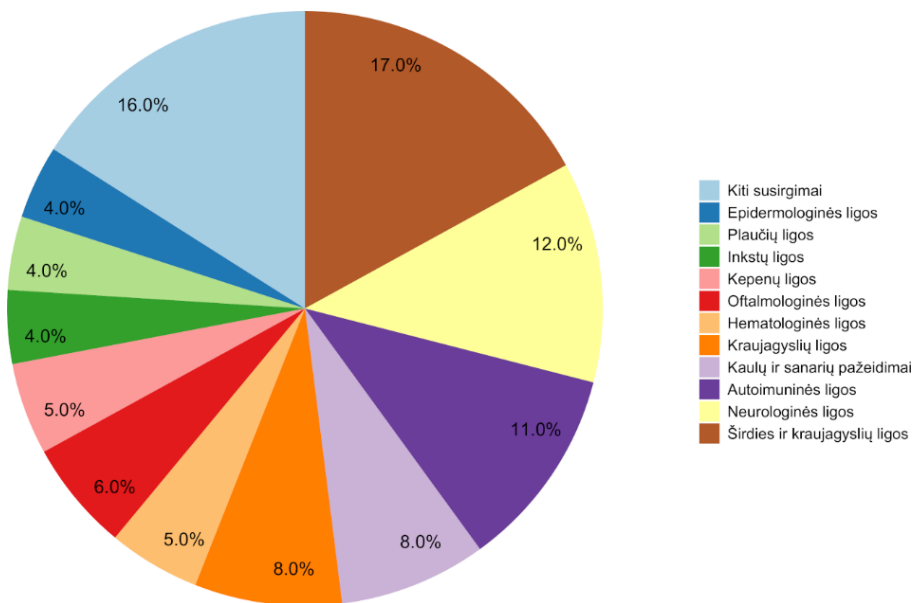
Daugiausiai dėmesio dėl prieinamumo ir etinių aspektų susilaukia indukuotos pliuripotentinės ir suaugusio organizmo kamieninės ląstelės. Iš jų dažniausiai yra tiriamos MKL ir endotelinės kamieninės ląstelės [114]. MKL yra randamos beveik visuose audiniuose ir pasižymi gana plačiu diferenciacijos potencialu, leidžiančiu vieno šaltinio MKL naudoti įvairių audinių regeneracijai [115]. Vienas iš pagrindinių platesnį audinių inžinerijos taikymą ribojančių veiksnių yra išvystyto kraujagyslių tinklo stoka. Dėl to, daug tyrimų atliekama ir su endotelinėmis kamieninėmis ląstelėmis [116,117].

1.2.2. Ląstelių terapija

Ląstelių terapija yra kita regeneracinės medicinos sritis, kurios kitaip nei audinių inžinerijos, tikslas nėra pakeisti pažeistą audinį ar organą, o

naudojant kamienines, pirmines ar genetiškai modifikuotas ląsteles, atstatyti prarastas ar išsiderinusias audinio funkcijas [118]. Kadangi gydymui naudojamos to paties paciento ląstelės, po tokios terapijos pacientui nereikia vartoti imunosupresuojančių vaistų, kaip kad audinių persodinimo atveju. Yra du pagrindiniai keliai, kaip ląstelių terapijos metodais gydomi pažeisti audiniai ar atstatomos jų funkcijos: (i) į pažeistą vietą perkeliama kamieninė ląstelė, kurios tiesiogiai dalyvauja audinio atstatyme, proliferuodamos ir diferencijuodamos į reikiamo tipo ląsteles, arba (ii) naudojami ląstelių išskiriami citokinai, augimo veiksniai ir kitos biomolekulės, kurių pagalba stimuliuojama audinio regeneracija, skatinant kamieninių ląstelių, esančių tame audinyje, migraciją, proliferaciją, diferenciaciją ir imunomoduliaciją [118,119].

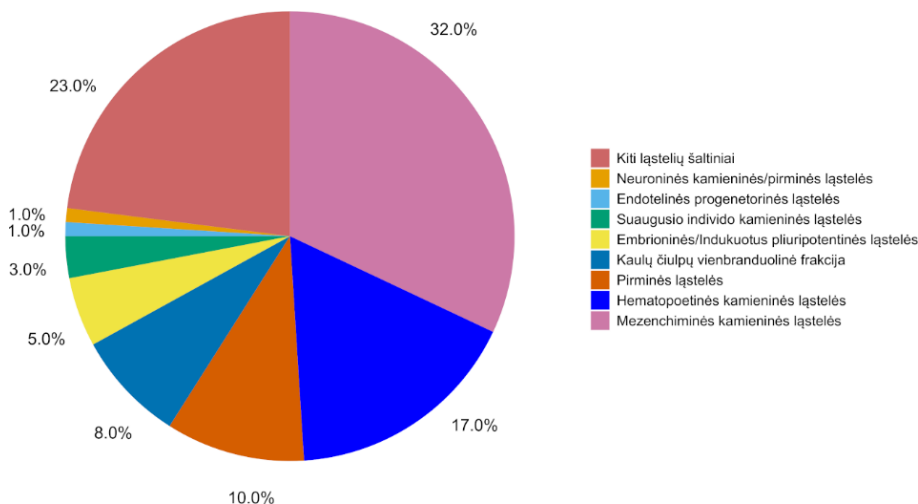
Šiuo metu vyksta nemažai ląstelių terapijos klinikinių tyrimų, kurių metu bandoma gydyti platų spektrą susirgimų: širdies ligas, kepenų cirozę, inkstų nepakankamumą, oftalmologines ligas, neurologinius susirgimus, autoimunines ligas bei kraujotakos susirgimus (1.4 pav.) [118,120–126]. Nors šios srities tyrimai yra daug žadantys, tačiau dar lieka daug neišspręstų problemų ir neatsakytų klausimų [115]. Viena pagrindinių problemų – tai ląstelių šaltinio pasirinkimas bei jų išskyrimo, padauginimo ir diferenciacijos standartizuoti protokolai [127]. Taip pat, vis dar neaišku, kaip tinkamai kontroliuoti organizmo imunologinį atsaką, užtikrinti ląstelių tikslingą migraciją, kontroliuojamą proliferaciją ir diferenciaciją bei ląstelių išgyvenamumą po transplantacijos [128]. Be to, svarbu užtikrinti, kad perkeltos ląstelės nesuvėžės ir nepaveiks gretimų audinių [115,118,127].



1.4 pav. Iki klinikiniai ir klinikiniai tyrimai vykdomi ląstelių terapijos srityje.
Parengta pagal [118].

1.2.2.1. Kamieninės ląstelės naudojamos ląstelių terapijoje

Ląstelių terapijos taikymuose naudojami įvairūs ląstelių šaltiniai (1.5 pav.) [118]. Dažniausiai naudojamos MKL, nes jos ne tik turi platų diferenciacijos potencialą, bet ir sekretuoja įvairius augimo veiksnius, citokinus, chemokinus, priešuždegiminius, angiogenezę skatinančius veiksnius [129]. Jos taip pat pasižymi imunomoduliacinėmis savybėmis. Gražintos į audinį, ląstelės aktyvuoja audinio kamienines ląsteles, kurios, savo ruožtu, prisideda prie audinio regeneracijos [130]. Šios ląstelės naudojamos tiek ikiklinikiniuose, tiek ir klinikiniuose tyrimuose, gydant širdies ir kraujagyslių ligas, galvos ir stuburo smegenų traumas, infarktą, diabetą, kaulų ir sąnarių pažeidimus, Krono ligą, audinių atmetimo reakciją ir kt. [131]. Nepaisant puikių rezultatų, kai kurie tyrimai, deja, dėl kol kas nežinomų priežasčių baigiasi neigiamais rezultatais [118].



1.5 pav. Ląstelių šaltiniai naudojami ląstelių terapijoje. Parengta pagal [118].

Taip pat labai daug dėmesio susilaukia pirminės ląstelės, pavyzdžiui, chondrocitai, miocitai ir keratinocitai [132–134]. Tyrimų, atliktų panaudojant šias ląsteles, rezultatai tikrai daug žadantys, tačiau dėl riboto proliferacijos potencialo, išskirtų ląstelių kokybės ir funkcionalumo, jų praktinis taikymas kelia daug sunkumų [118].

Pačios pirmosios atrastos kamieninės ląstelės buvo hematopoetinės. Šiuo metu tai vienintelės ląstelės, kurių naudojimas specifinių kraujo vėžio atvejų gydymui pripažintas visame pasaulyje [135]. Šias ląsteles perkėlus į organizmą, jos migruoja į kaulų čiulpus, kur proliferuodamos, jos atstato paciento hematopoetinę sistemą [136]. Taip pat, šios ląstelės gali būti naudojamos tam tikrų autoimuninių lygų gydymui bei kaip prevencinė priemonė po organų transplantacijos, mažinanti organų atmetimo riziką [135].

Iš kaulų čiulpų taip pat išskiriama vienbranduolinių ląstelių populiacija, naudojama eilėje klinikinių ir ikiklinikinių tyrimų gydant širdies ir kraujagyslių ligas, galūnių išemijas ir neurologines ligas [137]. Šią ląstelių populiaciją sudaro pirminės hematopoetinės ląstelės, limfinės sistemos ląstelės, monocitai ir makrofagai [138].

Dar viena iš kaulų čiulpų išskiriama kamieninių ląstelių populiacija, kuri sudaro tik apie 1 % visų periferinių vienbranduolinių ląstelių, yra endotelinės progenitorinės ląstelės [139,140]. Šioms ląstelėms būdingi tiek hematopotinių ląstelių žymenys (pavyzdžiui, CD34, CD133), tiek endotelinės ląstelių žymenys (pavyzdžiui, VEGFR2). Tačiau, iki šiol nebuvo identifikuotas nei vienas tik šioms ląstelėms būdingas paviršiaus žymuo [141]. Šios ląstelės daugiausiai naudojamos neovaskuliarizacijos proceso iniciacijai.

Neurologinėms ligoms gydyti dažniausiai naudojamos kamieninės ir pirminės neuronų ląstelės. Jos gali būti išskiriamos tiek iš vaisiaus, tiek iš suaugusio individo galvos ir stuburo smegenų. Jos geba diferencijuoti tiek į neuronines ląsteles, tiek ir į glijos ląsteles [118].

Pastaruoju metu daug dėmesio susilaukia pliuripotentinės ląstelės. Šiai grupei priklauso embrioninės, vaisiaus ir indukuotos somatinės ląstelės. Embrioninių kamieninių ląstelių panaudojimą apriboja daug veiksnių – neskaitant etinių, jų naudojimą ribojančių, sumetimų, problemų taip pat kyla ir su šių ląstelių saugojimu, kultivavimu, dėl to labiau linkstama į indukuotas pliuripotentines ląsteles [142]. Kaip galima suprasti iš pavadinimo, šios ląstelės gaunamos somatinėse ląstelėse indukavus kelių specifinių genų raišką, pavyzdžiui, Oct3/4, Sox2, c-Myc ir Klf4 [110]. Po indukcijos, šios ląstelės pasižymi pliuripotentinėms ląstelėms būdingu atsinaujinimo potencialu, taip pat jos gali diferencijuoti į bet kokias autologines audinio ląsteles. Jų platų panaudojimą audinių terapijoje stabdo nepakankamai įvertintas šių ląstelių genetinis stabilumas ir suvėžėjimo potencialas [110,142].

1.2.3. Audinių gijimas ir uždegimas

Dažnai audinių uždegimas yra siejamas su įvairiomis chroninėmis ir degeneracinėmis ligomis, tačiau jis taip pat padeda organizmui susitvarkyti su infekcijomis, pašalinti pažeistas ląsteles ir inicijuoti audinio regeneraciją. Šis procesas būdingas tiek žinduoliams, tiek evoliucijos atžvilgiu žemesniems organizmams – tai rodo uždegiminio proceso svarbą [143]. Žala organizmui kyla tada, kai šis procesas yra netinkamai valdomas. Jei uždegimas būna per silpnas, gali būti nepakankamas susidoroti su infekcijomis ir gali lemti audinio pažeidimus, o tuo tarpu per stiprus uždegimas lemia įvairių patologijų, tokių kaip vėžiniai susirgimai, audinių fibrozė, vystymąsi [144–146]. Abi šios patologijos yra netinkamo audinio gijimo rezultatas. Kontroliuojamas uždegimas yra pirmoji žaizdos gijimo stadija, kurios metu yra sukuriama barjeras, užtikrinantis netrukdomą audinio regeneraciją. Po to seka audinio formavimosi ir persitvarkymo žingsniai [147].

Esant vidiniams pažeidimams inicijuojamas taip vadinamas sterilus uždegimas. Jį sukelia į užląstelinę aplinką pakliuvę su pažeidimu asocijuoti molekuliniai žymenys (angl. *damage-associated molecular patterns* (DAMP)). Tai yra vidiniai ląstelių komponentai: nukleorūgštys, chromatino komponentai, ATP ir kiti nukleotidai, šlapimo rūgštis, citoskeleto fragmentai, karščio šoko baltymai, oksiduota mitochondrijų DNR ir kt. [148]. DAMP atpažįsta žymenis atpažįstantys receptoriai (angl. *patterns recognition receptors* (PRR)). PRR prisijungus ligandą, ląstelėse inicijuojami įvairūs su

uždegimu susiję signaliniai keliai, aktyvuojantys įvairius transkripcijos veiksnius, įskaitant NF- κ B, AP-1 ir STAT [149]. Taip pat į užląstelinę terpę pakliuvę DAMP paveikia ir ląstelių membranų pralaidumą kalio ir kalcio jonams. Tai sukelia mitochondrijų pažeidimus, dėl kurių mitochondrijų DNR ir mitochondrijose susidarę reaktyvios deguonies formos (angl. *Reactive Oxygen Species* (ROS)) patenka į citoplazmą [150]. Visa tai skatina inflamamosomos aktyvaciją ir prouždegiminių interliuaukinių IL-1 β ir IL-18 sekreciją. Aktyvuota inflamomsoma sukelia piroptozę (vienas iš ląstelių žūties mechanizmų), kurios metu į aplinką išskiriama dar daugiau ROS ir DAMP [148,149].

Tolimesnė žaizdos gijimo eiga kontroliuojama eilės kitų citokinių ir augimo veiksmų. IL-6 skatina ląstelių proliferaciją ir išgyvenimą [151]. Ši ir didžiąją dalį kitų citokinių atpažįsta heterotetrametriniai receptoriai, turintys gp130 signalo perdavimo subvienetą [152]. Kitas svarbus regeneracijai citokinas, priklausantis IL-10 šeimai – IL-22. Jį sekretuoja limfocitai (ypač T ląstelių pagalbininkų subpopuliacijos ląstelės Th17), limfoidinės ir tam tikros mieloidinės ląstelės, tačiau kitaip nei daugelio citokinių atveju, šie yra skirti ne imuninėms ląstelėms, o fibroblastams ir epitelinėms ląstelėms. IL-22 stimuliuoja minėtų ląstelių proliferaciją, slopina žūtį ir atitolina galutinę diferenciaciją [153]. Su ligandu susijungęs IL-22 receptorių inicijuoja JAK-STAT3 aktyvaciją, mitogenų aktyvuojamas baltymų kinazes (angl. *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK)) – aktyvuojančio baltymo-1 (angl. *Activating Protein - 1* (AP-1)) signalinius kelius [153].

1.2.3.1. Signaliniai keliai dalyvaujantys žaizdų gijime

MAPK-AP-1 - vienas pagrindinių signalinių kelių, jungiančių uždegiminius procesus su audinio regeneracija [154,155]. MAP kinazių šeimą sudaro trys pagrindinės kinazės: ERK (angl. *Extracellular signal-Regulated Kinase*), JNK (angl. *c-Jun N-terminal Kinase*) ir p38 [156]. Vienas iš pagrindinių šių kinazių taikinių yra AP-1 transkripcijos veiksnys, kuris gali būti sudarytas iš c-Jun homodimero arba c-Jun/c-Fos heterodimero [157]. Tačiau, šios kinazės reguliuoja ir kitų transkripcijos veiksmų aktyvumą. Pavyzdžiui, drozofilose, JNK ir p38 kinazės turi papildomų taikinių, tokių kaip Foxo, kurie kontroliuoja genų, susijusių su ląstelių atsparumu stresui ir antioksidantų sintezę, raišką [154]. Žinduoliuose c-Jun baltymas kontroliuoja kepenų regeneraciją, slopindamas p53 ir p38 kinazes [158] bei indukuodamas ciklino D1 ir JNK raišką [159]. Tačiau sudėtinga išskirti tik vieną MAP kinazių vaidmenį, nes jis priklauso ir nuo kitų signalinių kelių, inicijuojamų ląstelėse. Pavyzdžiui, JNK-AP-1 signalinis kelias gali inicijuoti hepatocitų žūtį, slopindamas NF- κ B proišgyvenamuosius signalinius kelius [160–162] ir,

priešingai, skatinti hepatocitų išgyvenamumą indukuodamas Nos-2 [163]. JNK- ir p38-AP-1 signaliniai keliai parenchiminėse kepenų ląstelėse inicijuoja TNF ir IL-6 sekreciją, o tai indukuoja kepenų regeneracijos procesus [164].

1.2.3.2. Oksidacinis stresas

Oksidacinį stresą ląstelėse ir audiniuose sukelia atsiradęs disbalansas tarp ROS ir antioksidantų [165]. Esant normalioms sąlygoms, ląstelės mitochondrijose metabolizmo metu susidaro nedideli kiekiai ROS, kuriuos neutralizuoja ląstelėse esantys antioksidantai [166]. Be to, ląstelės ROS naudoja kaip signalines molekules ar kaip tarpinius produktus ląstelių komponentų sintezei bei kaip ginklą prieš patogenus [167,168]. Tačiau dėl vidinių ar išorinių veiksnių, sutrikus ROS ir antioksidantų balansui, pasireiškia neigiamas ROS poveikis. ROS gali reaguoti su įvairiais ląstelių komponentais: plazmine membrana, lipidais, baltymais, nukleorūgštimis. Tai sukelia įvairius šalutinius poveikius – ląstelių senėjimą, žūtį, o susikaupusios DNR mutacijos gali lemti vėžio atsiradimą ir vystymąsi [165,169].

Dideli kiekiai ROS susidaro ir uždegimo metu [170]. Todėl tiek ląstelių terapijos, tiek audinių inžinerijos taikymuose, ląstelės grąžinamos į labai nedraugišką aplinką. Tai lemia, kad didžioji dalis ląstelių žūva netrukus po transplantacijos [171,172]. Dėl to, didelis dėmesys yra skiriamas ląstelių atsparumo oksidaciniam stresui padidinimui [173–177]. Ląstelės su padidėjusiu ROS kiekiu gali kovoti dviem būdais: dalyvaujant antioksidantiniams fermentams (katalazei, glutationo peroksidazei, superoksido dismutazei) ir antioksidantams [165]. Tai reiškia, kad ląstelės gali padidinti genų, atsakingų už antioksidantinį veikimą, raišką arba su mitybine terpe papildomai gauti antioksidantinį poveikį turinčių molekulių, pavyzdžiui, vitamino C, omega riebalų rūgščių. Šie procesai padeda ląstelėms išgyventi nepalankioje aplinkoje, tačiau antioksidantų poveikis jų neapsaugo nuo senėjimo [178]. Dėl šios priežasties labai svarbu išsiaiškinti, kaip oksidacinis stresas veikia kamienines ląsteles ir kaip galima padidinti ląstelių atsparumą jo žalingam poveikiui. Tai leistų pagerinti ląstelių terapijos ir audinių inžinerijos efektyvumą [170].

1.3. Vėžiniai susirgimai

Prieš 100 m. ir seniau, vėžiniai susirgimai nebuvo tokie dažni, tačiau pastaruoju metu, ypač rimta problema jie tapo XX a. pabaigoje–XXI a. Paskaičiuota, kad net 1 iš 4 žmonių per savo gyvenimą susidurs bent su vienu vėžiniu susirgimu. Toks smarkus vėžinių susirgimų padažnėjimas gali būti

siejamas su keliais aspektais. Visų pirma, pastaraisiais dešimtmečiais smarkiai patobulėjo diagnostiniai metodai, leidžiantys aptikti vėžinius susirgimus net ankstyvose stadijoje [179]. Antra, per pastarąjį šimtmetį vyrų ir moterų gyvenimo trukmė smarkiai pailgėjo, nuo atitinkamai 48 ir 51 metų iki 72 ir 79 metų, o vėžiniais susirgimai dažniau pasireiškia vyresnio amžiaus žmonėms [179,180]. Trečia, smarkiai pasikeitė mūsų gyvenimo sąlygos, vis daugiau žmonių kasdien susiduria su įvairias junginiais – kancerogenais, kurie siejami su vėžinių susirgimų inicijavimu. Jie buvo sutinkami visur – maiste, drabužiuose, kosmetikoje ar net ore [181]. Tačiau pastaruoju metu jų naudojimas smarkiai ribojamas [182].

Vėžys – tai nekontroliuojamai besidalinančios audinio ląstelės, kurios nėra specializuotos atlikti konkrečią funkciją. Jos pasižymi gebėjimu plisti į kitus audinius – metastazuoti. Vėžys gali išsivystyti visuose žmogaus audiniuose ir bent pirmosiose stadijose, dažniausiai nepasireiškia jokiais simptomais [183]. Pagal vėžinio susirgimo išsivystymą, vėžys skirstomas į 5 stadijas. 0 stadija – vėžys dar nėra išsivystęs, tačiau audiniuose randamos pakitusios ląstelės, kurios vadinamos karcinomos ląstelėmis. I stadija – vėžys yra mažas, neišplitęs, susitelkęs viename audinyje. II ir III stadijos vėžiniai audiniai jau būna didesni, išplitę pirminiame audinyje ir aplinkiniuose limfmazgiuose. IV stadijos vėžys jau būna metastazavęs į kitus audinius [145,184]. Pagrindinis kelias, kuriuo vėžiniai susirgimai sukelia individo mirtį yra audinių ar organų pažeidimai, sukelti nekontroliuojamo šių ląstelių dalijimosi [185].

Vėžinis audinys turi jam būdingą specifinę aplinką, kuri keičiasi visos ligos vystymosi metu [186]. Yra jau nemažai duomenų, kurie rodo, kad vėžinį audinį supanti aplinka daro įtaką ląstelių dalijimuisi, atsparumui priešvėžiniams vaistams ir kitoms gydymo strategijoms, ligos atsinaujinimui bei metastazių atsiradimui [187]. Pavyzdžiui, kietųjų vėžinių audinių kietumas tiesiogiai koreliuoja su ligos stadija – kuo kietesnis vėžinis audinys, tuo didesnė mirties nuo atitinkamo vėžinio susirgimo rizika [187,188]. Dėl šių priežasčių, mechanobiologija susilaukė daug dėmesio vėžinių susirgimų tyrimuose [8,187,189]. Baltymai dalyvaujantys vėžinių ląstelių mechanojutime yra tiriami kaip potencialūs nauji priešvėžinių vaistų taikiniai [190]. Tikimasi, kad ši nauja tyrimų kryptis padės geriau suprasti vėžinių ląstelių metastazavimo procesus ir padidinti vėžinių susirgimų gydymo efektyvumą.

1.3.1. Vėžio aplinka

Vėžinį audinį supanti aplinka yra svarbi tiek jo iniciacijai, tiek ir jo vystymuisi [191]. Ji sudaryta iš vėžiniam audiniui specifinio užląstelinio užpildo ir įvairių tipų ląstelių, įskaitant vėžines ląsteles, vėžines kamienines ląsteles, endotelines ląsteles, fibroblastus, pericitus, lygiųjų raumenų ląsteles, dentritines ir įvairias kt. imunines ląsteles [183,192]. Šios ląstelės tarpusavyje bendrauja besikeisdamos tirpiaisi augimo veiksniais ir mechaniniais stimulais. Jų visuma yra dalinai atsakinga už didelį vėžinių ląstelių proliferacijos aktyvumą [191].

Vėžinio audinio fibroblastai (angl. *Cancer-Associated Fibroblasts* (CAF)) dažniausiai sudaro didžiąją dalį auglio ląstelių, kai kuriais atvejais netgi iki 80 % visų ląstelių [193]. Šios ląstelės yra labai heterogeniškos, nes jos vėžinių ląstelių ir aplinkos poveikyje kyla iš to audinio fibroblastų, kaulų čiulpų ląstelių, adipocitų, endotelinio ląstelių, epitelinių ląstelių ir kt. [194–201]. Šioms ląstelėms būdinga α -SMA baltymo raiška [202] ir jos atsakingos už vėžinio audinio trapląstelinio užpildo sintezę, kraujagyslių tinklo susidarymą, imuninio atsako reguliavimą [203]. Įdomu tai, kad CAF sintetinamas užląstelinis užpildas savo struktūra ir išsidėstymu skiriasi nuo to paties audinio fibroblastų sintetinamo užląstelinio užpildo [204,205]. Taip pat jam būdingas didesnis kolageno kiekis [206].

Vėžinėms ląstelėms proliferuojant, vėžinio audinio diametras didėja ir pasiekus ~1 mm, vėžinės ląstelės negali būti aprūpinamos pakankamu kiekiu deguonies, vystosi hipoksinis stresas [207]. Tiek vėžinės ląstelės, tiek CAF pradeda sintetinti įvairius citokinus ir augimo faktorius, kurie skatina endotelinio ląstelių pritraukimą ir naujų kraujagyslių formavimąsi [208–210]. Taip pat, trūkstant deguonies, vėžinės ląstelės pradeda energijos šaltiniu naudoti gliukozę (jos metabolizmui nereikalingas deguonis), kuri glikolizės kelio metu verčiama pieno rūgštimi ir kaupiasi ląstelėse [191]. Vėžinės ląstelės pradeda vandenilio jonus pernešti į užląstelinį užpildą, taip palaikydamos savo pH ir rūgštinamos aplinką [211]. Susidaręs kraujagyslių tinklas leidžia vėžiui toliau progresuoti [191]. Lyginant ~1 mm diametro vėžinius audinius su ~4 mm diametro, nustatyta, kad hipoksinės sąlygos yra daug stipresnės mažuosiuose vėžiuose, nes juose dar nebūna susiformavusi kraujotaka [207]. Tik susiformavus kraujagyslių tinklui, sukuriama sąlyga tolimesniam vėžinių ląstelių dalijimuisi. Taip pat, hipoksinės sąlygos dėl riboto deguonies kiekio vėžiniame audinyje smarkiai sumažina spindulinės terapijos ir kai kurių chemoterapijų efektyvumą [183,212]. Spindulinė terapija

yra pagrįsta ROS indukavimu, o tai lemia jų reakciją su ląstelės DNR ir kitais komponentais, taip inicijuojant vėžinių ląstelių žūtį [212].

Hipoksinės sąlygos taip pat lemia ir limfinės sistemos formavimąsi [191]. Tačiau tiek kraujagyslės, tiek limfagyslės turi daug defektų, kurie lemia jų nesandarumą. Dėl to, vėžiniuose audiniuose padidėja tarpląstelinio skysčio slėgis ir šlyties jėgos [213]. Visa tai papildomai mechaniskai stimuliuoja vėžinį audinį, skatina tolimesnį ligos vystymąsi [214].

Hipoksinė aplinka pritraukia ir imunines ląsteles [191]. Hipoksijos metu vėžinio audinio išskirti hipoksijos įjungiami veiksniai I ir II α (HIF1- α ir HIF2- α) iš kraujotakos pritraukia neutrofilus, kurie gali tiek slopinti, tiek skatinti vėžio vystymąsi [215–217]. Daugiau žinoma apie hipoksijos įtaką makrofagams. Šios ląstelės po aktyvacijos gali tapti M1 arba M2 tipo. M1 tipo makrofagai kovoja su vėžiniu audiniu ir slopina jo augimą ir vystymąsi, tuo tarpu M2 tipo makrofagai, kaip tik priešingai, gali skatinti vėžio vystymąsi [218]. Vėžinio audinio aplinka, hipoksinės sąlygos ir glikolizės metu išskirtos pieno rūgšties molekulės lemia M2 tipo makrofagų poliarizaciją [219,220].

Mieloidinės kilmės supresinės ląstelės taip pat yra pritaikiamos į hipoksinį vėžinį audinį. Šios ląstelės atkeliauja iš kaulų čiulpų ir jų skaičius vėžiniame audinyje smarkiai išauga, palyginus su sveikais audiniais. Šios ląstelės yra atsakingos už autoimuninio atsako slopinimą – tai apsaugo vėžines ląsteles ir leidžia joms toliau vystytis [221].

Nors į vėžinį audinį patenka ir T ląstelės, tačiau hipoksinė aplinka ir maistinių medžiagų trūkumas smarkiai slopina šių ląstelių aktyvumą [222,223]. Aplinka nukreipia T ląstelių diferenciaciją į T pagalbininkes ir T reguliacines ląsteles [224–226]. Hipoksinės sąlygos indukuoja T ląsteles pagalbininkes į užląstelinę terpę išskirti adenziną, kuris dar papildomai slopina efektorines T ląsteles [227,228].

1.3.2. Krūties vėžys

Krūties vėžys yra dažniausias vėžinis susirgimas diagnozuojamas moterims [229]. Lyginant visas vėžio rūšis, jis nusineša daugiausiai moterų gyvybių [230]. Krūties vėžys priklausomai nuo estrogeno, progesterono bei žmogaus epidermio augimo veiksnio 2 receptorių (ŽEAV2R) raiškos yra skirstomas į tris tipus: 70 % atvejų vėžinės ląstelės turi hormoninius receptorius, bet neturi ŽEAV2R, 15–20 % – turi visus tris receptorius ir 10–15 % – neturi nei vieno receptoriaus [231]. Be to, JAV daugiau nei 90 % atvejų, krūties vėžys yra nustatomas I–III stadijose [232]. Priklausomai nuo krūties vėžio tipo, naudojamos skirtingos gydymo strategijos. Tais atvejais,

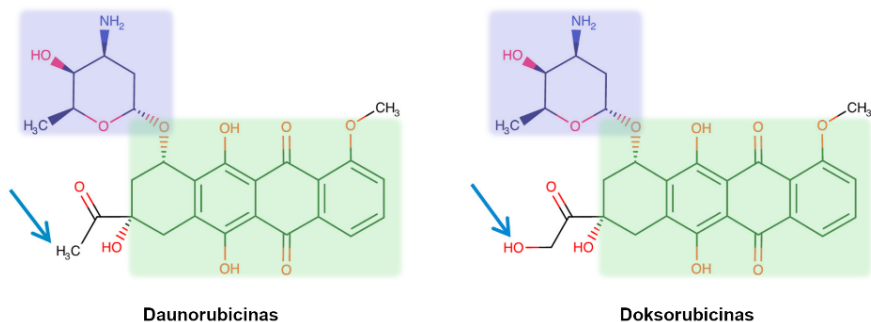
kai chirurginis gydymas netaikomas, yra skiriama sisteminė, visą organizmą veikianti terapija. Krūties vėžio ląstelėms turint visus receptorius paprastai skiriamas prieš ŽEAV2R nukreiptas antikūnų gydymas kartu su chemoterapija arba gydymas mažą molekulinę masę turinčiais slopikliais kombinuojant su chemoterapija. Kai vėžys turi tik lytinių hormonų receptorius, skiriama endokrininė terapija, kuri kartais kombinuojama su chemoterapija. Nei vieno iš minėtų receptorių neturintys vėžiniai susirgimai gydomi tik chemoterapija [231].

1.3.3. Krūties vėžio MCF-7 linija

Krūties vėžio tyrimuose plačiai naudojamos įvairios krūties vėžio linijos: MCF-7, BT483, MDAMB134, AU565, SKBR3 ir kt. [233]. Vienos seniausios išskirtos ir jau virš 50 m. plačiai moksliniuose tyrimuose naudojamos MCF-7 ląstelės [234]. Jos išskirtos iš 69 metų moters, kuri sirgo IV stadijos krūties vėžiu [235]. Ši linija charakterizuojama kaip estrogeno ir progesterono receptorius turinti, bet ŽEAF2R neturinti ląstelių linija [233]. Tokia receptorių raiška pasižymi ~70 % visų diagnozuojamų krūties vėžio atvejų [231]. Tačiau, ši ląstelių linija nėra vienalytė, joje aptinkamos įvairių fenotipų ląstelės, besiskiriančios genų raiška. Tačiau, jų kiekis populiacijoje yra pastovus, taikant specifines atrankas, galima šias subpopuliacijas išgryninti ir praturtinti [236]. MCF-7 ląstelėms būdinga aneuploidija, jos turi nuo 60 iki 140 chromosomų (sveikose ląstelėse yra 46 chromosomos) [237]. Šios ląstelės daugiausia sintetina estrogeno receptorių (ER) α ir labai mažus kiekius ER β [238]. Pradinė MCF-7 linija taip pat sintetina didelius kiekius progesterono receptoriaus (PR), tačiau priešvėžiniui vaistui tamoksifenui atspari MCF-7 ląstelių populiacija šio receptoriaus beveik neturi [236]. MCF-7 ląstelės turi diferencijavusių pieno liaukų epitelinių ląstelių paviršiaus žymenis E-kadheriną, β -kateniną, citokeratiną 18, bet neturi MKL žymenų – vimentino, SMA, CD44 [239,240]. Šios ląstelės sintetina nedidelius kiekius kraujagyslių endotelio augimo veiksnio A (angl. *Vascular Endothelial Growth Factor A* (VEGF-A)), VEGF-C ir labai mažus kiekius VEGF-D [241]. VEGF-A yra atsakingas už angiogenezės iniciavimą. Kadangi ląstelės sintetina nedidelius jo kiekius, MCF-7 suformuotose navikuose išsivysto prastas kraujagyslių tinklas, dėl to, šio tipo ląstelių linijai paprastai nėra būdingos tolimos metastazės [242]. Tuo tarpu, VEGF-C inicijuoja limfagyslių formavimąsi. Dėl to, šios ląstelės dažnai išplinta į limfmazgius [243]. Kadangi MCF-7 ląstelės yra išskirtos jau palyginti seniai (1970 m.), apie jas sukaupta labai daug duomenų. Tai leidžia šias ląsteles plačiai naudoti tiek vėžio patogenezės tyrimuose, tiek naujų gydymo strategijų paieškose [244,245].

1.3.4. Priešvėžinis vaistas doksorubicinas

Jungtinų Valstijų maisto ir vaistų administracija šiuo metu yra patvirtinusi virš 150 priešvėžinių vaistų, iš kurių patys populiariausi antraciklinai [246]. Pirmasis antraciklinas 1957 m. buvo išskirtas iš *Streptomyces peucetius* bakterijos ir pavadintas daunorubicinu [247]. Šis gamtinis junginys pasižymėjo dideliu efektyvumu žudant įvairias vėžines ląsteles. Tikintis dar padidinti šio junginio toksiškumą vėžinėms ląstelėms, buvo išbandytos įvairios daunorubicino modifikacijos [248]. Dar po 3 metų, iš *Streptomyces peucetius* mutanto buvo išskirtas šiek tiek modifikuotas daunorubicino analogas, kuris buvo pavadintas doksorubicinu [249]. Jis pasižymėjo dar didesniu priešvėžiniu efektyvumu ir šiuo metu yra vienas dažniausiai naudojamų priešvėžinių vaistų [250]. Tiek daunorubicinas, tiek doksorubicinas turi aglikoninį ir sacharido motyvus (1.6 pav.). Aglikolinės molekulės dalys turi tetraciklinį žiedą su šoninėmis chinoninėmis ir hidrochinoninėmis grupėmis, prijungą metoksi pakaitalą ir trumpą šoninę grandinę su karboniline grupe. Sacharidas, pavadintas daunosaminu, yra prijungtas prie vieno iš tetraciklino žiedo per glikolinį ryšį. Daunosaminą sudaro 3-amino-2,3,6-trideoksi-L-fukosil motyvas. Vienintelis skirtumas tarp daunorubicino ir doksorubicino yra papildoma OH grupė šoninėje doksorubicino grandinėje (1.6 pav.) [251].



1.6 pav. Daunorubicino ir doksorubicino struktūrinės formulės. Melsvas fonas rodo sacharidinį molekulės fragmentą – daunosaminą, žalsvas fonas – aglikolinę molekulės dalį. Mėlyna rodyklė žymi struktūrų skirtumą.

Doksorubicinas turi kelis veikimo mechanizmus. Jis interkaluoja tiek į branduolinę, tiek į mitochondrinę DNR [252], prisijungia prie topoizomerazės II ir ją inaktyvuoja [253], patekęs į mitochondrijas, ten generuoja ROS, kurie vėliau reaguoja su ląstelių komponentais ir sukelia ląstelių žūtį [254,255]. Doksorubicinas yra tirpus lipiduose, todėl nesunkiai patenka į ląstelės vidų. Čia jis gali jungtis prie citoplazminių baltymų, baltymų kompleksų, vienas iš

jų yra proteosoma, kuri pasižymi dideliu afiniškumu doksorubicinui. Proteosomos ląstelėje gali būti transportuojamos tiek į branduolį, tiek į mitochondrijas. Patekęs į šias organeles, doksorubicinas difunduoja nuo proteosomos ir jungiasi prie didesnį afiniškumą turinčių molekulių [250].

Doksorubicinas puikiai interkaluoja į DNR, taip slopindamas DNR, RNR ir baltymų raišką [256,257]. Taip pat, doksorubicinas jungiasi su topoizomeraze II. Šis fermentas atsakingas už DNR molekulės superspiralizacijos kontrolę. Ji perkerpa vieną iš DNR grandinių ir sumažina DNR superspiralizaciją. Doksorubicinas būtent ir jungiasi prie topoizomerezės II, kai ji perkerpa vieną iš DNR grandinių ir stabilizuoja šį kompleksą. Tai lemia viengrandžio trūkio susidarymą, kuris vėliau gali tapti dvigrandžiu [253,258,259].

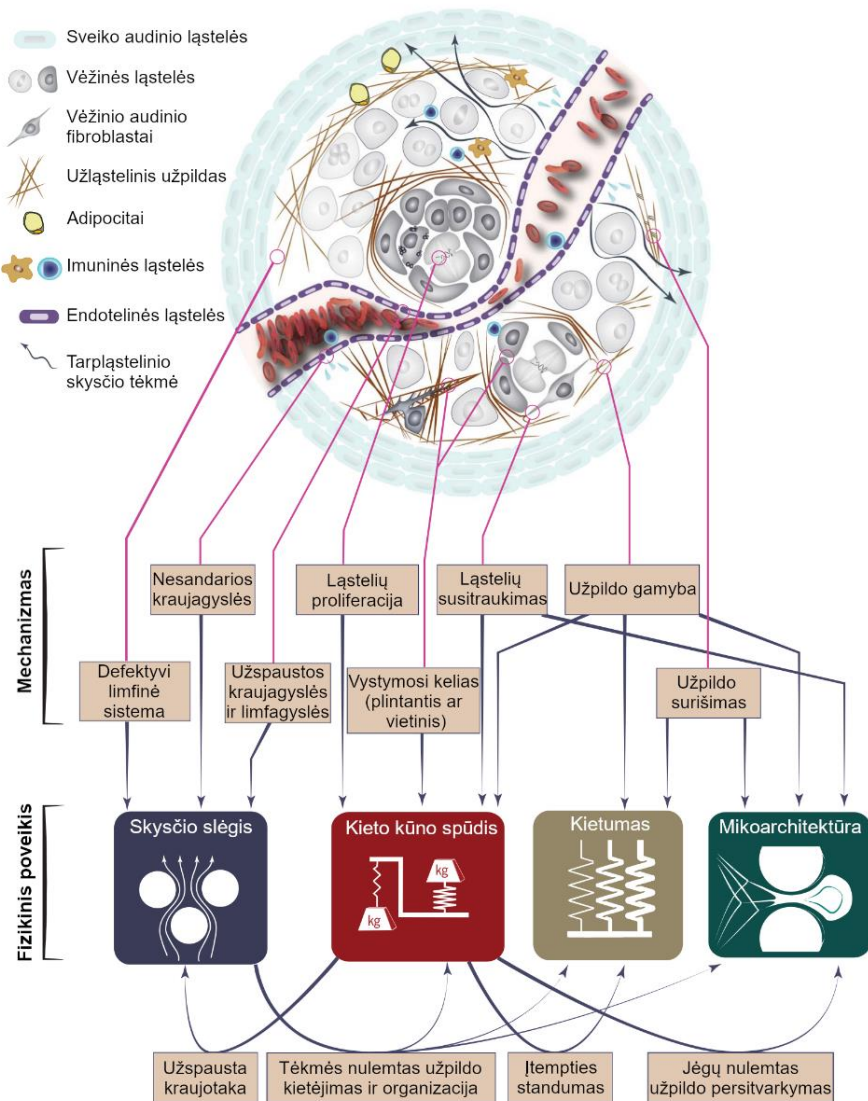
Pakliuvęs į mitochondrijas, doksorubicinas ne tik jungiasi prie mitochondrinės DNR, bet ir kardiopolino – mitochondrijos vidinei membranai būdingo fosfolipido. Tai blokuoja kreatino kinazės prisijungimą prie mitochondrijos vidinės membranos. To pasekoje slopinamas daugelio svarbių mitochondrijos funkcijos palaikymui baltymų aktyvumas. Taip pat, doksorubicinas iš mitochondrijos Krebso ciklo I komplekso priima laisvą elektroną, susiformuoja semichinonas, kuris reaguoja su O_2 ir susidaro ROS [260–263].

Dėl didelio afiniškumo kardiopolinui, doksorubicinas turi daug stiprių šalutinių poveikių [250]. Jis žudo ne tik vėžines organizmo ląsteles, bet ir kitas, metaboliškai aktyvias audinių ląsteles. Doksorubicinas pažeidžia širdies miocitus, kepenų, inkstų ir smegenų ląsteles [248,250]. Tačiau šie šalutiniai poveikiai buvo smarkiai sumažinti pritaikius vaistų nešiklius. Doksorubicinas, patalpintas į liposomas, daug sunkiau kerta kraujo barjerą, dėl to jo koncentracija širdies ir kituose audiniuose smarkiai sumažėja lyginant su laisvu doksorubicinu. Kadangi vėžiui būdinga prasta, nesandari kraujotakos sistema, liposomos dėl to ir kaupiasi vėžiniuose audiniuose. Šiuo atveju, doksorubicino poveikis būna labiau vietinis [248].

1.3.5. Vėžys ir mechanobiologija

Vėžys seniau buvo laikomas liga, kurią sukelia genų, kontroliuojančių ląstelių proliferaciją, mirtį, metabolizmą ir DNR reparaciją, mutacijos [264]. Tai vis dar galioja ląsteliniame lygyje, tačiau jau dabar aišku, kad vėžį supanti aplinka ir kitos ląstelės kontroliuoja tolimesnį jo vystymąsi ir netgi atsparumo priešvėžinėms terapijoms susidarymą [265]. Vėžiniame audinyje vyrauja keturios būdingiausios išorinės aplinkos jėgos, kurios išskirtinai būdingos

šiam audiniui. Tai kietojo kūno spūdis, tarpląstelinio skysčio slėgis, užląstelinės aplinkos kietumas ir jos mikroarchitektūra (1.7 pav.) [266].



1.7 pav. Pagrindinės jėgos, veikiančios vėžinį audinį ir jų poveikis. Paregta pagal [266].

Kieto kūno spūdį sudaro kelios jėgos – gniuždymo, tempimo ir šlities, kurios yra generuojamos tiek ląstelių, tiek užląstelinio užpildo komponentų [267]. Skirtinguose vėžiniuose susirgimuose šios jėgos smarkiai svyruoja, pavyzdžiui, glioblastomos vėžinis audinys yra veikiamas 0,1 kPa, o kasos

vėžinis audinys – 10 kPa jėgos [268]. Šių jėgų atsiradimą lemia dėl imuninių ir kamieninių ląstelių infiltracijos, vėžinių ląstelių proliferacijos ir padidėjusio užląstelinio užpildo sintezės padidėjęs vėžinio audinio tūris [268]. Naujos struktūros stumia jau esamas, jėgos perduodamos tiek vėžinio audinio viduje, tiek ir jo išorėje – sveikam audiniui. Šios jėgos didina užląstelinio užpildo įtempį. Tai aktyvuoja CAF ir jie, sintetindami užląstelinio užpildo komponentus, dar papildomai didina kieto kūno spūdį [269]. Šios generuojamos jėgos yra pakankamai stiprios, kad užspaustų kraujotakos ir limfinės sistemos kraujagysles [270–272]. Tai lemia hipoksijos streso atsiradimą vėžiniame audinyje [272,273], suprastėjusią maisto medžiagų apykaitą ir priešvėžinių vaistų atnešimą į vėžinį audinį, o taip pat slopina imuninį atsaką, nes imuninėms ląstelėms sunkiau patekti į vėžinį audinį [274,275]. Vėžiui toliau augant, pradeda trūkti ne tik vietos, bet ir maisto medžiagų, prasideda procesas vadinamas ląstelių varžybomis (angl. *Cell competition*) [276]. Vėžinės ląstelės yra geriau prisitaikiusios augti tokioje aplinkoje ir dėl to išstumia sveiko audinio ląsteles, sukelia jų žūtį [277]. Dėl šių išvardytų priežasčių yra sukurtos kelios gydymo strategijos, siekiančios likviduoti kieto kūno spūdzio sukeltą vėžio vystymosi procesus. Jos šiuo metu yra klinikinių tyrimų stadijose [266]. Viena iš strategijų pagrįsta fibrozinio proceso slopinimu ir užląstelinės aplinkos degradacijos skatinimu. Šioje gydymo metodikoje naudojamas losartanas, angiotensino 1 receptoriaus slopiklis, kuris slopindamas audinių augimo veiksnio β (angl. *Tissue growth factor β (TGF- β)*) išskyrimą, sumažina kolageno I ir hialurono rūgšties gamybą [273]. Kasos vėžio atveju, losartanas, sumažina kasos audinio kieto kūno spūdį, o tai lemia kraujotakos sistemos atstatymą ir chemoterapijos efektyvumo padidinimą [273].

Didžiojoje dalyje organų, kraujas atkeliauja arterijomis ir iškeliauja venomis, o perteklinis audinių skystis pašalinamas per limfinę sistemą. Taip audiniuose palaikoma tarpląstelinio skysčio homeostazė, dėl to sveikuose audiniuose tarpląstelinio skysčio slėgis yra beveik nulinis. Tuo tarpu smegenų vėžiui būdingas <1 kPa tarpląstelinio skysčio slėgis, o pavyzdžiui, inkstų vėžio atveju jis siekia ir 5 kPa. Ši jėga atsiranda dėl nesandarių vėžinio audinio kraujagyslių ir prieš tai minėtos kieto kūno spūdzio nulemtos kraujotakos, tiek limfinės sistemos užspaudimo [278]. Tarpląstelinio skysčio slėgis maždaug vienodai pasiskirstęs po visą vėžinį audinį, o jo pakraščiuose staigiai sumažėja. Ši jėga taip pat aktyvuoja CAF [279], skatina angiogenezę [279,280], inicijuoja metaloproteazių sintezę [281] ir vėžinių ląstelių migraciją [282,283]. Dėl didesnio tarpląstelinio skysčio slėgio vėžiniame audinyje lyginant su sveiku, skystis juda iš naviko į sveikus audinius. Tai

lemia chemoterapijos vaistų koncentracijos vėžiniame audinyje sumažėjimą [284]. Taip pat, ši tėkmė lemia ir augimo veiksmų transportą į sveikus audinius, tai sukuria gradientą vėžinėms ląstelėms migruoti. Remiantis šiais procesais taip pat yra sukurtos kelios gydymo strategijos. Pavyzdžiui, sumažinti tarpląstelinio skysčio slėgį galima pagerinus vėžinio audinio kraujagyslių kokybę, padidinant jų sandarumą [266]. Tą galima padaryti naudojant VEGF-A surišėjus, VEGF receptoriaus tirozino kinazės slopiklius [285].

Kūno kietumas arba standumas dar kitaip – elastinis modulis, nurodo, medžiagos savybę priešintis tiek į kūno vidų, tiek į jo išorę nukreiptoms deformacijoms. Tai vidinė audinio savybė, unikali kiekvienam audiniui [266,286]. Kaip buvo minėta anksčiau, vėžiniams audiniams būdingas didesnis kietumas nei sveikiems audiniams. Pavyzdžiui, smegenų augliui būdingas 1 kPa kietumas, tuo tarpu cholangiokarcinomai – net iki 70 kPa kietumas [265]. Ši vėžinio audinio savybė yra naudojama diagnozuoti vėžį [287] ir net prognozuoti ligos eigą [288,289]. Iš aibės atliktų tyrimų žinome, kad audinio kietumas tiesiogiai reguliuoja ląstelių diferenciaciją [15], proliferaciją [290,291], angiogenezę [292], metabolizmą [293], migraciją ir metastazių susidarymą [294–296]. Užląstelinio užpildo sintezė ir jo surišimas yra pagrindinės priežastys, lemiančios audinių standėjimą. Už šių procesų valdymą yra atsakingos CAF [269,297]. Taip pat, ląstelės turi molekulinis mechanizmus, kurių pagalba gali atsiminti aplinkos, kurioje jos prieš tai augo, savybes. Šis procesas yra vadinamas ląstelių mechanine atmintimi. Jos susidarymo procese dalyvauja mikroRNR-21. Tokios ląstelės perkeltos į minkštą aplinką toliau elgiasi lyg augtų kietoje aplinkoje [298]. Tai padidina jų proliferacijos intensyvumą, pagerina adheziją ir ląstelių atsparumą įvairiems stresiniams veiksniams [266]. Kadangi didėjant audinio kietumui, taip pat greitėja ląstelių metabolizmas, ši savybė yra panaudojama vėžio terapijoje. Naudojant metforminą, sumažinamas kraujyje esančios gliukozės kiekis tokiu būdu apribojant jos prieinamumą vėžinėms ląstelėms, kurios gliukozę naudoja kaip pagrindinį energijos šaltinį [293,299].

Kiekvienas audinys yra sudarytas iš ląstelių ir užląstelinio užpildo, kurie erdvėje yra išdėstyti tam tikra tvarka – t.y. būdinga specifinė mikroarchitektūra, kuri buvo optimizuota ir stabilizuota per ilgą laiką, evoliucijos proceso metu. Pavyzdžiui, žarnyno epitelis auga 2D plokštumoje, vienoje pusėje ląstelės yra prisitvirtinusios prie pamatinės laminos, kita puse ląstelės sąveikauja su žarnyno turiniu [266]. Augant vėžiniam audiniui, ši audinio mikroarchitektūra yra prarandama. Dėl ląstelių susispaudimo, perteklinio užląstelinio užpildo sintezės, visiškai pasikeičia audinio

architektūra [189,266]. Šie pokyčiai indukuoja epitelinį-mezenchiminį virsmą, kurio metu plokščios epitelinės ląstelės įgauna mezenchiminėms ląstelėms būdingą morfologiją, kuri smarkiai padidina ląstelių migracijos potencialą, leidžia joms geriau sąveikauti su užląsteline aplinka [266,300]. Pakitusi ląstelių geometrija lemia ir branduolio morfologijos pokyčius. Tai daro įtaką genų raiškai, nes priklausomai nuo morfologijos, skirtingos chromosomų sritys būna lokalizuotos prie branduolio membranos, o būtent šiose srityse didžioji dalis chromatino būna aktyvioje būsenoje, vyksta tų genų raiška, ir priešingai, į branduolio vidų nukreipti baltymai dažniausiai būna neaktyvioje heterochromatino formoje [62,301]. Dar didesnes branduolio deformacijos patiria migruojančios ląstelės, ypač pro tarpus, mažesnius už branduolio skersmenį. Tokia migracija gali sukelti DNR išstūmimą į ląstelės citoplazmą pro branduolio poras ar net sukelti dvigrandžius DNR trūkius [302–304].

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Medžiagos

Fosfatinis buferinis tirpalas (FBT) (09-8912-100, *Medicago*); natrio dodecilsulfatas (NDS) (101161470, *Sigma-Aldrich*); Triton X-100 (X100-5ML, *Sigma-Aldrich*); natrio citrato buferinis tirpalas (SSC) (93017-10L-F, *Sigma-Aldrich*); DAPI (D1306, *Invitrogen*); IMDM (42200-030, *Gibco*); DMEM (12800-017, *Gibco*); Penicilinas/Streptavidinas (15140-122, *Gibco*); fetalinis veršelio serumas (A31608-01, *Gibco*); izopropanolis (UN1219, *VWR international GmbH*); etanolis (32221-2.5L, *Sigma-Aldrich*); paraformaldehidas (30525-89-4, *Sigma-Aldrich*); jaučio serumo albuminai (BSA) (9048-46-8, *Sigma-Aldrich*), Rodamino faloidinas konjuguotas su TRITC (90228, *Millipore*), HEPES (15630-056, *Gibco*), TRIZOL (15596026, *Invitrogen*), polilaktinė rūgštis (PLA) (*Pure PLA filament, Ultimaker*); ožkos antriniai antikūnai pagaminti prieš pelės antikūno Fc galą ir konjuguoti su Rpfkoeritrinu (PA1-84395, *Thermo Scientific*); ožkos antriniai antikūnai pagaminti prieš pelės antikūno Fc galą ir konjuguoti su krienų peroksidazę (HRP) (31430, *Invitrogen*); ožkos antriniai antikūnai pagaminti prieš triušio antikūno Fc galą ir konjuguoti su HRP (31460, *Invitrogen*); pelėje pagaminti prieš p38 baltymą (331300, *Invitrogen*); pelėje pagaminti antikūnai prieš fosfo-p38 baltymą (MA5-15218, *Invitrogen*); ožkos antriniai antikūnai pagaminti prieš triušio antikūno Fc galą ir konjuguoti su Alexa Fluor 488 (a31628, *Invitrogen*); triušyje pagaminti antikūnai prieš ERK1/2 baltymą (137F5, *Cell Signaling Technology*); triušyje pagaminti antikūnai prieš fosfo-ERK1/2 baltymą (Thr 202/Tyr 204) (sc-16982, *Santa Cruz Biotechnology*); triušyje pagaminti antikūnai prieš JNK1/2 baltymą (56G8, *Cell Signaling Technology*); triušyje pagaminti antikūnai prieš fosfo-JNK1/2 (Thr183, Tyr185) baltymą (700031, *Invitrogen*); pelėje pagaminti antikūnai prieš GAPDH baltymą (MA5-15738, *Invitrogen*); pelėje pagaminti antikūnai prieš c-Jun baltymą (610326, *BD Bioscience*); pelėje pagaminti antikūnai prieš fosfo-c-Jun (S63) baltymą (558036, *BD Bioscience*); triušyje pagaminti antikūnai prieš c-Fos baltymą (MA5-36080, *Invitrogen*); triušyje pagaminti antikūnai prieš fosfo-c-Fos (Ser374) baltymą (PA5-105995, *Invitrogen*); EDTA (E6511, *Sigma-Aldrich*); vandenilio peroksidas (H10009, *Sigma-Aldrich*); SP600125 (S5567, *Sigma-Aldrich*); SB203580 (S8307, *Sigma-Aldrich*); PD98059 (19-143, *Sigma-Aldrich*); CD19, CD44, CD45, CD90, CD105, CD106, CD146 ir CD166 (SC017; *R&D Systems*); akrilamidas (01702, *Sigma-Aldrich*); bis-akrilamidas (146072, *Sigma-Aldrich*); TEMED (2367, *Carl Roth*); amonio persulfatas (A3678, *Sigma-Aldrich*); sulfo-

SANPAH (22589, *Thermo Scientific*); I tipo kolagenas (A1048301, *Gibco*); ECL Western Blot substratas (32106, *Thermo Scientific*); Tween-20 (P1379-250ML, *Sigma-Aldrich*); APTES (3-aminopropiltrimetoksi silanas) (80370, *Thermo Scientific*); dichlormetilsilane (CMS) (440272, *Sigma-Aldrich*); Rodamino faloidinas (R415, *Invitrogen*); MTT (475989, *Merck Chemicals*); DMSO (A994.2, *Carl Roth*), doksorubicino chloridas (D2975000, *Sigma-Aldrich*); kolagenazė (C0130, *Sigma-Aldrich*); hialuronidazė (H1136, *Sigma-Aldrich*); tripsinas (27250-018, *Life technologies*); kolagenazė A (COLLARO, *Sigma-Aldrich*); NaN₃ (S2002, *Sigma-Aldrich*); deksametazonas (D4902, *Sigma-Aldrich*); indometacinas (I7378, *Sigma-Aldrich*); 3-izobutil-1-metilksantinas (I7018, *Sigma-Aldrich*); žmogaus rekombinantinis insulinas (91077C,); *Sigma-Aldrich Oil red O* (O0625, *Sigma-Aldrich*); arklio serumas (26050088, *Fisher Scientific*); kristalvioletas (C0775, *Sigma-Aldrich*); β-glicerofosfatas (G9422, *Sigma-Aldrich*); askorborūgštis (A4544, *Sigma-Aldrich*); alizarino raudonasis S (A5533, *Sigma-Aldrich*); Bredfordo reagentas (23236, *ThermoFisher Scientific*); TrisHCl (10812846001, *Roche*); PVDF membrana (T830.1, *Carl Roth*); nitroceliuliozinė membrana (88018, *Thermo Scientific*); GAPDH (MA5-15738, *Invitrogen*); NaOH (9356.1, *Carl Roth*); gliutaraldehidai (340855, *Sigma-Aldrich*).

2.2. Metodai

2.2.1. Ląstelių išskyrimas

Šiame darbe buvo naudotos dvejų pirminių ląstelių linijos: iš žiurkių dantų pulpos išskirtos mezenchiminės kamieninės ląstelės (DPKL) ir iš žmogaus dantų išskirtos mezenchiminės kamieninės ląstelės (DMKL). DPKL išskyrimui buvo naudotos keturios 3 mėn. amžiaus *Wistar* žiurkių dantų pulpos. Visoms procedūroms su gyvūnais buvo gautas Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos Bioetikos komiteto leidimas Nr. G2-40, 2016-03-18. Iš pradžių gyvūnai buvo eutanazuojami CO₂ dujų kameroje ir po to jiems buvo ištraukiami kandžiai. Iš kandžių pincetų pagalba išimami pulpos audiniai, kurie perkeliama į *Iscove* modifikuota *Dulbecco* (IMDM) mitybinę terpę (MT) su 300 VV/ml penicilino ir 300 µg/ml streptomicino. Tada pulpos audiniai buvo steriliai praplaunami 3 kartus steriliame fosfatiniame buferiniame tirpale (FBT) su 300 VV/ml penicilino ir 300 µg/ml streptomicino ir žirkėmis steriliai sukarpmi į maždaug 1 mm³ dydžio gabaliukus. Susmulkinti audiniai užpilami virškinimo fermentų mišiniu (0,5 % kolagenazė, 0,3 % hialuronidazė, 0,25 % tripsinas ir 0,02 % EDTA sumaišyti santykiu 2:3:3:3) ir inkubuojami 37 °C temperatūroje maišant 30–

45 min. Po inkubacijos audiniai užpilami MT ir du kartus praplaunami centrifuguojant 300 RCF 10 min. kambario temperatūroje (KT) (CL10 centrifuga, *Thermo Scientific*). Supernatantas nupilamas, išskirtos ląstelės su susmulkintais audiniais suspenduojami MT ir išsėjami į 25 ar 75 cm² paviršiaus ploto ląstelių auginimo flakonus. Ląstelėms prilipus, neprikibę audiniai perkeliama į kitas plokšteles, o prikibusios ląstelės praplanamos MT. Ląstelėms pasiekus 70–80 % monosluoksnį buvo atliekamas CD44 ekspresuojančių ląstelių skyrimas magnetinių dalelių, dengtų antikūniais prieš CD44 paviršiaus baltymą, pagalba.

DMKL skirtos, naudojant panašią metodiką kaip ir DPKL. Darbui žmonių audiniais buvo gautas Lietuvos bioetikos komiteto leidimas Nr. 158200-16- 860-369, 2016-07-12. Burnos chirurgė, protinių dantų šalinimo procedūros metu iš savanorių (N=5) paėmė mažus dantenų gabalėlius maždaug 1–1,5 mm³ dydžio ir patalpino MT su 300 VV/ml penicilino ir 300 µg/ml streptomicino. Audiniai buvo laikomi 4 °C temperatūroje iki skyrimo procedūros pradžios. Priešingai nei DPMKL, dantenų audiniai buvo virškinami naudojant 1 mg/ml kolagenazės A tirpalą, kuriame susmulkinti audiniai buvo inkubuojami 45 min. 37 °C temperatūroje maišant. Ląstelės nuo audinių gabaliukų buvo atskirtos filtruojant virškinimo tirpalą su ląstelėmis ir audiniais pro 70 µm nailoninį švirkštinį filtrą. Surinkta ląstelių suspensija du kartus praplauta centrifuguojant 300 RCF KT. Po to ląstelės buvo suspenduotos MT ir išsėtos į 25 ar 75 cm² paviršiaus ploto flakonus. DMKL ir DPKL auginamos 37 °C temperatūroje esant 95 % drėgmės ir 5 % CO₂. DMKL 3–6 pasažai buvo naudoti eksperimentams, DPKL – 3–12 pasažo.

2.2.2. Ląstelių kultivavimas

Susiformavus monosluoksniui (po 2–3 parų), ląstelės persėjamos į padalinant į du flakonus. Iš pradžių nupilama sena terpė, vėliau monosluoksnis praplaunamas terpe be serumo arba FBT ir du kartus paveikiamas EDTA ir tripsino (0,025%) mišiniu, paruoštu santykiu 4:1. Nedidelis tūris EDTA ir tripsino mišinio paliekamas ir inkubuojama 5–10 min. 37 °C, kol monosluoksnis disocijuoja nuo paviršiaus. Po to ląstelės suspenduojamos šviežioje MT, įvertinama jų koncentracija, galiausiai jos išsėjamos į flakonus.

2.2.3. Ląstelių paviršiaus žymenų tyrimas tėkmės citometru

Paruošiama tiriamųjų ląstelių suspensija, kurios koncentracija ~1 000 000 ląst./ml. Ląstelės nucentrifuguojamos 300 RCF 5 min. KT ir, nupylus

supernatantą, suspenduojamos FBT su 10 % fetaliniu veršelių serumu (FVS) bei 1 % NaN_3 . Gauta suspensija išpilstoma po 100 μl į atskirtus mėgintuvėlius kiekvienam paviršiaus žymeniui. Į šiuos mėgintuvėlius pridedama praskiestų pirminių antikūnų. Taip pat naudojama ir nedažyta kontrolė (neveikta pirminiais antikūnais) bei izotipinė kontrolė, kurios reikalingos signalo susikalibravimui ir foninio signalo įvertinimui. Ląstelės inkubuojamos nuo 30 min. iki 1 val. 4 °C temperatūroje. Po to ląstelės nucentrifuguojamos ir 3 kartus praplaunamos FBT su 10 % fetaliniu veršelių serumu (FVS) bei 1 % NaN_3 , paveikiamos antriniais antikūnais su AlexaFluor 488 fluorescentine žyme. Ląstelės vėl inkubujamos nuo 30 min. iki 1 val. 4 °C tamsoje. Po inkubacijos ląstelės dar 3 kartus praplaunamos ir suspenduojamos FBT. Paviršiaus žymenų raiška ląstelėse įvertinama tėkmės citometru (*BD FACSCanto II*).

2.2.4. Ląstelių diferenciacinio potencialo vertinimas

MKL kamieniškumas buvo įvertintas jas diferencijuojant adipogenine, miogenine ir osteogenine kryptimis. Riebalinė diferenciacija buvo indukuota auginant ląsteles adipogeninę diferenciaciją indukuojančioje terpėje (DMEM terpė praturtinta 10 % FVS, 1 % penicilino, streptomicino tirpalu, 1 % glutaminu, 1 μM deksametazonu, 1 μM indometacinu, 500 μM 3-izobutil-1-metilksantinu ir 10 $\mu\text{g/ml}$ žmogaus rekombinantiniu insulinu). Rezultatai vertinti po 4 parų. Tuo tikslu, ląstelių monosluoksnis buvo fiksuojamas 4 % formaldehido tirpalu 10 min. KT. Po to ląstelės plautos distiliuotu vandeniu, kuris vėliau pakeistas 60 % izopropanoliu, ir inkubuota KT 5 min. Po to izopropanolis buvo nusiurbiamas ir ląstelėse esantys lipidų ląšeliai nudažomi *Oil Red O* tirpalu (0,5 % *Oil Red O* tirpalas paruoštas izopropanolyje) KT 10–15 min. Tada dažas buvo nusiurbiamas ir ląstelės atsargiai plaunamos distiliuotu vandeniu, kol vanduo tampa skaidrus. Vandens likučiai labai gerai nupurtomi ir plokštelė nusausinama ją apverčiant ant popierinio rankšluosčio. Galiausiai ląstelės užpilamos FBT ir raudonai nusidažiusios lipidinės pūslelės riebaline kryptimi diferencijavusiose ląstelėse vizualizuojamos šviesiniu mikroskopu (*Olympus IX51*).

Raumeninė diferenciacija buvo indukuota, naudojant miogeninės diferenciacijos terpę (DMEM praturtinta 2 % arklio serumu, 1 % penicilino ir streptomicino tirpalu). Rezultatai analizuoti po savaitės, ląsteles dažant 0,1 % kristalvioleto tirpalu. Metodas paremtas nespecifiniu baltymų dažymu. Raumenine kryptimi diferencijavusios laikomos tos ląstelės, kurios turi kelis branduolius. Diferenciacijos eksperimento pabaigoje buvo pašalinama raumeninę diferenciaciją inicijuojanti terpė ir tris kartus praplaunama FBT. Po to ląstelės fiksuojamos ir dažomos 0,1 % kristalvioleto. Po 30 min. šulinėliai

tris kartus praplaunami dejonizuotu vandeniu. Vandens likučiai labai gerai nupurtomi ir plokštelė nusausinama ją apverčiant ant popierinio rankšluosčio. Raumenine kryptimi diferencijavusios ląstelės vizualizuojant šviesiniu mikroskopu.

Kaulinei diferenciacijai indukuoti buvo naudota osteogeninės diferenciacijos terpė (DMEM praturtinta 10 % FVS, 1 % penicilino, streptomicino tirpalu, 10 mM β glicerofosfatu, 25 μ g/ml askorbo rūgštimi ir 50 nM deksametazonu). Ląstelių diferenciacija buvo vykdoma 21 dieną, diferenciacijos terpė keičiama kas 2–3 dienas, paliekant 1/2 senos terpės. Rezultatai analizuoti ląstelių monosluoksnį fiksuojant 4 % formaldehido tirpalu bei dažant 2 % Alizarino Raudonojo S tirpalu (pH=4,1–4,3), kuris nudažo kalcio fosfato sandaugas užląsteliniam užpilde. Jos vėliau vizualizuojamos šviesiniu mikroskopu.

Visų diferenciacijos krypčių vertinime buvo naudotos kontrolinės ląstelių grupės, kurios buvo auginamos įprastoje auginimo terpėje su standartiniais priedais.

2.2.5. MTT metodas

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas) metodas naudojamas ląstelių skaičiaus pokyčiams vertinti. Tuo tikslu, ląstelių MT buvo pašalinama ir ant ląstelių užpilamas 37 °C 0,2 mg/ml MTT tirpalas paruoštas MT. Kamieninės ląstelės su MTT inkubuojamos 1 val. 37 °C temperatūroje, vėžinės MCF-7 ląstelės – 2 val. Po inkubacijos MT su MTT nusiurbama ir ląstelėse susidarę netirpūs formazano kristalai ištirpinami DMSO tirpale. Gauta tirpalo absorbcija išmatuojama plokštelių skaitytuvu *Varioscan Flash*, matuojant sugertį ties 570 nm bangos ilgiu. Gautas sugerties signalas yra padalinamas iš nulinės kontrolės (kontrolė prieš poveikį), duomenys pateikiami kaip ląstelių skaičiaus pokytis kartais.

2.2.6. DMKL gyvybingumo vertinimas po poveikio vandenilio peroksidu

DMKL išsėjamos ant tiriamųjų paviršių po 6 400 ląst./cm². Kitą dieną terpė pakeičiama į MT su atitinkamomis vandenilio peroksido koncentracijomis. Ląstelių jautrumo vandenilio peroksidui eksperimentui naudotos 100, 250, 500, 750, 1000 ir 2000 μ M koncentracijos. Paviršiaus kietumo įtakai DMKL jautrumui vandenilio peroksidui naudota 250 μ M peroksido koncentracija. Kitą dieną po poveikio, ląstelių terpė nusiurbama ir ant ląstelių užpilamas 0,2 mg/ml MTT tirpalas, vertinama kaip aprašyta 2.2.5 dalyje. Taip pat, vandenilio peroksido poveikio pridėjimo dieną įvertinamas

nulinės kontrolės signalas – išmatuojamas ląstelių signalas prieš poveikį. Nulinės kontrolės signalas toliau naudojamas duomenų standartizavimui, duomenys pateikiami kaip ląstelių skaičiaus pokytis kartais. Paviršiai be ląstelių buvo naudoti foninio signalo įvertinimui.

2.2.7. MCF-7 gyvybingumo vertinimas po poveikio doksorubicinu

MCF-7 išsėjamos ant tiriamųjų paviršių po 6 400 ląst./cm². Kitą dieną terpė pakeičiama į MT su atitinkamomis doksorubicino koncentracijomis. Ląstelių jautrumo doksorubicinui vertinimui naudotos įvairios jo koncentracijos, nuo 0,05 iki 40 μM. Po dviejų poveikio dienų ląstelių terpė buvo nusiurbiama ir ant ląstelių užpilamas 0,2 mg/ml MTT tirpalas, įvertinama kaip aprašyta 2.2.5 dalyje. Poveikio pridėjimo dieną įvertinamas nulinės kontrolės signalas, kuris toliau buvo naudojamas duomenų standartizavimui. Paviršiai be ląstelių buvo naudoti foninio signalo įvertinimui.

2.2.8. Ląstelių adhezijos tyrimas

Ant tiriamųjų paviršių buvo išsėjamos tiriamos ląstelės po 8 000 ląst./cm². Ląstelių adhezijos kinetikos tyrimui ląstelės po išsėjimo buvo inkubuojamos termostate 37 °C esant 5 % CO₂ ir, atitinkamai po 30, 60, 90 ir 120 min. ląstelės vizualizuotos šviesiniu inversiniu mikroskopu (*Olympus IX51*). Gautos nuotraukos buvo analizuojamos *ImageJ* (1.8.0_112) programa, kurios pagalba matuojamas nuotraukose esančių ląstelių ilgis.

Ląstelių išplitimas ant paviršių ir suformuotas fokolinių adhezijų skaičius vertintas imunocitochemijos metodu nudažant fokalinėse adhezijose esančią kinazę fosfo(Tyr397)FAK ir ląstelių iš F-aktino suformuotą citoskeletą. Praėjus 24 valandoms po ląstelių išsėjimo, ląstelės buvo fiksuojamos 10 % formalino tirpalu 15 min. KT lėtai maišant ant vartyklės (25 RPM). Po to, ląstelės permabilizuotos tris kartus po 5 min. inkubuojant jas 0,2 % Triton X-100 tirpale, paruoštame FBT. Dažant F-aktiną, ląstelės buvo užpilamos 5 VV/ml rodamino phaloidino ir 4 μg/ml 4',6-diamidino-2-fenilindoliu (DAPI) dažų tirpalais paruoštais FBT. Ląstelės inkubuotos tamsoje, KT, 60 min. Po inkubacijos ląstelės tris kartus buvo plaunamos FBT ir vizualizuojamos invertuotu fluorescentiniu mikroskopu.

Fokolinių adhezijų atveju, ląstelės po permabilizacijos buvo blokuojamos naudojant 3 % veršelio serumo albumino (VSA) ir 10 % FVS tirpalus, paruoštus FBT 30 min, KT. Tada, blokavimo tirpalas buvo nusiurbiamas ir ląstelės paveikiamos antikūnais prieš fosforilintą (Tyr397)

FAK baltymą, paruoštais blokavimo tirpale. Ląstelės su pirminių antikūnų tirpalu buvo inkubuojamos 1 val., KT. Po to, ląstelės 3 kartus buvo plaunamos plovimo tirpalu (0,05 % Tween-20 pagamintu FBT) ir veikiamos antrinais antikūnais, turinčiais AlexaFluor 488 fluorescentinę žymę, taip pat paruoštais blokavimo tirpale ir inkubuojama 1 val. tamsoje, KT. Toliau ląstelės vėl tris kartus plaautos plovimo tirpalu po 5 min. Branduolių nudažymui ląstelės 5 min. buvo inkubuojamos su 4 µg/ml DAPI dažu paruoštu FBT. Ląstelės dar tris kartus buvo plaunamos FBT ir vizualizuojamos invertuotu fluorescentiniu mikroskopu. Ląstelių suformuotų fokolinių adhezijų skaičius buvo vertinamas pagal Horzul ir kt. (2014) aprašytą metodiką [305]. Nuotraukų redagavimui ir fokolinių adhezijų skaičiavimui naudota *ImageJ* (1.8.0_112) programa.

2.2.9. Ląstelių proliferacijos tyrimas DAPI metodu

Ląstelių proliferacija vertinta dviem metodais – MTT ir DAPI. MTT metodais aprašytas 2.2.5 dalyje. DAPI metodo, paremto stechiometrinio DAPI dažo ir DNR sąveikos vertinimu, adaptavimas 2.5D ir 3D aplinkai, buvo šio darbo vienas iš uždavinių. Detaliau šis metodas aprašomas 3.1 dalyje. Siekiant įvertinti ląstelių skaičių DAPI metodu, ląstelės buvo išsėjamos į plokšteles arba ant tiriamųjų paviršių ir auginamos 5 dienas, periodiškai pakeičiant MT. Tiriamaisiais laiko tarpais, ląstelės augančios ant tiriamųjų paviršių – struktūrų buvo du kartus praplaunamos FBT ir perkeliamos į -20 °C šaldiklį 1 val. arba iki kitos dienos. Po inkubacijos šaldiklyje ląstelės buvo lizuojamos 0,02 % NDS paruoštame natrio citrato buferinis tirpale (NCBT), 30 min, 37 °C purtant 300 RPM greičiu. Reikalingas ląstelių lizės buferinio tirpalo kiekis priklauso nuo tiriamojo paviršiaus ploto bei ląstelių skaičiaus. Auginant ląsteles 24 duobučių plokštelėje ląstelėms lizuoti naudota 400 µl lizės buferinio tirpalo. Toliau 100 µl ląstelių lizato ir 100 µl 4 µg/ml DAPI fluorescencinio dažo, paruošto NCBT, buvo sumaišoma ir inkubuojama 30 min, 37 °C temperatūroje, tamsoje. Po inkubacijos, lizatuose buvusių ląstelių DNR kiekis išmatuojamas plokštelių skaitytuvu *Varioskan Flash* (*Thermo Scientific*) fluorescencijos metodu, naudojant 360 nm sužadinimo bangos ilgį ir matuojant emisiją ties 460 nm. Tiriamųjų mėginių vertinimui naudojamos tų pačių ląstelių kalibracinės kreivės.

2.2.10. Ląstelių baltymų raiškos ir fosforilavimo tyrimai

2.2.10.1. Ląstelių lizavimas

Paruošta ląstelių suspensija išsėjama į 6 ar 12 duobučių plokšteles, ląstelių auginimo flakonėlius arba ant tiriamųjų paviršių. Po 24 val.

pakeičiama ląstelių MT, nustatytais laiko momentais pridedamas reikiamas kiekis tiriamųjų medžiagų. Eksperimento pabaigoje nupilama MT ir ant ląstelių monosluoksniu užpilamas reikiamas kiekis lizės buferinio tirpalo (10 mM TrisHCl, pH 7,4; 50 mM NaCl; 5mM NaF; 0,1 % BSA; 1 % Triton X-100, 20 µg/ml aprotinino, 1 mM PMSF, 2 mM Na3VO4) (10⁶ ląstelių imama 1 ml lizės buferinio tirpalo). Plokštelė su ląstelėmis ir lizės buferiniu tirpalu laikoma ant ledo 20 min. Tuomet plokštelės turinys perkeliamas į atšaldytus mėgintuvėlius ir centrifuguojama 0–4 °C temperatūroje 15 min, 12 000 RCF. Supernatantas perkeliamas į naujus atšaldytus mėgintuvėlius, užšaldomas ir laikomas -20 °C arba toliau sulyginama baltymų koncentracija lizatuose.

2.2.10.2. Baltymų kiekio nustatymas Bradfordo reagentu

Šis metodas pagrįstas dažo Kumasi (angl. *Coomasie*) brilliantinio mėlio specifine sąveika su baltymų arginino ir aromatinėmis aminorūgštimis bei susidariusio komplekso spektrofotometriniais koncentracijos matavimais 596 nm bangos ilgyje. Į pasiruoštus mėgintuvėlius įpilama 1 ml vandens, 2 µl tiriamo lizato ir tuomet pridedama 300 µl Bradfordo reagento. Į kontrolinį mėgintuvėlį vietoj tiriamojo tirpalo įpilame lizės buferinio tirpalo. Gautus tirpalus po 500 µl supilstome į 24 duobučių plokštelę. Plokštelės šulinėlių absorbciją matuojame plokštelių skaitytuvu *Variokan Flash* pasirinkus 595 nm bangos ilgį. Pagal gautus rezultatus visuose mėgintuvėliuose suvienodinama baltymų koncentracija.

2.2.10.3. Baltymų denatūracija

Lizatai su sulygintomis koncentracijomis maišomi santykiu 3:1 su 4x NDS pavyzdžio buferiniu tirpalu. Baltymai denatūruojami 5 min, inkubuojant 95 °C temperatūroje. Po denatūracijos baltymai gali būti naudojami NDS poliakrilamidinių gelių elektroforezėje (NDS-PAGE) arba saugomi -20 °C.

2.2.10.4. NDS-PAGE

Ruošiamas 12 % skiriamasis gelis. 10 ml šio gelio paruošimui imama: 3 ml 40 % akrilamido (AA)/bis-akrilamido (BIS) (37.5:1); 2 ml 4x TrisHCl/NDS (289 mM TrisHCl, 0.4 % NDS) pH 8,8; 2,4 ml vandens; 58 µl 10 % amoniopersulfato (APS); 8 µl TEMED. Visi reagentai gerai išmaišomi ir polimerilizuojama poliakrilamido gelio paruošimo gardelėje. Kad poliakrilamido gelio paviršius būtų lygus, tik supylus tirpalą užsluoksniuojama izopropanolio. Jis po polimerizacijos nupilamas, o gelio paviršius plaunamas distiliuotu vandeniu.

Kai 12 % skiriamasis gelis susipolimerilizuoja, ruošiamas 4 % koncentruojamasis gelis: 5,08 ml gamybai reikia: 0,6 ml 40 % AA/BIS; 1 ml

4x TrisHCl/NDS pH = 6,8; 2,2 ml vandens; 36 µl 10 % APS ir 10 µl TEMED. Sudėjus visus reikiamus reagentus, tirpalas gerai išmaišomas. 4 % koncentruojamasis gelis užpilamas ant 12 % skiriamojo poliakrilamido gelio paviršiaus. Įdedamos “šukos”.

4 % koncentruojamajam geliui susipolimerizavus surenkamas elektroforezės aparatas, pripilama elektroforezės buferinio tirpalo (25 mM TrisBase, 0,2 M glicino, 0,5 % SDS, pH 8,3) ir atsargiai išimamos “šukos”. Į gautus “šulinėlius” įnešama 30–60 µl (priklausomai nuo gelio storio) paruoštų žinomos baltymų koncentracijos ląstelių lizatų. Įjungiamo 120 V elektros srovė. Kai bromfenolio dažas įeina į skiriamąjį gelį, srovės stiprumas gali būti padidinamas iki 130 V. Kai bromfenolio mėlio dažas priartėja prie gelio pabaigos, srovė išjungiamo.

2.2.10.5. Imunoblotingo analizė

Imunoblotingo (angl. *Western blot*) analizei naudotos polivinilidendifluoridinės (PVDF) arba nitroceliuliozinės membranos. Iškerpamas membranos gabaliukas, kurio matmenys būtų truputį didesni nei skiriamojo gelio. PVDF membraną po to patalpinama į indą su metanolio. Metanolyje membrana palaikoma apie 15 s, tada 2 min. pamerkiama į distiliuotą vandenį. Po plovimo vandeniui PVDF perkeliama į pernašos buferinį tirpalą (10 mM TrisBase (pH 8,3); 90 mM glicino, 0,05 % SDS; 10 % metanolio). Nitroceliuliozinė membrana iškart perkeliama į pernašos buferį. Vatmano popierius 15 min. pamerkiamas į pernašos buferį. Toliau vykdomas baltymų pernešimas iš skiriamojo gelio ant PVDF arba nitroceliuliozinės membranos. Tuo tikslu ant pernašos aparato dedami 3 sluoksniai vatmano popieriaus (išmirkyto pernašos buferyje), membrana, gelis ir vėl 3 sluoksniai vatmano popieriaus (išmirkyto pernašos buferyje). Pašalinami oro burbulai ir paleidžiama srovė. Pusiausausos pernašos atveju elektros srovės stipris yra 5 mA/cm². Pernešimas vyksta 20–60 min. priklausomai nuo gelio storio.

Po pernešimo membrana yra pamerkiama į blokavimo tirpalą (150 mM NaCl; 10 mM TrisHCl, pH 7,5; 0,05 % Tween 20, 1–5 % neriebaus pieno miltelių arba BSA). Jame laikoma 1 val. Po to membrana dedama į mažo tūrio polietileninį maišelį, kuriame inkubuojama su pirminiu antikūnu. Inkubacija trunka apie 18 val. Po pirmos inkubacijos membrana plaunama plovimo tirpalu (150 mM NaCl; 10 mM TrisHCl, pH 7,5; 0,05 % Tween 20) 3 kartus po 5 min. Tada ant membranos užpilami antriniai antikūnai. Su jais inkubuojama 1 val. kambario temperatūroje maišant. Po antrosios inkubacijos membrana vėl plaunama plovimo tirpalu 3 kartus po 5 min. Imunoblotingo reakcija išryškinama užpylus krienų peroksidazės chemiliuminiscencijos

substrato. Šviečiančios baltymų juostelės nufotografuojamos transiluminatoriuje *ChemiDoc* (BioRad). Gautos nuotraukos analizuojamos *ImageJ* programine įranga. Kaip užnešimo kontrolė buvo naudotas GAPDH baltymas.

2.2.11. MAP kinazių vaidmens tyrimai

Ląstelės išsėjamos į plokšteles ar ant tiriamųjų paviršių. Po 24 val. ląstelių MT pakeičiama šviežia ir į duobutes pridedami atitinkamų MAP kinazių slopikliai. Siekiant įvertinti JNK vaidmenį DMKL į duobutę įpilama 30 μ M SP600125, p38 – 30 μ M SB203580, ERK – 10 μ M PD098059 (visi slopikliai skiedžiami DMSO) ir inkubuojama 30 min. Vėžinėms MCF-7 linijos ląstelėms naudotos kitos slopiklių koncentracijos – 40 μ M SP600125, 30 μ M SB203580 ir 0,4 μ M PD98059. Po pusvalandžio pridedami atitinkami poveikiai, į kuriuos atsakant galimai dalyvauja tiriamosios MAP kinazės. Ląstelių skaičiaus pokytis (kartais lyginat atskaitinę kontrolę), įvertinamas MTT metodu aprašytu 2.2.5 dalyje.

2.2.12. Kontroliuojamo kietumo poliakrilamidinių gelių gamyba

Šiame darbe buvo naudoti trijų skirtingų kietumų poliakrilamidiniai hidrogeliai – 1, 8 ir 40 kPa. Jų gamyba atlikta pagal Tse ir Engler aprašytą metodiką [306]. Trumpai, hidrogeliai buvo gaminami ant apvalių 22 mm skersmens dengiamųjų stikliukų. Jų paviršius iš pradžių buvo nuplaunamas distiliuotu vandeniu. Po to stikliukai dedami ant kaitrinės elektrinės plytelės ir ant kiekvieno stikliuko paviršiaus užpilama po 990 μ l 0,033 N natrio šarmo. Plytelė nustatoma ant vidutinio stiprumo kaitinimo, kad temperatūra nepasiektų šarmo virimo temperatūros. Visiškai išgaravus vandeniui, susidaro natrio šarmo plėvelė. Ant jos traukos spintoje užpilama 120 μ l 2 % 3-aminopropiltrimetoksisilano (APTES) ir leidžiama jam 5 min. reaguoti su paviršiumi. Vėliau stikliukai labai kruopščiai plaunami dejonizuotu vandeniu ir tuomet panardinami į 0,5 % glualdehido tirpalą, inkubuojama 30 min. Labai svarbu, kad inkubacijos metu greta esantys stikliukai „neužliptų“ ant padengtų paviršių. Tada stikliukai dar kartą kruopščiai praplaunami vandeniu ir paliekami išdžiūti. Hidrogelių sintezei taip pat pasiruošiami kvadratiniai 22 mm stikliukai, kurių paviršius padengiamas hidrofobiniu junginiu dichlormetilksilanu (CMS). Ant apvalių stikliukų hidrofilinių paviršių pilama atitinkamos sudėties poliakrilamidinių gelių tirpalai – AA ir BIS mišiniai, 40 kPa gelio gamybai imant 8 % AA ir 0,48 % BIS, 8 kPa – 5 % AA ir 0,225 % BIS, o 1 kPa – 5 % AA ir 0,03 % BIS, kurie sumaišomi su 1/1000 tūriu

TEMED ir 1/100 tūrio 10 % APS. 22 mm diametro stikliukams reikia 35 μ l atitinkamų kietumų AA/BIS tirpalų. Hidrogelis ant apvalių stikliukų suformuojamas jį uždengus hidrofobiniu kvadratinio stikliuku. Reakcija vykdoma drėgnoje aplinkoje, 37 °C temperatūroje 1 val. Tada, kvadratinis stikliukas atsargiai nuimamas ir apvalūs stikliukai su susintetintais hidrogeliais perkeliama į sterilias plokšteles ir 3 kartus po 15 min. plaunami FBT. Tuomet FBT kruopščiai nusiurbiamas ir ant gelių užpilama po 300 μ l Sulpho-SANPAH tirpalo ir stikliukai laikomi po UVC lempa 40 min. Tada stikliukai tris kartus tamsoje praplaunami FBT ir užpilami po 1 ml I tipo kolageno tirpalu (0,2 mg/ml) ir paliekami tamsoje, 37 °C temperatūroje bent 18-ai valandų. Kitą dieną stikliukai paskutinius tris kartus praplaunami FBT ir laikomi 4 °C iki eksperimento.

2.2.13. Poliakrilamidinių gelių kietumo matavimas AJM

Prieš atliekant gelių kietumo matavimą atominės jėgos mikroskopu (AJM), sistema buvo sukalibruota naudojant žinomo kietumo komercinius poliakrilamidinius hidrogeles (*Matrigen Softview*). Visi įspaudimo eksperimentai buvo atlikti su *DimensionIcon* (*Brüker*) AJM sistema. Kiekvienam bandiniui buvo atliekama po 12–25 įspaudimų. Visi matavimai atlikti FBT, KT. Kiekvienas matavimas buvo atliekamas įspaudžiant iki 3 μ m įdubimą, tam naudojant 10–50 nN jėgą. Įspaudimo ilgis (*Z-range*) buvo parenkamas kiekvienam bandiniui individualiai. Matavimams naudotos *ScanAsysFluid* (0,7 N/m spyruoklės konstanta) ir SNL-C (0,24 N/m spyruoklės konstanta). Kiekvieno matavimo metu (matavimo greitis 0,5 – 1 Hz (6-12 μ m/s)) buvo gautos prispaudimo ir atitraukimo kreivės, iš kurių buvo apskaičiuoti gelių Jungo moduliai.

2.2.14. 2,5D ir 3D karkasų gamyba

Karkasai buvo suprojektuoti naudojant *Fusion 360* (*Autodesk*) braižymo programinę įrangą. Buvo suprojektuoti dviejų tipų karkasai: vagoti ir porėti. Porėti buvo suformuoti iš 400 μ m gijų išdėstytų kas 400 μ m. Tarp sluoksnių suformuojamas 90 laipsnių kampas. Karkasų išmatavimai 10 mm x 10 mm x 1,6 mm. Vagoti karkasai buvo pagaminti naudojančią statų stačiakampio gretasienio struktūrą, kurio kraštinės 100mm x 20 mm x 0,8 mm. Vagos karkase suformuojamos spausdinimo metu. Gauta plokštelė sukarpona į 10 mm x 10 mm kvadratus. Karkasai spausdinti naudojant *Monoprice MP Select Mini 3D Printer V2* (*Monoprice*) 3D spausdintuvą. Karkasai pagaminti iš gryno PLA 1,75 mm diametro filamentu (*Monoprice Premium 3D Printer*

Filament PLA 1.75mm 1kg/spool, Crystal Clear). Karkasai spausdinti 220 °C temperatūroje, 10 mm/s greičiui, esant 60 °C pagrindo temperatūrai. Spausdintuvo galva turėjo 0.4 mm diametro adatą.

2.2.15. Statistinė analizė

Duomenų statistinei analizei naudota R statistikos programa (RStudio 4.0.3). Duomenys grafikuose pateikti kaip mediana $\pm$ tarpkvartilinis regionas, vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis (SN) arba kitokiais parametrais, nurodytais po grafiku. Visi darbe pateikti rezultatai yra gauti bent iš trijų nepriklausomų eksperimentų (bent trys pakartojimai kiekvienoje grupėje), išskyrus *imunoblotingo* analizę. *Shapiro-Wilk* testas buvo naudotas patikrinti duomenų normalumą (kai $n \geq 5$), o tais atvejais, kai $n < 5$, duomenys buvo laikomi normaliai pasiskirstę. Kadangi, visi eksperimentiniai duomenys buvo pasiskirstę pagal normalųjų skirstinį, statistiškai reikšmingi skirtumai tarp dviejų grupių nustatyti t-testu, tarp trijų ir daugiau grupių – vieno faktoriaus dispersine analize (ANOVA), kartu su Tukey-HSD *post hoc* kriterijumi. Kalibracinių kreivių koeficientui apskaičiuoti naudoti linijiniai regresiniai modeliai, kurie grafikuose pavaizduoti pilku plotu, žymi 95 % pasikliaujamą modelio intervalą. Atitikimo koeficientas (*Goodness of fit*) buvo gautas skaičiuojant determinacijos koeficientą R^2 . Duomenys buvo laikomi statistiškai reikšmingai besiskiriantys, kai p reikšmė $< 0,05$. Statistiškai reikšmingi skirtumai grafikuose pažymėti *: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ ir *** - $p < 0,001$, tuo atveju, jei naudojamas kitoks žymėjimas, jis aprašytas po grafiku. Visi grafikai nubraižyti su ggplot2 biblioteka, iliustracijos padarytas naudojant GIMP (2.10.24), nuotraukų analizei naudota *ImageJ* (1.53j) programa.

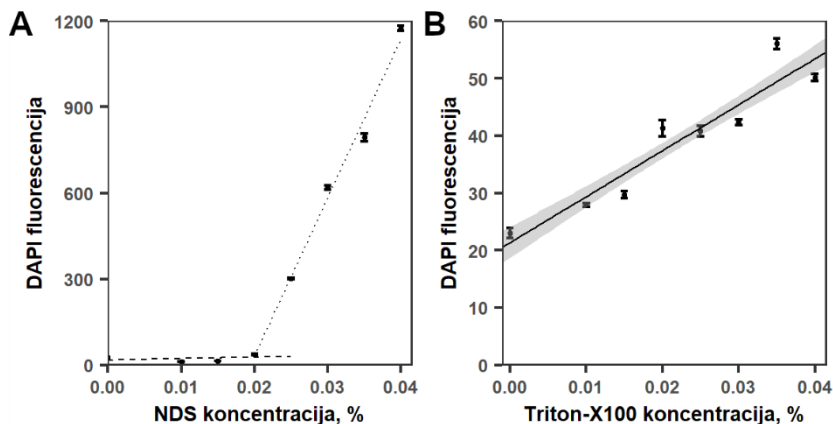
3. REZULTATAI

3.1. Metodo, ląstelių skaičiaus vertinimui 2D ir 3D aplinkose, sukūrimas

Šiuo metu yra sukurta labai platus spektras metodų skirtų sekti ląstelių skaičiaus pokyčius 2D aplinkoje. Tačiau ląsteles ši aplinka veikia visiškai kitaip nei 2,5D ar 3D. Aplinka daro įtaką ląstelėms, nuo jos priklauso jų metabolizmas, proteomas, DNR metilinimas ir kt. Dėl šių priežasčių įprasti 2D aplinkose taikomi metodai daugeliu atveju nėra tinkami siekiant tiksliai įvertinti ląstelių skaičiui jas auginant 2,5D ar 3D, o tai yra labai svarbu vykdant audinių inžinerijos, vėžio ir kamieninių ląstelių tyrimus. Tikslus ląstelių skaičius yra labai svarbus sistemos parametras, leidžiantis įvertinti įvairius procesus vykstančius ląstelėse. Dėl to, vienas pirmųjų šio tyrimo uždavinių buvo sukurti metodą ląstelių skaičiaus įvertinimui 2D, 2,5D bei 3D aplinkose. Sukurtas metodas yra paremtas DNR-DAPI sąveika.

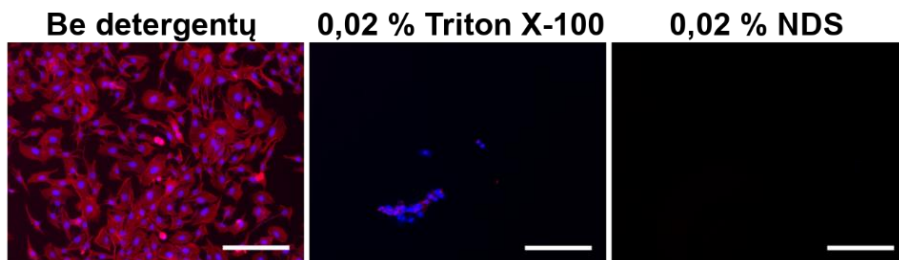
3.1.1. Ląstelių lizės buferinių tirpalų efektyvumo vertinimas

Ląstelių lizavimui buvo pasirinkti du pagrindiniai plačiai naudojami detergentai – natrio dodecilsulfatas (NDS) ir Triton-X100. NDS yra joninis detergentas, o Triton-X100 – nejoninis. Iš pradžių buvo įvertinta šių detergentų įtaka DAPI fluorescencijai. Natrio citrato buferiniame tirpale (NCBT), kurio pH 7,2, buvo paruoštos įvairios detergentų koncentracijos: 0,01; 0,015; 0,02; 0,025; 0,03; 0,035 ir 0,04 % bei įvertintas jų poveikis 2 µg/ml koncentracijos DAPI dažo fluorescencijos signalui (3.1 pav. A ir B). Triton-X100, nejoninio detergento, koncentracijai didėjant, DAPI fluorescencija taip pat didėjo ir šis procesas buvo tiesinis (3.1 pav. B), tuo tarpu joninio detergento NDS atveju, šis procesas nebuvo tiesinis visuose tirčiuose šio detergento koncentracijų režimuose. Didėjant NDS koncentracijai ląstelių lizės buferiniame tirpale nuo 0,01 % iki 0,02 % bei nuo 0,02 % iki 0,04 %, 2 µg/ml DAPI fluorescencija turėjo dvi skirtingas tiesines priklausomybes. Esant mažoms koncentracijoms, DAPI fluorescencija kito lėtai didėjant NDS koncentracijai, tačiau nuo 0,02 % nedidelis NDS koncentracijos pokytis turėjo labai didelę įtaką DAPI fluorescencijai. Atsižvelgiant į tai, kad Triton-X100 visame tirtame intervale parodė tiesinę priklausomybę, jis yra tinkamas ląstelių lizei naudojant visas tirtas koncentracijas, tuo tarpu NDS detergento atveju, ląstelių lizės buferiniams tirpalams yra tinkamos tik mažesnės nei 0,02 % NDS detergento koncentracijos.



3.1 pav. NDS ir Triton-X100 ląstelių lizės buferinių tirpalų koncentracijų įtakos DAPI fluorescencijai vertinimas. A – NDS ląstelių lizės buferinių tirpalų koncentracijų įtaka 2 $\mu\text{g/ml}$ DAPI fluorescencijai. **B** – Triton-X100 ląstelių lizės buferinių tirpalų koncentracijų įtaka 2 $\mu\text{g/ml}$ DAPI fluorescencijai. Duomenys pavaizduoti taškiniais grafikais: taškai – vidurkiai, paklaidos – SN, punktyrinė ir ištisinė linija rodo tiesinę priklausomybę tarp didėjančios lizės buferinio tirpalo koncentracijos ir DAPI fluorescencijos. Pilkas fonas žymi 95 % linijinio regresinio modelio pasikliaujamumo intervalą.

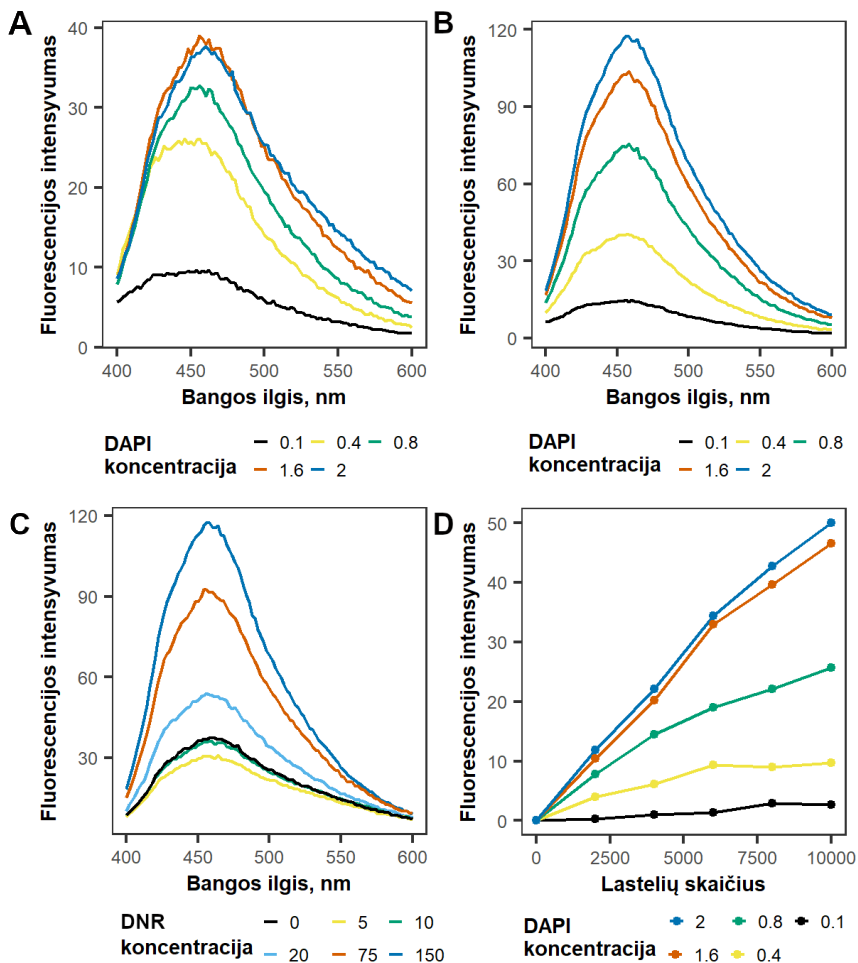
Didžioji dalis ląstelėje esančios DNR sukauptabranduolyje, todėl toliau buvo vertinta, kaip joninis NDS ir nejoninis Triton-X100 detergentai geba lizuoti ląsteles bei jų branduolius (3.2 pav.). Citocheminė analizė parodė, kad 0,02 % NDS lizės buferinis tirpalas yra efektyvesnis už tokios pat koncentracijos Triton-X100 ląstelių lizės buferinį tirpalą. 0,02 % NDS ištirpino visas ląstelių struktūras, tuo tarpu 0,02 % Triton-X100 efektyviai ištirpino tik ląstelių citoskeletą, tačiau nesugebėjo sulizuoti ląstelių branduolių, kurie buvo matomi nudažius juos DAPI fluorescenciniu dažu. Padidinus Triton-X100 koncentraciją iki 0,04 %, jis kaip ir joninis 0,02 % NDS detergentas efektyviai sulizavo visas ląstelės vidines struktūras (duomenys nepateikiami). Tačiau, 0,04 % Triton-X100 nejoninis detergentas sukuria didesni foninį DAPI signalą, nei 0,02 % NDS ląstelių lizės buferinis tirpalas: atitinkamai ~50 ir ~37 fluorescencijos intensyvumo vienetų (FIV), todėl tolimesniems darbams buvo pasirinktas 0,02 % NDS lizės buferinis tirpalas, paruoštas NCBT, kurio pH 7,2.



3.2 pav. DPKL lizavimas 0,02 % NDS ir 0,02 % Triton-X100 detergentus turinčiais ląstelių lizės buferiniais tirpalais. Raudona spalva – aktino filamentai, mėlyna – ląstelių branduoliai. Mastelis - 200 μ m.

3.1.2. Darbinių DAPI koncentracijų nustatymas

Išsirinkus optimalų ląstelių lizės buferinį tirpalą, toliau buvo optimizuojamos naudotinos DAPI koncentracijos. Šiuo tikslu, NDS 0,01 % lizės buferiniame tirpale buvo paruoštos įvairios DAPI dažo koncentracijos: 0,1; 0,4; 0,8; 1,6 ir 2 μ g/ml. Vėliau buvo nustatyti šių mėginių fluorescencijos spektrai sužadinimui naudojant nuo 400 iki 600 nm bangos ilgį, matuojant mėginius be DNR ir pridėjus 150 ng/ml DNR (3.3 pav. A ir B). Gauti duomenys parodė, kad DAPI fluorescencijos signalas kito logaritmine priklausomybe didėjant DAPI koncentracijai. Pridėjus 150 ng/ml DNR, DAPI fluorescencijos signalas tapo intensyvesnis, tačiau, kaip ir mėginiuose be DNR, signalo stiprumas kito logaritmine priklausomybe didėjant DAPI koncentracijai.



3.3 pav. Optimalios DAPI dažo koncentracijos nustatymas. **A** – DAPI foninis fluorescencijos signalas esant 0,1; 0,4; 0,8; 1,6 ir 2 $\mu\text{g/ml}$ DAPI koncentracijai 0,01 % NDS detergento turinčiame lizės buferiniame tirpale, **B** – esant 150 ng/ml DNR koncentracijai. **C** - DNR koncentracijos įtaka 2 $\mu\text{g/ml}$ DAPI dažo fluorescencijai. Matavimams buvo naudotos 5, 10, 20, 75 ir 150 ng/ml DNR koncentracijos. **D** – skirtingų koncentracijų (0,1; 0,4; 0,8; 1,6 ir 2 $\mu\text{g/ml}$) DAPI dažo fluorescencijos signalo įvertinimas, matuojant skirtingą kiekį ląstelių turinčius 0,01 % NDS lizatus.

3.1.3. DAPI fluorescencijos signalo priklausomybė nuo ląstelių skaičiaus

Toliau įvertinome, kaip kinta 2 $\mu\text{g/ml}$ DAPI fluorescencija priklausomai nuo DNR kiekio lizate. 0,01 % NDS, paruošto NCBT, pH 7,2, buvo ištirpinta 5, 10, 20, 75 bei 150 ng/ml DNR ir nustatyti šių tirpalų fluorescencijos spektrai matuojant nuo 400 iki 600 nm (3.3 pav. C). Įvertinus DAPI fluorescenciją esant mažoms DNR koncentracijomis, nustatytas nelineinis signalo stiprumo ir DNR koncentracijos ryšys. Pridėjus 5 ng/ml

DNR, DAPI fluorescencijos signalas buvo mažesnis nei matuojant tirpalą be DNR, o, 10 ng/ml DNR koncentracija parodė tokį patį signalą, kaip ir DNR neturintis tirpalas. Tačiau didesnių DNR koncentracijų atveju buvo nustatytas tendencingas fluorescencijos intensyvumo didėjimas didėjant DNR koncentracijai.

Kitas žingsnis buvo įvertinti, kaip kinta DAPI fluorescencijos signalas naudojant vėžinių ląstelių MH-22a, įvairių koncentracijų ląstelių lizatus paruoštus 0,02 % NDS lizės buferiniame tirpale, kiekvienu atveju atitinkamai imant 2000, 4000, 8000 ir 10000 ląstelių. Įvertinti šių mėginių fluorescencijos signalai naudojant 0,1; 0,4; 0,8; 1,6 ir 2 $\mu\text{g/ml}$ DAPI koncentracijas (3.3 pav. D). Gauti rezultatai parodė, kad tiek didėjant ląstelių skaičiui, tiek didėjant DAPI koncentracijai, signalo stiprumas taip pat didėjo. Be to, vertinant ribose nuo 2000 iki 10000 ląstelių buvo stebėta tiesinė signalo stiprumo priklausomybė esant skirtingoms DAPI koncentracijoms, tačiau pastebėta, kad DAPI kiekis tiesiogiai lemia signalo stiprumą. Tolimesniems darbams pasirinkta 2 $\mu\text{g/ml}$ DAPI koncentracija.

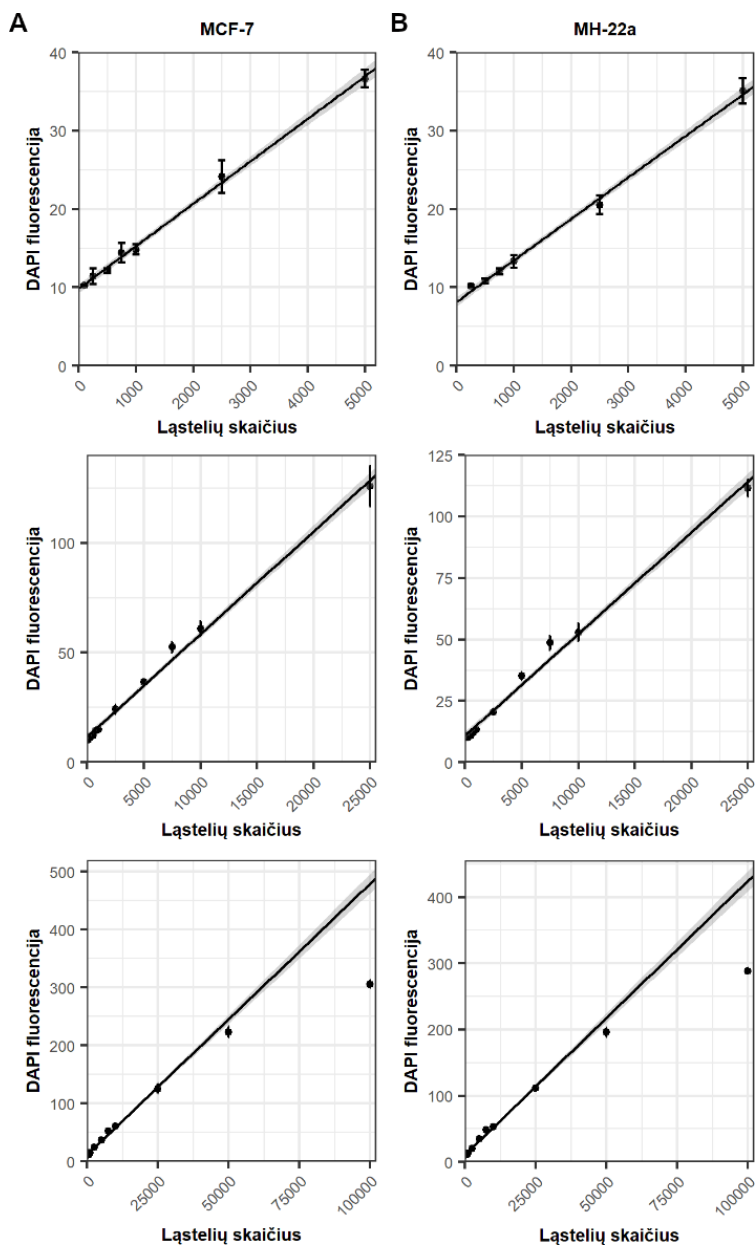
Siekiant įvertinti šio metodo efektyvumą, toliau buvo tiriamas dviejų vėžinių ląstelių linijų: MCF-7 ir MH-22a, bei dviejų kamieninių ląstelių linijų: Swiss 3T3 ir DPKL, ląstelių skaičius. Naudoti labai platūs ląstelių kiekių režiai: 100, 250, 500, 750, 1000, 2500, 5000, 7500, 10000, 25000, 50000 ir 100000 ląstelių (MH-22a ir Swiss 3T3 naudota nuo 250 iki 100000 ląst.) (3.4 pav. A ir B, 3.5 pav. A ir B). Ląstelių lizatai, paruošti 0,02 % NDS, buvo maišomi santykiu 1:1 su 4 $\mu\text{g/ml}$ DAPI tirpalu taip pat paruoštu NSBT, kurio 7,2 pH. Galutinė NDS koncentracija lizatuose buvo 0,01 %, DAPI – 2 $\mu\text{g/ml}$. DAPI fluorescencija buvo sužadinta 360 nm bangos ilgio šviesa, o fluorescencijos intensyvumas matuotas ties 460 nm bangos ilgiu. Visų tirtų linijų ląstelių atvejais nustatytos tiesinės priklausomybės tarp ląstelių skaičiaus ir DAPI 2 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijos, tačiau šis efektas buvo stebimas ne visame tiriamajame intervale. Vėžinių ląstelių ir DPKL DAPI fluorescencijos priklausomybė nuo ląstelių skaičiaus išliko tiesinė iki 25 000 ląstelių, o didesnėse ląstelių koncentracijose nustatyti netiesiniai procesai. Tuo tarpu, tiriant Swiss 3T3 kamieninių ląstelių skaičiaus ir DAPI fluorescencijos intensyvumo ryšį, tiesinė priklausomybė buvo registruojama visame tirtame intervale. Ląstelių linijiniai regresijos modeliai pateikti 4 lentelėje. Vėžinės ląstelės MCF-7 ir MH-22a (3.4 pav. A ir B) pasižymėjo gerokai stipresniu DAPI fluorescencijos signalu, lyginant su kamieninėmis ląstelėmis (3.5 pav. A ir B). 100000 vėžinių ląstelių DAPI fluorescencijos signalas buvo 306 ir 288 FIV, o Swiss 3T3 ir DPKL, atitinkamai, 216 ir 139 FIV.

Linijiniai regresijos modeliai parodė, kad šis metodas, naudojantis DAPI fluorescencinio dažo savybę – ženkliai padidinti jo fluorescenciją jam susirišus su DNR, yra maždaug dvigubai jautresnis su vėžinėmis ląstelėmis, nei su tirtomis kamieninėmis ląstelėmis. Linijinių modelių k koeficientas MCF-7 ir MH-22a – 0,0047 ir 0,0041, o Swiss 3T3 ir DPSC kamieninių ląstelių – 0,0021 ir 0,0026 atitinkamai. Visi gauti modeliai ląstelių skaičiaus intervale nuo 250 iki 25000 parodė labai stiprią tiesinę priklausomybę, koreliacijos koeficientas visų tirtų ląstelių buvo didesnis nei 0,98.

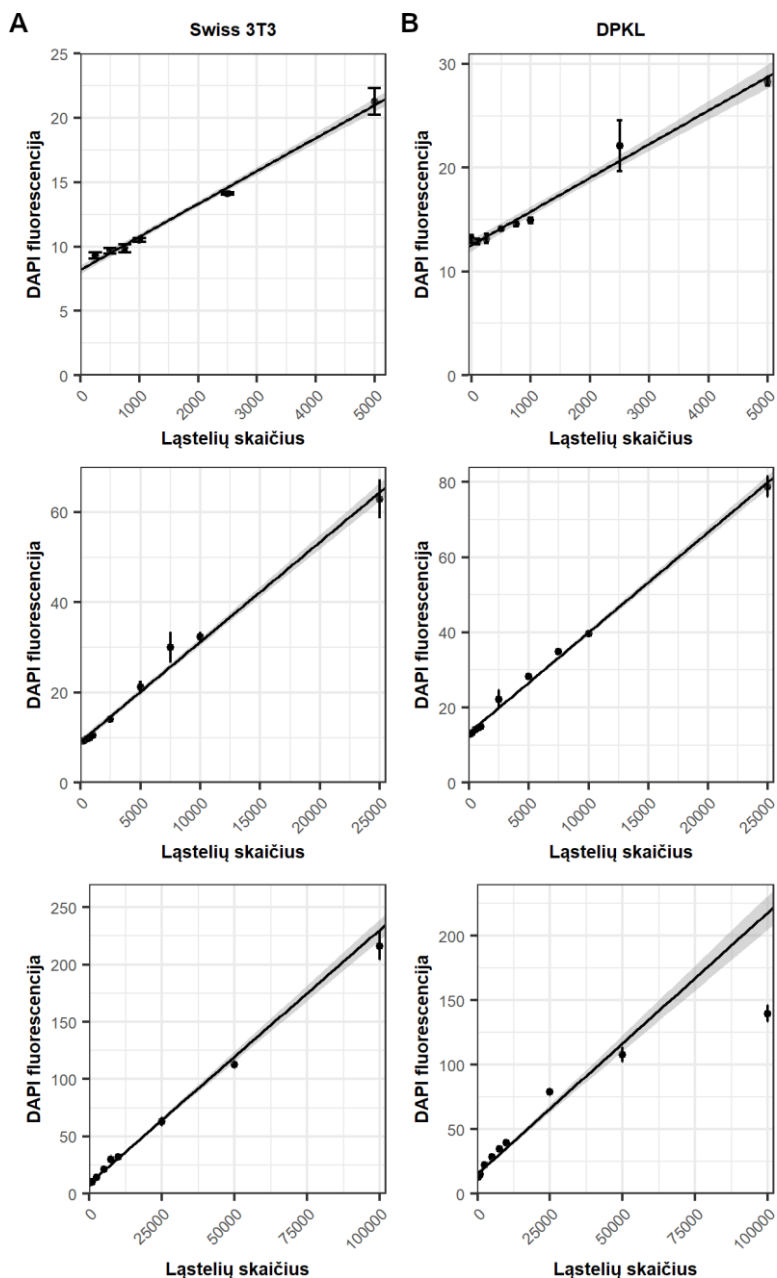
4 lentelė. Vėžinių ir kamieninių ląstelių linijiniai modeliai aprašantys DAPI fluorescencijos priklausomybę nuo ląstelių skaičiaus. Modelis sudarytas naudojant DAPI fluorescencijos signalo duomenis gautus 250–25000 ląstelių intervale. Tiesės lygties koeficientai k ir b , nurodo tiesės kampą ir kryptį (signalų priklausomybės stiprumą nuo ląstelių skaičiaus) bei foninį signalą (nesant DNR) atitinkamai. R^2 – koreliacijos koeficientas.

Ląstelių linija	k	b	R^2
MCF-7	0,0047	11,6	0,988
MH-22a	0,0041	10,9	0,988
Swiss 3T3	0,0021	9,1	0,986
DPKL	0,0026	13,6	0,996

Kadangi metodui yra reikalinga kalibracinė kreivė, darbo pradžio svarbu nustatyti, kokiam ląstelių koncentracijos intervale DAPI fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo ląstelių skaičiaus kinta tiesiškai. Tuomet, išsėjus ląsteles ant tiriamųjų paviršių ar struktūrų, galima sėti ląsteles ir atlikti jų skaičiaus vertinimą. Svarbu, kad ląstelių skaičius tiriamajame mėginyje nebūtų mažesnis nei kalibracinės kreivės sudaryti naudotos ląstelių koncentracijos. Turint ląstelių koncentraciją, kuri yra už kalibracinės maksimalią naudotą koncentraciją, arba netiesinėje kreivės dalyje, reikia atlikti ląstelių lizato skiedimus, naudojant ląstelių lizės buferinį tirpalą. Ląstelių skaičius apskaičiuojamas pagal prieš eksperimentą gautą kalibracinę kreivę.



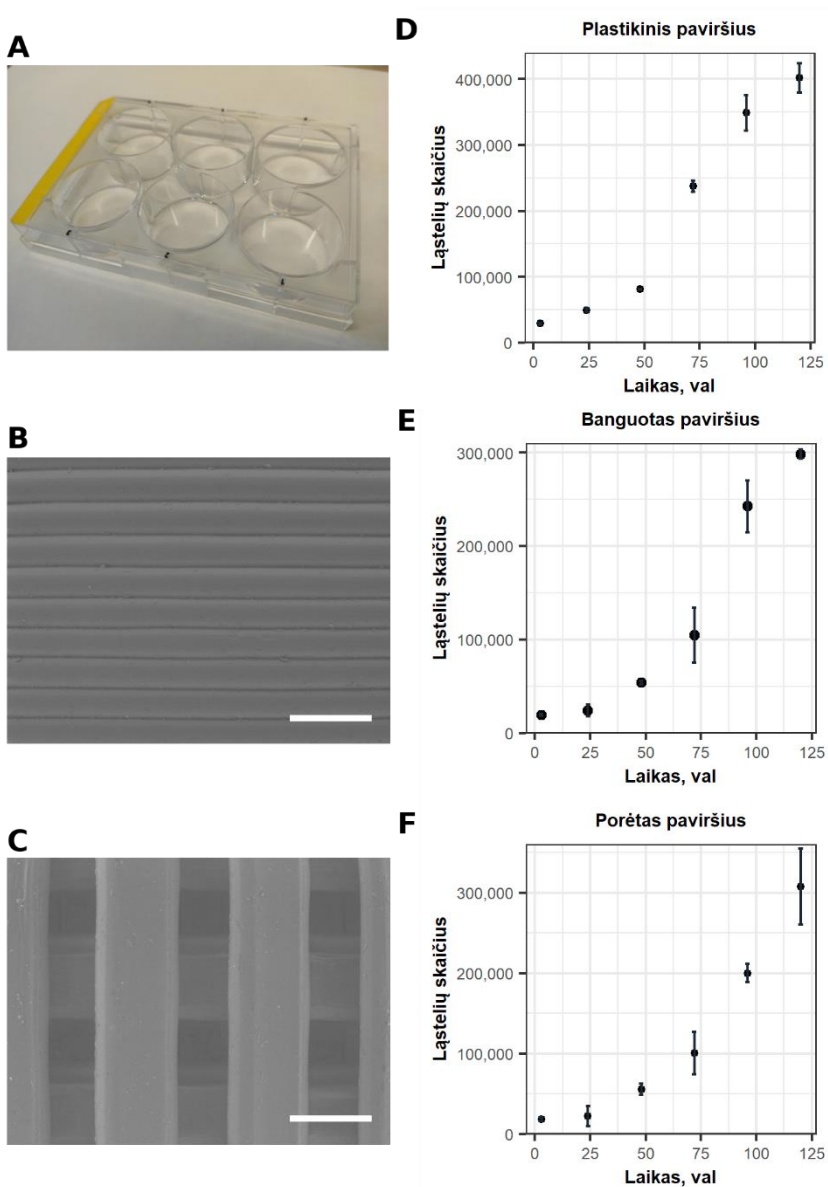
3.4 pav. DAPI fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo vėžinių ląstelių skaičiaus. **A** – žmogaus krūties vėžinių ląstelių linijos MCF-7 skaičiaus įtaka DAPI fluorescencijos signalo intensyvumui. **B** – pelės hepatomos ląstelių linijos MH-22a skaičiaus įtaka DAPI fluorescencijos signalo intensyvumui. Skirtingas kiekis tiriamų ląstelių buvo sulizuotas 0,02 % NDS ląstelių lizės buferiu ir sumaišytas santykiu 1:1 su 4 µg/ml koncentracijos DAPI tirpalu. Taškai žymi DAPI fluorescencijos intensyvumovidurkį, paklaidos – SN. Linija – tiesinis regresijos modelis, o pilkas fonas 95 % modelio pasikliaujamumo intervalas.



3.5 pav. DAPI fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo kamieninių ląstelių skaičiaus. **A** – pelės embrioninių fibroblastų linija Swiss 3T3 skaičiaus įtaka DAPI fluorescencijos signalo intensyvumui. **B** – pirminių žiurkės DPKL skaičiaus įtaka DAPI fluorescencijos signalo intensyvumui. Skirtingas kiekis tiriamų ląstelių buvo sulizuotas 0,02 % NDS ląstelės lizės buferiu ir sumaišytas santykiu 1:1 su 4 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijos DAPI tirpalu. Taškai žymi DAPI fluorescencijos intensyvumo vidurkį, paklaidos – SN. Linija – tiesinis regresijos modelis, o pilkas fonas 95 % modelio pasikliaujamumo intervalas.

3.1.4. Ląstelių skaičiaus vertinimas 2D, 2,5D ir 3D aplinkose

Galiausiai įvertinome metodo tinkamumą ląstelių skaičiaus vertinimui ne tik 2D, bet ir 2,5D bei 3D aplinkose. 2D aplinkai sukurti naudojome standartines polistirenines ląstelių auginimo plokšteles (3.6 pav. A). 2,5D aplinkai sukurti buvo naudojami 3D spausdintuvu spausdinti banguoti karkasai, kurie buvo sudaryti iš 188 μm pločio susiliejančių gijų (3.6 pav. B). 3D aplinkai sukurti taip pat buvo naudoti 3D spausdinti karkasai, tik šį kartą buvo naudota *woodpile* struktūra, sudaryta iš 400 μm pločio gijų, kurios suformuoja 400 μm poras (3.6 pav. C). Ant visų šių paviršių buvo išsėtos DPKL ir auginamos 5 dienas (3.6 pav. D–F). Po išsėjimo praėjus 3 valandoms buvo įvertintas prie paviršių prisikabinusių ląstelių skaičius. Ant polistireno paviršiaus DAPI metodu nustatytos 28756 ± 1504 prisitvirtinusios ląstelės, ant 2,5D banguoto paviršiaus – 19373 ± 1093 ląstelės ir ant porėto 3D paviršiaus – 18413 ± 2661 ląstelės. Toliau ląstelėms buvo leidžiama daugintis ir pakartotinai ląstelių skaičius ant tiriamų paviršių įvertintas praėjus penkioms dienoms. Šiuo atveju, ant kontrolinio polistireno (2D) paviršiaus buvo nustatytos 401906 ± 22135 ląstelės, ant 2,5D paviršiaus – 298411 ± 5076 ląstelės, o ant 3D paviršiaus – 307498 ± 47271 ląstelės. Šie duomenys parodė, kad DAPI metodas tinkamas ląstelių skaičiaus vertinimui ne tik 2D, bet ir 2,5D ar net 3D aplinkose.



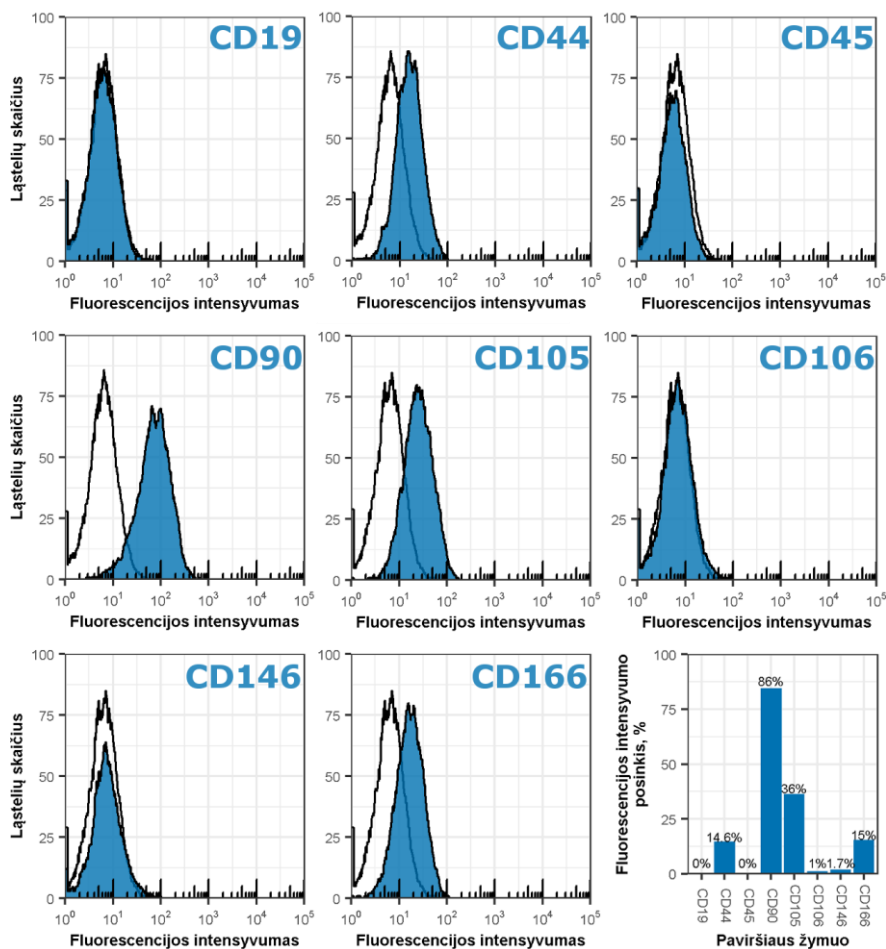
3.6 pav. DPKL proliferacijos vertinimas ant trijų skirtingų paviršių: 2D, 2,5D ir 3D. A – 2D polistireno paviršius, B – 2,5D banguotas paviršius, pagamintas 3D spausdintuvu, C – 3D porėtas karkasas, pagamintas 3D spausdintuvu. D – DPKL proliferacija auginant ląsteles ant 2D paviršiaus, E – ant 2,5D paviršiaus ir F – ant 3D paviršiaus. Taškai žymi ląstelių DNR ir DAPI generuotą fluorescencijos signalo vidurkį, paklaidos – SN. Baltos linijos elektronų skenuojančio mikroskopo nuotraukose (B ir C) žymi 500 μm atstumą.

3.2. Paviršiaus kietumo įtaka DMKL atsakui į oksidacinį stresą

MKL pasižymi aukštu diferenciacijos potencialu, imunomoduliacinėmis funkcijomis ir lėtinio oksidacinio streso slopinimu. Šios jų funkcijos yra plačiai pritaikomos ląstelių terapijos ir audinių inžinerijos srityse. Oksidacinis stresas dalyvauja įvairių ligų (diabeto, plaučių fibrozės, vėžio ir kitų) patogenezėje, o taip pat inicijuoja kamieninių ląstelių senėjimą ir žūtį, o tai neigiamai veikia ląstelių terapijos bei audinių inžinerijos efektyvumą. Nepaisant to, oksidacinio streso tyrimams vis dar skiriama per mažai dėmesio. Tiriant MKL panaudojimą dirbtinių audinių kūrimui, ląstelės yra auginamos įvairiaus kietumo aplinkose, tačiau iki šiol nėra įvertinta, kaip skirtingo kietumo aplinka veikia šių ląstelių jautrumą oksidaciniam stresui. Todėl šioje disertacijos dalyje siekėme įvertinti žmogaus dantenų mezenchimalinių kamieninių ląstelių (DMKL) atsaką į oksidacinį stresą priklausomai nuo mechaninės aplinkos savybių. Šios savybės darbe buvo moduluojamos ląsteles auginant ant skirtingo kietumo poliakrilamidinių paviršių, kurie sukuria 2,5D aplinką. Pirmoje šio darbo dalyje aprašytas, DAPI paremtas, metodas padėjo geriau suprasti mechaninės aplinkos poveikį DMKL atsakui į oksidacinį stresą.

3.2.1. DMKL charakterizavimas

Šiame darbe buvo naudotos iš 5 savanorių dantenų išskirtos pirminės DMKL (detaliau žr. 2.2.1 skyrių). Jų mezenchiminė kilmė buvo patvirtinta analizuojant šių ląstelių turimus paviršiaus žymenis tėkmės citometro pagalba (3.7 pav.). Gauti rezultatai parodė, kad tirtos dantenų kilmės ląstelės turėjo visus mezenchimalinėms kamieninėms ląstelėms būdingus paviršiaus žymenis CD44, CD90, CD105 ir CD166, išskyrus CD146 paviršiaus baltymą. Tačiau šis baltymas yra susijęs su MKL apsiprendimu diferencijuotis lygiųjų raumenų linkme. Be to, tirtos ląstelės neturėjo hematopoetinėms ląstelėms būdingų paviršiaus žymenų CD19, CD45 ir CD106.

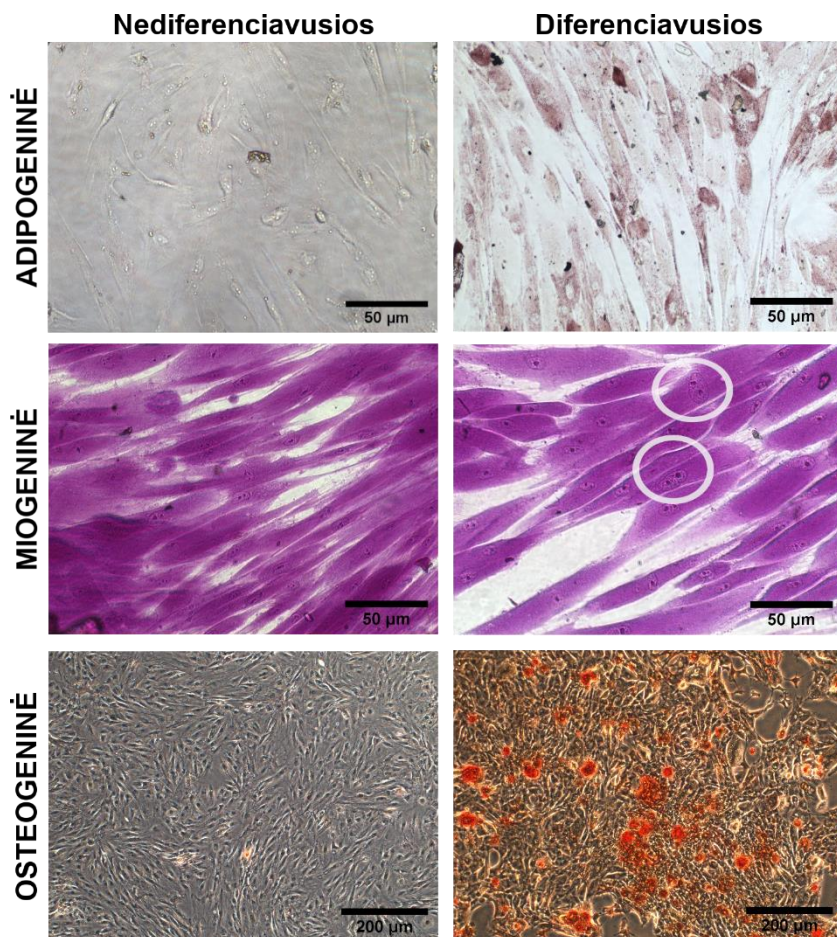


3.7 pav. DMKL paviršiaus žymenų analizė. Balta spalva – izotipinė kontrolė, mėlyna – tiriamojo paviršiaus žymens fluorescencijos intensyvumo poslinkis. Grafike apibendrinti tirtų paviršiaus žymenų fluorescencijos intensyvumo poslinkiai.

3.2.2. DMKL diferenciacijos potencialo įvertinimas

MKL būdingas platus diferenciacijos potencialas, todėl siekiant patvirtinti šią tiriamų DMKL savybę, ląstelės buvo diferencijuotos adipogenine, miogenine ir osteogenine diferenciacijos kryptimis, indukuojant ląstelių diferenciaciją specifiniais priedais (detaliau žr. 2.2.4 skyrių). Adipogenine kryptimi ląstelės buvo diferencijuotos 4 dienas, miogenine – 7 dienas, o osteogenine – 21 dieną. Iš 3.8 paveiksle pateikiamų duomenų matome, kad iš dantenų išskirtos MKL sugebėjo diferencijuoti visomis trejomis tirtomis kryptimis. Adipogeninės diferenciacijos atveju, ląstelės viduje pradėjo kaupti riebalinius lašelius, kurie buvo vizualizuoti juos nudažant *Oil Red O* dažu. Po savaitės diferenciacijos raumenine kryptimi,

ląstelės pradėjo susiliesti ir formuoti ląsteles, turinčias du branduolius – tai yra būdinga raumeninėms ląstelėms. Osteogeninė kryptimi diferencijuotos ląstelės pradėjo užląstelinio užpildo mineralizacijos procesus, kurie buvo vizualizuoti *Alizarin Red S* dažų.



3.8 pav. DMKL diferenciacijos potencialo vertinimas. DMKL buvo diferencijuotos adipogeninė, miogeninė ir osteogeninė kryptimis, atitinkamai tiriamas ląstelės 4, 7 ir 21 dienas auginant terpėje, kurioje buvo pridėta diferenciacijos induktorių. Adipogeninė diferenciacija įvertinta dažant ląstelių viduje sukauptas lipidų atsargas *Oil Red O* dažų, kuris jas nudažo raudonai. Miogeninė diferenciacija buvo vertinta nudažius vidines ląstelių struktūras kristalvioleto dažų. Miogeninė kryptimi diferencijuosioms ląstelėms būdingas daugiabranduoliškumas (pažymėta baltu apskritimu). Dažant užląstelinio užpildo mineralizacija *Alizarin Red S* dažų buvo įvertinta osteogeninė diferenciacija.

3.2.3. Poliakrilamidinių gelių kietumo vertinimas

Šiame darbe buvo naudoti trijų skirtingų kietumų poliakrilamidiniai hidrogeliai, kurių savybės atitiko minkštų, vidutinio kietumo ir kietų audinių kietumą. Jų kietumas buvo įvertintas atominės jėgos mikroskopo (AJM) pagalba (5 lentelė).

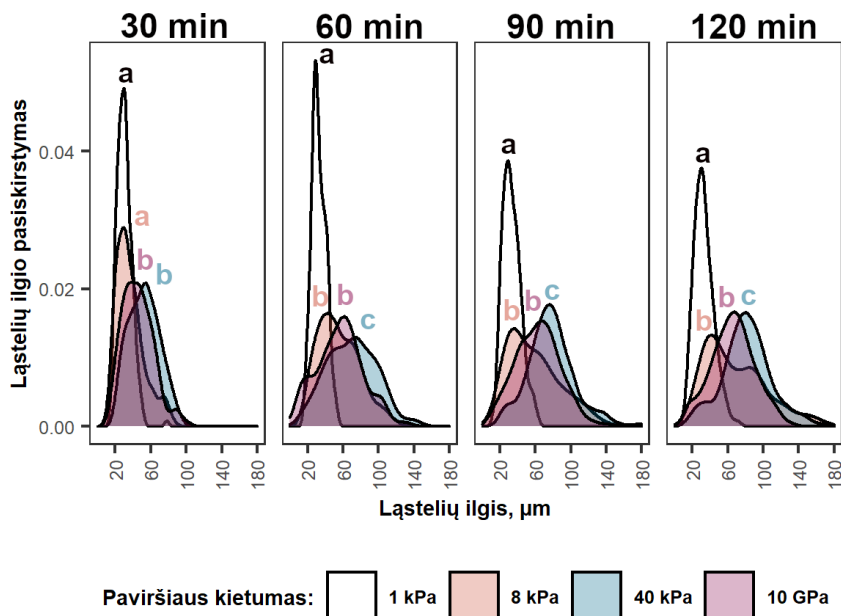
5 lentelė. Poliakrilamidinių gelių Jungo modulio matavimai AJM

Poliakrilamidinio hidrogelio tipas	Minkštas	Vidutinio kietumo	Kietas
Jungo modulis, kPa	1,08±0,55	9,20±1,87	37,65±5,47
Matavimų skaičius	39	47	53

Toliau darbe minkštus audinius atitinkantys poliakrilamidiniai hidrogeliai bus vadinami 1 kPa kietumo hidrogeliais, vidutinio kietumo – 8 kPa hidrogeliais ir kietiausiu – 40 kPa hidrogeliais. Kaip kontrolė šiame darbe naudotas standartinis ląstelių auginimo plokštelių plastiko paviršius, kurio kietumas yra apie 10 GPa. Visi tirti hidrogeliai buvo padėti I tipo kolagenu, kuris buvo naudojamas siekiant užtikrinti vienodą hidrogelių paviršiaus sąveiką su ląstelėmis.

3.2.4. DMKL adhezijos ant skirtingo kietumo paviršių kinetika

Tiriamąjį darbo pradžioje įvertinome, kaip ląstelės sąveikauja su skirtingo kietumo poliakrilamidiniais hidrogeliais. Tuo tikslu, DMKL buvo išsėtos ant tiriamųjų paviršių ir jų adhezija vertinta praėjus 30, 60, 90 ir 120 min. (3.9 pav.), matojant ląstelių ilgį. Nustatėme, kad prasčiausiai ląstelės kibo prie minkščiausiu, 1 kPa kietumo hidrogelių. Jų ilgis per 2 valandų stebėjimo laikotarpį pakito tik nuo 30 μm iki 40 μm . Tuo tarpu, DMKL ant kietiausių paviršių (40 kPa ir 10 GPa) pradėjo kibti ir plisti praėjus tik 30 min. po išsėjimo. Po valandos nuo jų išsėjimo ląstelės taip pat pradėjo kibti ir plisti ant vidutinio 8 kPa kietumo hidrogelių ir jų užimamas plotas buvo panašus kaip ir ant kietiausio (10 GPa) plastikinio paviršiaus augusių ląstelių. Geriausiai ląstelės kibo ir plito ant kietiausio hidrogelio (40 kPa), o ant vidutinio kietumo hidrogelio (8 kPa) ir kontrolinio plastiko paviršiaus (10 GPa) ląstelės elgėsi panašiai. Po 2 valandų ant pastarųjų paviršių augintos ląstelės vidutiniškai išplito nuo ~40 iki ~70 μm ilgio, o ant kietiausio hidrogelio jų ilgio vidurkis pasiekė 80 μm .



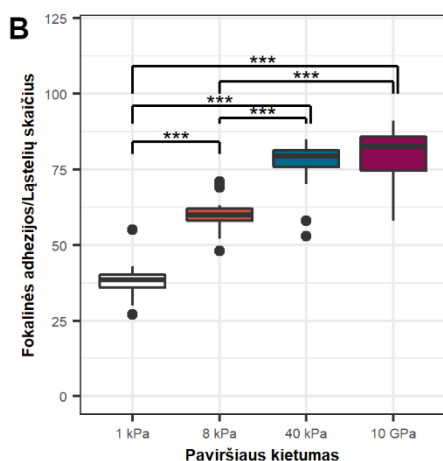
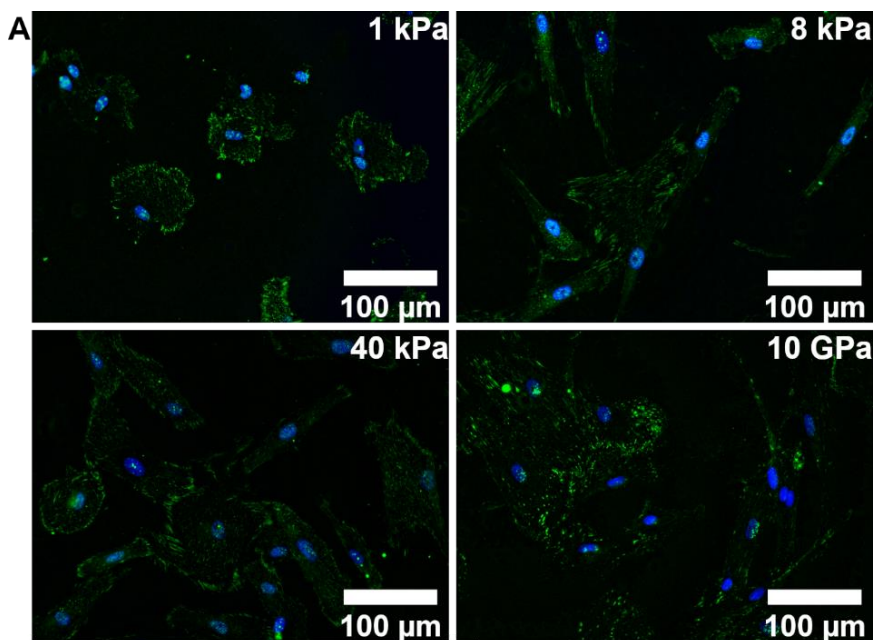
3.9 pav. DMKL adhezijos prie skirtingo kietumo paviršių tyrimas. Ląstelės buvo išsėtos ant: 1, 8 ir 40 kPa bei 10 GPa paviršių, jų adhezijos kinetika matuota registruojant ląstelių ilgį praėjus 30, 60, 90 ir 120 min. po jų išsėjimo ant tiriamųjų paviršių. Duomenys pateikti ląstelių ilgio pasiskirstymo funkcija, kuri vaizduoja kaip pasiskirstęs ląstelių ilgio parametras ląstelių populiacijoje ant tiriamųjų paviršių. Raidės a, b ir c žymi grupių skirtumus.

3.2.5. Paviršiaus kietumo įtaka DMKL morfologijai

Paviršiaus kietumas lėmė skirtingą DMKL adheziją ant tirtų įvairaus kietumo paviršių, dėl to toliau buvo nuspręsta įvertinti, ar skirtingo kietumo aplinka turi įtakos šių ląstelių morfologijai. Tuo tikslu, DMKL buvo išsėtos ant tiriamųjų paviršių ir jų morfologija buvo įvertinta po 24 valandų (3.10 pav. A). Gautas nuotraukos buvo išanalizuotos naudojant ImageJ programą – įvertintantas ląstelių ilgis, plotis ir ilgio bei pločio santykis (3.10 pav. B). Rezultatai parodė, kad paviršiaus kietumas didžiausią įtaką turėjo ląstelių ilgiui – ląstelių auginimo paviršiui kietėjant, jos buvo linkusios labiau išplisti. Tačiau įdomu tai, kad ant 8 ir 40 kPa augusių ląstelių išplitimas nesiskyrė praėjus 24 valandoms po jų išsėjimo. Nepaisant to, ilgiausios ląstelės buvo ant kiekiausio 10 GPa paviršiaus, o trumpiausios ant minkščiausio 1 kPa hidrogelio.

3.2.6. DMKL suformuotų fokolinių adhezijų skaičiaus priklausomybė nuo auginimo paviršiaus kietumo

Ląstelių adhezijos ir morfologijos tyrimai parodė, kad ląstelės nevienodai sąveikauja su skirtingo kietumo paviršiais. Todėl toliau vertinamas fokolinių adhezijos kompleksų, kuriuos DMKL suformuoja ant tiriamųjų paviršių praėjus 24 valandoms po jų išsėjimo, skaičius (3.11 pav. A). Fokalinės adhezijos buvo vizualizuotas, naudojant antikūnus, atpažįstančius aktyvuotą fokalinę adhezijos kinazę, fosforilintą Tyr397 padėtyje (fosfo-FAK (Tyr397)). Ši kinazė savo SH2 domeno pagalba atlieka karkaso funkciją ir dalyvauja fokalinės adhezijos komplekso susiformavime [307]. Mūsų tyrimo duomenys parodė, kad ląstelės suformuoja skirtingą fokolinių adhezijų skaičių ir jis priklauso nuo paviršiaus kietumo (3.11 pav. B). Nustatėme, kad kuo kietesnis buvo auginimo paviršius, tuo daugiau fokolinių adhezijų ląstelės buvo linkusios suformuoti. Ant 1 kPa kietumo paviršiaus vidutiniškai ląstelės suformavo $38,6 \pm 5,4$ fokalinės adhezijos kompleksus, ant 8 kPa – $60,6 \pm 5,5$, o ant 40 kPa – $76,6 \pm 8,1$ kompleksų. Tačiau lyginant plastikinį paviršių (10 GPa) su kietiausiu tiriamu 40 kPa hidrogeliu, DMKL suformuotas fokolinių adhezijų kompleksų skaičius ženkliai nesiskyrė – $80 \pm 8,8$. Šie rezultatai parodo, kad paviršiaus kietumas yra svarbus ląstelių sąveikai su paviršiumi – kuo kietesnis paviršius, tuo DMKL stipriau su juo sąveikauja.



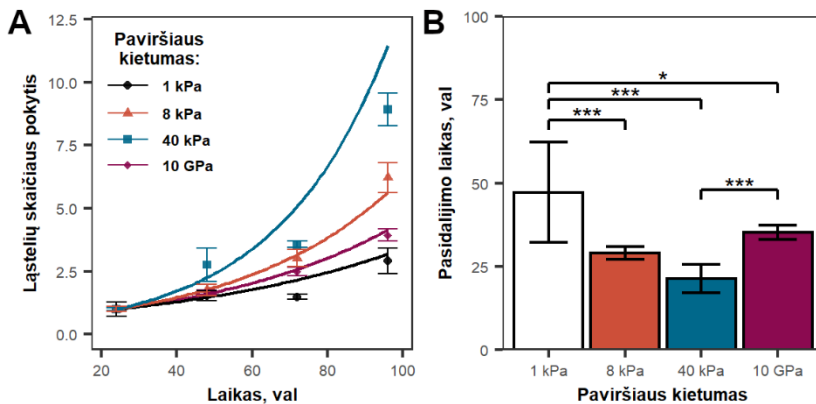
3.11 pav. Paviršiaus kietumo įtaka DMKL suformuotam fokolinių adhezijų skaičiui. **A** – fokalinės adhezijos kompleksai suformuoti auginant DMKL ant skirtingo kietumo paviršių. Žalia spalva – fosfo-FAK(Tyr397), mėlyna – ląstelių branduoliai nudažyti fluorescentiniu DAPI dažu. **B** – ląstelių suformuotų fokolinių adhezijų skaičius ant skirtingo kietumo paviršių. Duomenys pateikti dėžiniais grafikais. Juoda linija – mediana, dėžė žymi tarpkvartilinį regioną, paklaidos mažiausią ir didžiausią reikšmes. Taškais pavaizduotos iškritos, kurios nuo

medianos nutolusios didesniu nei 1,5 tarpkvartilinio regiono pločio atstumu.

3.2.7. DMKL proliferacija ant skirtingų kietumo paviršių

FAK ląstelėse yra atsakingos ir reguliuoja daugelį ląstelės procesų, tarp jų ir ląstelių dauginimąsi. Todėl, nustatę skirtingą aktyvios FAK formos molekulių skaičių DMKL augintose ant tiriamų, įvairaus kietumo paviršių, toliau vertinome, ar skirtingo kietumo aplinka gali daryti įtaką šių ląstelių proliferacijai. Tuo tikslu ląstelės buvo išsėtos ant tiriamųjų paviršių ir jų skaičiaus pokytis analizuotas 4 dienas po jų išsėjimo (3.12 pav. A). Gauti duomenys parodė, kad ląstelių dauginimosi greitis koreliavo su jų suformuotų

fokolinių adhezijų kompleksų skaičiumi ant tirtų hidrogelių – DMKL proliferacija priklausė nuo paviršiaus kietumo. Kuo kietesnis paviršius buvo, tuo greičiau ląstelės proliferavo. Tačiau, ši priklausomybė negaliojo ant plastiko paviršiaus augintoms ląstelėms. Šiuo atveju, DMKL dauginosi panašiu greičiu kaip ir ant 8 kPa hidrogelio augintos ląstelės. Įvertinus DMKL pasidalijimo greitį nustatėme, kad ant kietiausio paviršiaus augusios ląstelės pasidalijo kartą kas $21,3 \pm 4,2$ val., o ant minkščiausio 1 kPa kietumo paviršiaus, ląstelėms pasidalinti reikėjo daugiau du kartus ilgesnio laiko tarpo – DMKL, šiuo atveju, pasidalijo kas $47,2 \pm 15,1$ val. (3.12 pav. B). Tuo tarpu ant vidutinio 8 kPa hidrogelio ir 10 GPa plastiko paviršiaus ląstelės pasidalijo atitinkamai, kas 29 ± 2 ir $35,2 \pm 2,2$ val. Šie duomenys buvo gauti MTT metodu, tačiau juos patvirtinome ir prieš tai aprašytu DAPI metodu (duomenys nepateikiami).

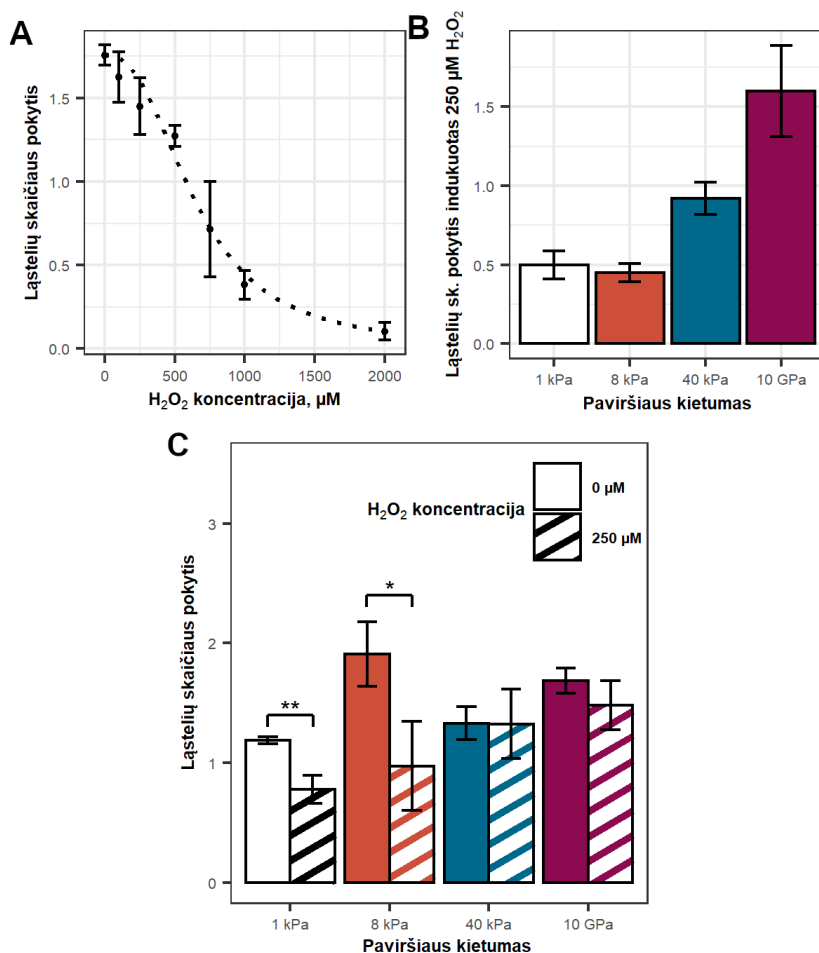


3.12 pav. Skirtingo kietumo paviršių poveikis DMKL proliferacijai. **A** – DMKL skaičiaus pokytis praėjus 24, 48, 72 ir 96 val. po ląstelių išsėjimo. Taškai žymi vidurkį, paklaidos – SN. Linijos – ląstelių proliferacijos modeliai. **B** – ląstelių pasidalijimo dažniai, apskaičiuoti iš proliferacijos duomenų. Stulpelių aukštis žymi grupės vidurkį, paklaidos – SN.

3.2.8. Paviršiaus kietumo įtaka DMKL vandenilio peroksido jautrumui

Šioje darbo dalyje įvertinome kaip ląstelių atsparumą oksidaciniam stresui veikia auginimo paviršiaus mechaninės savybės. Pirmiausiai įvertinome, kokią įtaką ląstelių gyvybingumui turi vandenilio peroksido indukuotas oksidacinis stresas jas auginant ant plastiko paviršiaus (3.13 pav. A). Tuo tikslu, DMKL buvo paveiktos įvairiomis vandenilio peroksido koncentracijomis (nuo 100 iki 2000 μM) ir po 24 val., MTT metodu įvertintas ląstelių skaičiaus pokytis. Tolimesniam tyrimui buvo pasirinkta 250 μM vandenilio peroksido koncentracija, kuri reikšmingai darė įtaką ląstelių

skaičiaus pokyčiui lyginant su kontrolinėmis, vandenilio peroksidu neveiktomis ląstelėmis, tačiau šis poveikis nebuvo per stiprus ir nesukėlė didžiosios dalies ląstelių žūties praėjus 24 poveikio valandoms. Nustatėme, kad ląstelių jautrumas vandenilio peroksido sukeltam oksidaciniam stresui priklausė nuo paviršiaus kietumo – kuo kietesnis buvo tiriamasis paviršius, tuo atsparesnės vandenilio peroksido poveikiui buvo DMKL (3.13 pav. B).



3.13 pav. Skirtingo kietumo paviršių poveikis DMKL jautrumui oksidaciniam stresui. **A** – vandenilio peroksido citotoksiškumo vertinimas DMKL augintų ant plastiko paviršiaus, populiacijoje. Ląstelės buvo paveiktos 100, 250, 500, 750, 1000 ir 2000 μM vandenilio peroksido koncentracijomis ir jų poveikis įvertintas praėjus 24 poveikio valandoms. **B** – 250 μM vandenilio peroksido poveikis DMKL, augintoms ant skirtingo kietumo paviršių. **C** – ant skirtingo kietumo paviršių augintų ląstelių skaičiaus pokytis, indukuotas 250 μM vandenilio peroksido koncentracijos. Taškai ir stulpelių aukštis žymi grupių vidurkį, paklaidos SN.

Didžiausias ląstelių skaičiaus pokytis buvo stebėtas ant 1 ir 8 kPa kietumų paviršių augintoje DMKL populiacijoje (3.13 pav. C). 250 μM vandenilio peroksido koncentracija ant šių paviršių sukėlė apie 50 % ląstelių žūtį. Tuo tarpu, ląstelės augintos ant 40 kPa ir 10 GPa kietumų paviršių buvo daug atsparesnės 250 μM vandenilio peroksido koncentracijai. Ant šių paviršių nebuvo pastebėtas ląstelių skaičiaus sumažėjimas. Taigi, DMKL

jautrumas oksidaciniam stresui priklauso nuo paviršiaus, ant kurio ląstelės yra auginamos, kietumo. Kuo kietesnis paviršius, tuo DMKL buvo atsparesnės vandenilio peroksido sukeltam oksidaciniam stresui.

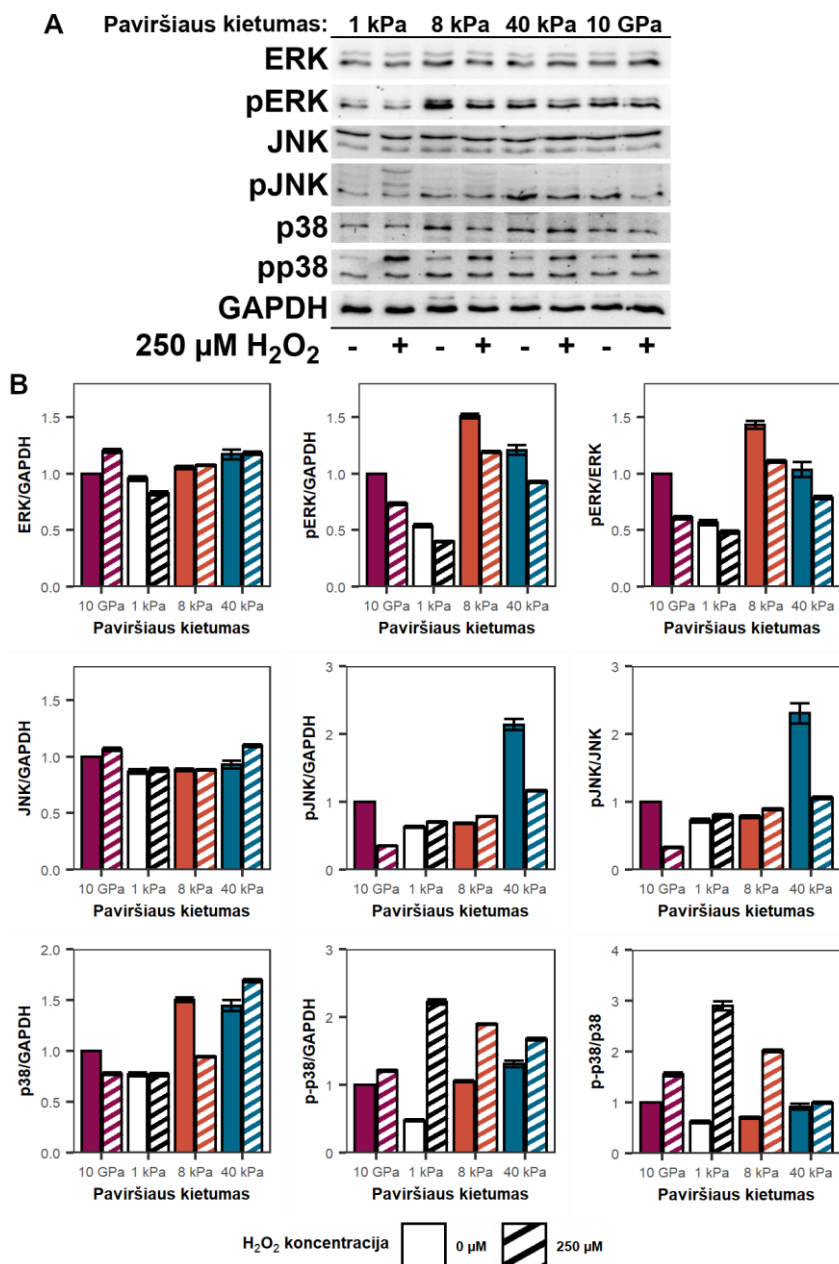
3.2.9. MAPK raiškos ir fosforilinimo pokyčiai DMKL atsakant į oksidacinį stresą skirtingo kietumo aplinkose

Prieš tai aptarti rezultatai parodė, kad mechaninė aplinka daro įtaką ląstelių adhezijai, morfologijai, proliferacijai ir jautrumui oksidaciniam stresui, o tai reiškia, kad priklausomai nuo auginimo paviršiaus kietumo, ląstelėse yra aktyvuojami skirtingi signaliniai keliai. Tuo tikslu, toliau įvertinome, kaip 1, 8 ir 40 kPa hidrogeliai veikia DMKL MAP kinazių ERK, JNK ir p38 raišką bei aktyvinimą (3.14 pav. A ir B). Imunoblotingo analizė parodė, kad mechaninė aplinka nežymiai veikia ERK ir JNK kinazių raišką, kai tuo tarpu p38 MAPK raiška buvo labai priklausoma nuo paviršiaus kietumo. Šiuo atveju, ant kietesnio hidrogelio buvo augintos tiriamos ląstelės, tuo daugiau jos turėjo p38 baltymo.

Kitaip nei bendrųjų MAP kinazių atveju, visų tirtų MAP kinazių fosforilintų formų kiekiai priklausė nuo paviršiaus kietumo, ant kurio buvo auginamos DMKL. pERK/ERK santykis buvo mažiausias ląstelėse augusiose ant minkščiausio 1 kPa kietumo hidrogelio, o didžiausias santykis nustatytas ant 8 kPa kietumo hidrogelio augintose ląstelėse. Tuo tarpu ant kietiausio hidrogelio bei ant plastiko paviršiaus augusiose ląstelėse buvo nustatytas šiek tiek mažesnis, panašus fosforilintos ir bendros ERK formų santykis. pJNK/JNK santykis žymiai didesnis nei kitose grupėse buvo nustatytas tik ant 40 kPa kietumo augusiose ląstelėse. Kitose grupėse jis buvo panašus ir reikšmingai nesiskyrė. p-p38/p38 santykis, kaip ir bendros formos atveju priklausė nuo paviršiaus kietumo – kuo kietesnė aplinka buvo tiriamą, tuo daugiau fosforilintos formos buvo nustatyta DMKL. Taigi, p38 MAP kinazės raiška ir aktyvinimas labiausiai buvo veikiamas mechaninių paviršiaus savybių, o tuo tarpu ERK ir JNK kinazių atveju, tik jų fosforilinimo lygis kito keičiantis paviršiaus kietumui. Tačiau pastebėtina, kad šie pokyčiai nebuvo linijiniai ir kito skirtingai kiekvienos kinazės ir paviršiaus kietumo atveju.

Toliau įvertinome kaip keičiasi šių MAP kinazių raiška ir aktyvinimas DMKL atsakant į 250 μ M vandenilio peroksido indukuotą oksidacinį stresą. Nustatėme, kad vandenilio peroksido poveikis beveik neturėjo įtakos ERK ir JNK raiškai, tik ERK atveju ant minkščiausio 1 kPa kietumo hidrogelio augusiose ląstelėse šios kinazės raiška šiek tiek sumažėjo, o JNK atveju ant 40 kPa kietumo hidrogelių augusiose DMKL nežymiai padidėjo. Labiau išreikšti pokyčiai pastebėti p38 MAP kinazės atveju. Jos raiška smarkiai

sumažėjo po oksidacinio streso poveikio ląstelėse, augusiose ant 8 kPa ir 10 GPa paviršių, o šiek tiek padidėjo ant 40 kPa augintų DMKL, tuo tarpu ant 1 kPa augintose ląstelėse šios kinazės kiekis nepakito.



3.14 pav. MAPK ERK, JNK ir p38 raiškos bei fosforilinimo pokyčiai DMKL atsakant į oksidacinį stresą, ląsteles auginant ant skirtingo kietumo paviršių. A – MAPK ERK, JNK ir p38 raiškos ir fosforilinimo pokyčiai indukuoti skirtingo

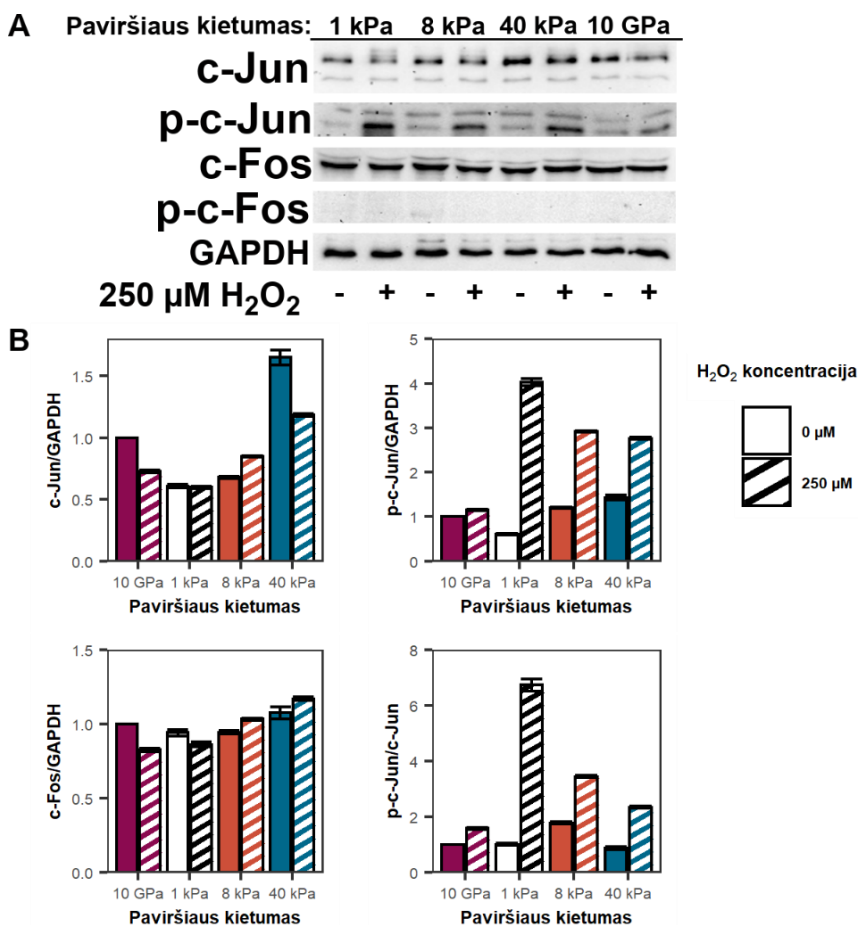
kietumo paviršių ir 250 μ M vandenilio peroksido koncentracijos. Vandenilio peroksido poveikis vertintas po 1 val. GAPDH baltymas buvo naudotas kaip užnešimo kontrolė. **B** – kiekybinis MAP kinazių raiškos ir aktyvinimo įvertinimas. Duomenys standartizuoti pagal GAPDH užnešimo kontrolę. Stulpelių aukštis – grupės vidurkis, paklaidos – SN.

Tirdami vandenilio peroksido poveikį MAPK fosforilinimui, nustatėme, kad fosforilintos ERK formos sumažėjo ant visų paviršių auginamose ląstelėse po oksidacinio streso indukavimo, išskyrus ant pačio minkščiausio, 1 kPa kietumo hidrogelio augintose ląstelėse – ant šio paviršiaus augančiose ląstelėse ERK fosforilinimo lygis nepakito. JNK kinazės fosforilintos formos lygis smarkiai nukrito ant kietiausio 40 kPa ir 10 GPa paviršių augintose ląstelėse. Šiuo atveju šios kinazės lygis sumažėjo beveik per pusę, kai tuo tarpu ant 1 ir 8 kPa paviršių, oksidacinis stresas neturėjo reikšmingos įtakos p-JNK formai. p38 MAP kinazės atveju, fosforilintos formos lygis po oksidacinio streso poveikio atvirkščiai koreliavo su paviršiaus kietumu – kuo kietesnis paviršius, tuo mažiau aktyvios p38 MAP kinazės ląstelėse buvo nustatyta. 40 kPa paviršiaus atveju, p-p38 lygis reikšmingai nesiskyrė nuo kontrolinių – oksidacinio streso nepaveiktų ląstelių. Tačiau ant minkščiausio 1 kPa kietumo paviršiaus augintose ląstelėse, šio baltymo fosforilintos formos lygis padidėjo daugiau nei tris kartus, ant 8 kPa paviršiaus augusiose ląstelėse – daugiau nei du kartus. Įdomu tai, kad ant 10 GPa augintose ląstelėse taip pat registruotas fosforilintos p38 formos padidėjimas (~1,6 karto).

3.2.10. Transkripcijos veiksnio AP-1 raiškos ir aktyvinimo pokyčiai skirtingo kietumo aplinkose oksidacinio streso metu

Tiriamų MAP kinazių raiška ir aktyvinimas priklausė nuo aplinkos kietumo, tačiau taip pat ir nuo oksidacinio streso. Dėl to tolimesniuose darbuose įvertinome kaip kinta vieno iš pagrindinių MAP kinazių taikinių, transkripcijos veiksnio aktyvuojančio baltymus 1 (*Activator protein-1* (AP-1)) raiška ir aktyvinimas tiek auginant DMKL ant skirtingo kietumo paviršių, tiek atsakant į vandenilio peroksido indukuotą oksidacinį stresą. AP-1 transkripcijos veiksnys gali būti sudarytas iš c-Jun homodimero arba c-Jun ir c-Fos heterodimero. Todėl šių baltymų raiškos ir fosforilinimo pokyčiai DMKL buvo įvertinti imunoblotingo metodu (3.15 pav. A ir B). c-Jun sintezė ant hidrogelių augintose ląstelėse priklausė nuo paviršiaus kietumo – kuo kietesnė aplinka, tuo daugiau c-Jun baltymo turėjo ląstelės. Tuo tarpu, ant plastiko paviršiaus augintose ląstelėse, šio baltymo buvo mažiau nei ant 40 kPa kietumo paviršiaus augintose DMKL. Fosforilintos formos atveju,

ženklus p-c-Jun dalies padidėjimas, nulemtas mechaninės aplinkos nustatytas tik ant 8 kPa paviršiaus. Oksidacinis stresas lėmė c-Jun raiškos sumažėjimą ląstelėse, augusiose ant kiečiausių 40 kPa ir 10 GPa paviršių, o ant 8 kPa paviršiaus augusiose ląstelėse c-Jun raiška šiek tiek padidėjo, ant minkščiausio 1 kPa paviršiaus – nepakito. Ženklus aktyvintos c-Jun formos dalies padidėjimas nustatytas po oksidacinio streso poveikio ant visų paviršių augintose ląstelėse. Fosfo formos kiekis atvirkščiai priklausė nuo aplinkos kietumo – kuomet kietesnė aplinka buvo tirama, tuo mažiau ląstelėje buvo fosforilintos baltymo formos.



3.15 pav. Transkripcijos veiksnio AP-1 subvienetų c-Jun ir c-Fos raiškos bei fosforilavimo pokyčiai DMKL atsakant į oksidacinį stresą ant skirtingo kietumo paviršių. A – c-Jun ir c-Fos raiškos ir fosforilavimo pokyčiai nulemti skirtingo kietumo paviršių ir 250 μM vandenilio peroksido koncentracijos poveikio. Vandenilio peroksido poveikis vertintas po 1 val. GAPDH baltymas buvo naudotas kaip užnešimo kontrolė. B – kiekybinis c-Jun ir c-Fos raiškos ir aktyvinimo įvertinimas. Duomenis standartizuoti pagal GAPDH užnešimo kontrolę. Vienspalviai stulpeliai – mechaninės

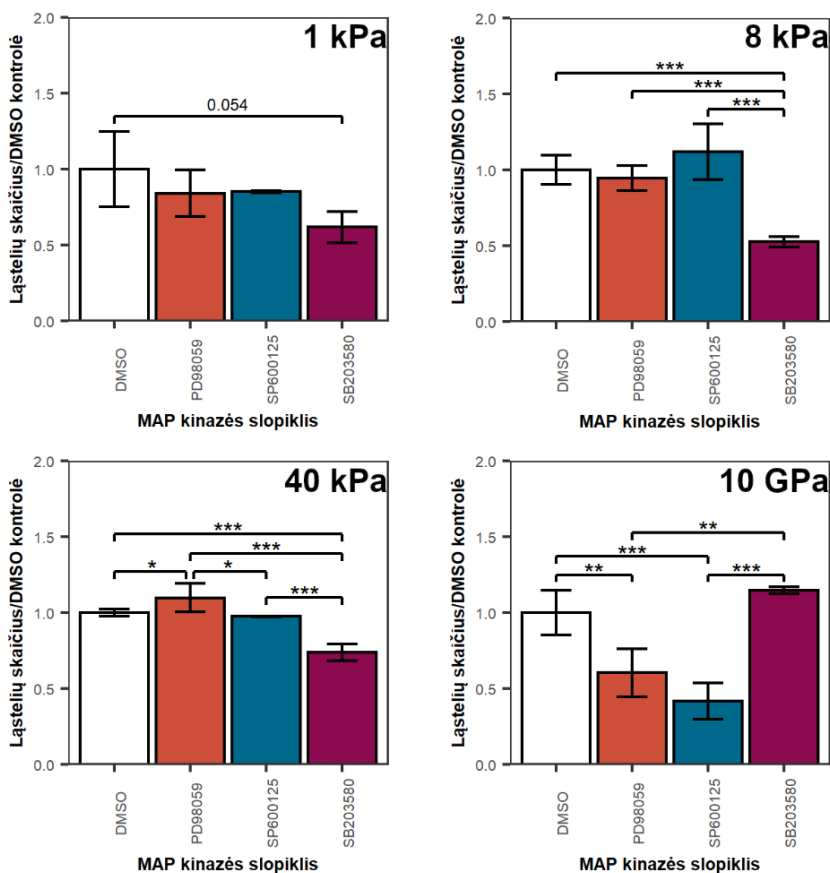
aplinkos nulemti AP-1 subvienetų raiškos ir aktyvinimo pokyčiai, dryžuoti – mechaninės aplinkos ir 250 μ M vandenilio peroksido poveikio. Stulpelių aukštis – grupės vidurkis, paklaidos – SN.

c-Fos baltymo kiekis ląstelėse nepriklausė nuo aplinkos kietumo. Taip pat, oksidacinio streso poveikis, neturėjo stipraus efekto šio baltymo raiškai. c-Fos baltymo kiekis šiek tiek sumažėjo ant kietiausio 10 GPa ir minkščiausio 1 kPa kietumo paviršių augintose ląstelėse bei nežymiai padidėjo ant 8 ir 40 kPa kietumų paviršių augintose DMKL. Be to, c-Fos baltymas nebuvo aktyvinamas nei skirtingų kietumų paviršių, nei dėl oksidacinio streso įtakos. Visose grupėse aptiktas tik labai silpnas foninis fosfo formos signalas (P1 pav.).

3.2.11. MAPK vaidmuo DMKL atsakant į oksidacinį stresą

Skirtingi MAP kinazių raiškos ir aktyvinimo profiliai leidžia daryti prielaidą, kad šių kinazių vaidmuo gali priklausyti nuo ląsteles supančios mechaninės aplinkos. Todėl tolimesniame tyrime pasitelkėme MAP kinazių slopiklius siekdami įvertinti ERK, JNK ir p38 vaidmenį DMKL atsakant į oksidacinį stresą skirtingo kietumo aplinkose. PD98059 slopiklis buvo panaudotas nuslopinti ERK kinazę, SP600125 – JNK ir SB203580 – p38 MAP kinazę (3.16 pav.).

Nuslopinus p38 MAP kinazę DMKL, augusių ant 1 kPa kietumo paviršiaus jautrumas oksidaciniam stresui smarkiai padidėjo. Ta pati tendencija buvo stebėta ir ant 8 bei 40 kPa kietumų paviršių. Tai reiškia, jog p38 MAP kinazė yra atsakinga už DMKL išgyvenimą oksidacinio streso sąlygomis. Tuo tarpu, ERK ir JNK neturėjo aiškaus vaidmens ant hidrogelių augintose DMKL, joms atsakant į oksidacinį stresą. Priešingai, šios kinazės buvo labai svarbios ant plastiko paviršiaus augusiose ląstelėse, kai tuo tarpu p38 MAP kinazė, nei ląstelių išgyvenimo, nei mirties signaliniuose keliuose nedalyvavo. Taigi, mūsų duomenys įrodo, kad mechaninė aplinka daro didelę įtaką įvairiems ląstelių procesams, bei MAP kinazių atsakas į tą patį veiksnį gali skirtis priklausomai nuo aplinkos mechaninių savybių.



3.16 pav. MAP kinazių vaidmuo DMKL atsakant į oksidacinį stresą skirtingo kietumo paviršiuose. MAPK ERK, JNK ir p38 buvo nuslopintos naudojant 10 μ M PD98059 (ERK), 30 μ M SP600125 (JNK) ir 30 μ M SB203580 (p38) slopiklius. Jais DMKL buvo paveikiamos likus 30 min. iki 250 μ M vandenilio peroksido poveikio. Ląstelių gyvybingumas vertintas po 24 val. poveikio MTT metodu. Stulpelių aukštis – grupės vidurkis, paklaidos – SN.

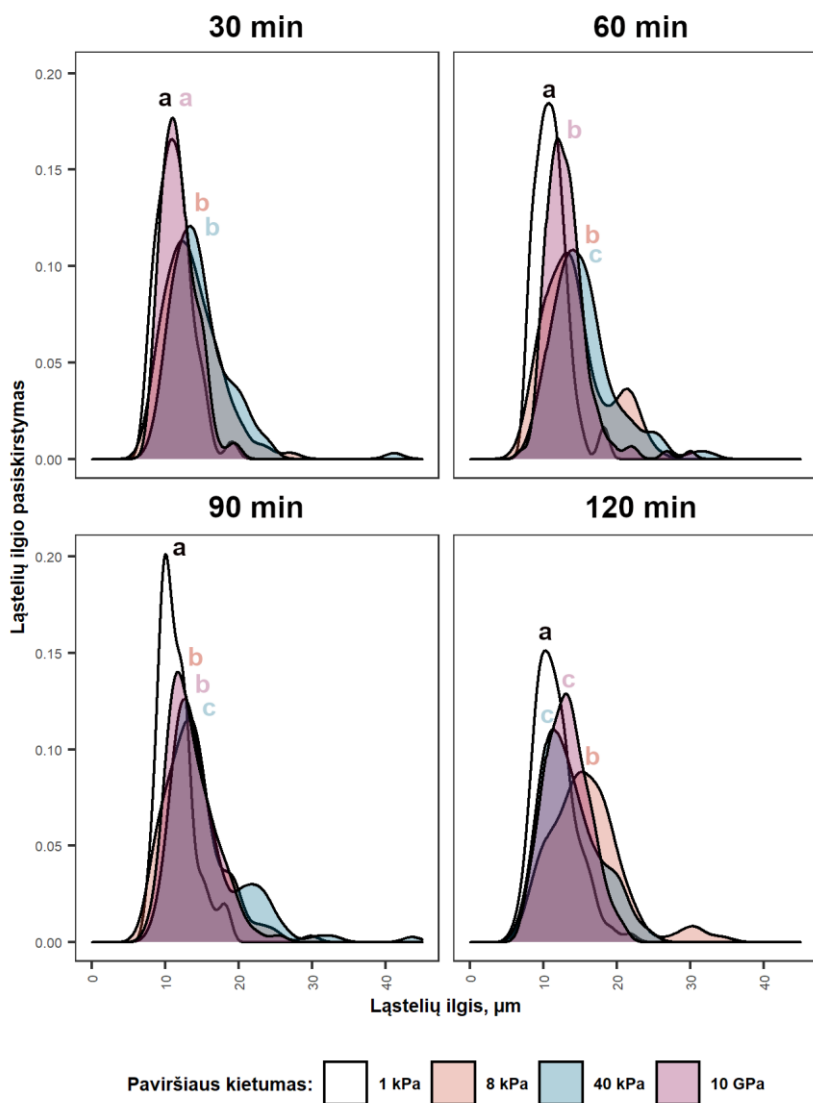
3.3. Paviršiaus kietumo įtaka krūties vėžio ląstelių linijos MCF-7 jautrumui priešvėžiniam vaistui doksorubicinui

Mechaninė aplinka veikia ne tik kamienines, bet ir vėžines ląsteles. Žinoma, kad vėžiniai audiniai yra daug kietesni už aplinkinius sveikus audinius – ši savybė yra naudojama palpacijos būdu aptikti vėžinius susirgimus. Vėžinių audinių kietumą lemia aktyvūs CAF, kurie sintetinę kietesnę užląstelinę užpildą, padidėjęs tarpląstelinio skysčio slėgis ir jo tėkmė bei spaudimas, atsiradęs dėl uždaroje aplinkoje besidalijančių vėžinių ląstelių [266]. Nustatyta, kad vėžinio audinio kietumas koreliuoja su ligos stadija. Dėl šių priežasčių, mechanobiologija tiria, kokią įtaką mechaninė aplinka daro

vėžinėms ląstelėms ir kaip šiuose audiniuose vykstančius procesus būtų galima pritaikyti vėžio diagnostikai ar gydymui. Todėl šioje disertacijos dalyje tyrėme, kokią įtaką skirtingo kietumo paviršiai daro krūties vėžio ląstelių linijai MCF-7 ir jų atsparumui vienam populiariausių priešvėžinių vaistų, naudojamų krūties vėžiui gydyti – doksorubicinui.

3.3.1. MCF-7 adhezijos ant skirtingo kietumo paviršių kinetika

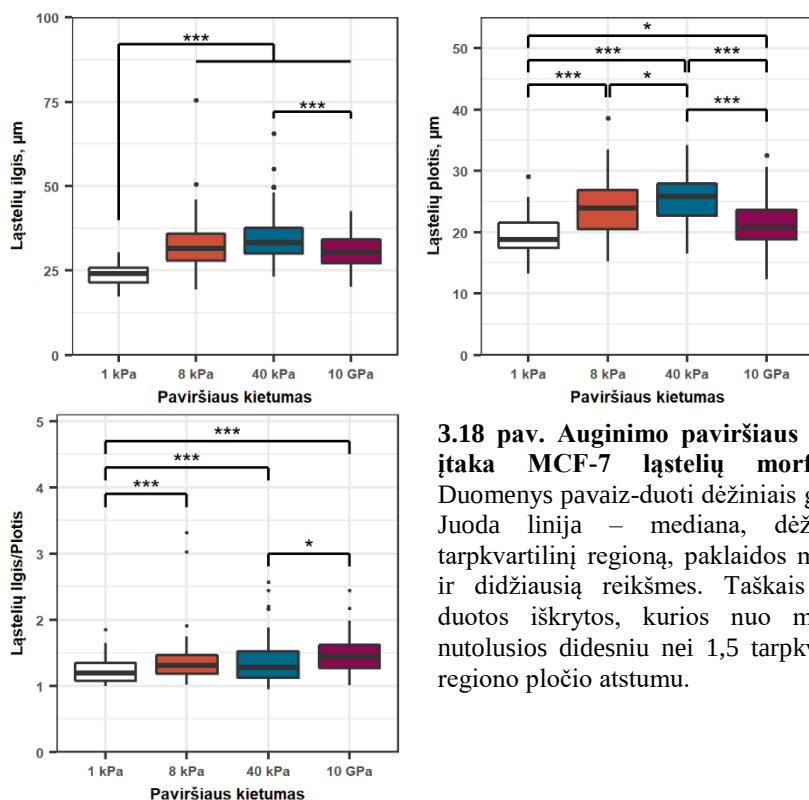
Pradžioje įvertinome, kaip MCF-7 krūties vėžio ląstelių linija sąveikauja su skirtingo kietumo poliakrilamidiniais hidrogeliais. Tuo tikslu, ląstelės buvo išsėtos ant tiriamųjų paviršių ir jų adhezija vertinta praėjus 30, 60, 90 ir 120 min. (3.17 pav.). Nustatėme, kad prasčiausiai MCF-7 ląstelės kibo prie minkščiausių 1 kPa kietumo hidrogelių. Jų ilgis per 2 valandų stebėjimo laikotarpį beveik nepakito – stebėtas nežymus pokytis nuo $11,2 \pm 2,3$ μm iki $11,6 \pm 2,8$ μm . Pastebėtina, kad krūties vėžio linijos ląstelės daug lėčiau lyginant su DMKL kibo prie visų tirtų paviršių. Visgi, greičiausiai MCF-7 ląstelės pradėjo kibti prie kietų paviršių – 40 kPa hidrogelio ir 10 GPa plastiko paviršiaus. Po pusvalandžio ląstelės buvo reikšmingai daugiau išplitusios ant šių paviršių lyginant su MCF-7 ląstelėmis, augintomis ant minkščiausio 1 kPa ir vidutinio 8 kPa kietumo hidrogelių. Praėjus valandai ant kietiausio 40 kPa hidrogelio augusios ląstelės buvo labiausiai išplitusios, kai tuo tarpu ant 8 kPa kietumo paviršiaus augusios MCF-7 ląstelės savo ilgiu prisivijo ląsteles augusias ant 10 GPa plastiko. Ši tendencija išliko ir po 90 min. stebėjimo. Tačiau po 120 min. situacija pasikeitė – ant vidutinio kietumo augusios MCF-7 ląstelės labiausiai išsiplėtė lyginant su kitomis grupėmis. Taip pat ant plastiko paviršiaus augusios ląstelės prisivijo ant 40 kPa augusias ląsteles. Taigi, pirmąją valandą krūties vėžio ląstelių linijos MCF-7 ląstelės geriausiai kibo prie kietiausių paviršių, tačiau vėliau jos išplito ir ant vidutinio kietumo paviršiaus (nuo $13,6 \pm 3,7$ μm iki $15,9 \pm 5$ μm).



3.17 pav. MCF-7 adhezijos prie skirtingų kietumų paviršių tyrimas. Ląstelės buvo išsėtos ant: 1, 8 ir 40 kPa ir 10 GPa paviršių ir jų adhezijos kinetika matuota registruojant ląstelių ilgį praėjus 30, 60, 90 ir 120 min. po jų išsėjimo. Duomenys pavaizduoti ląstelių ilgio pasiskirstymo funkcija, kuri vaizduoja kaip pasiskirstęs ląstelių ilgio parametras ląstelių populiacijoje ant tiriamųjų paviršių. Raidės a, b ir c žymi statistiškai reikšmingus grupių skirtumus.

3.3.2. MCF-7 morfologija ant skirtingo kietumo paviršių

Tiriamųjų paviršių mechaninės savybės turėjo įtakos ląstelių adhezijos kinetikai. Toliau įvertinome kaip kinta MCF-7 morfologija praėjus ilgesniam laikui po ląstelių išsėjimo. Kaip ir ankstesniais atvejais, ląstelės buvo išsėtos ant 1, 8 ir 40 kPa hidrogelių ir 10 GPa plastiko paviršiaus ir ląstelių morfologija vertinta praėjus 24 valandoms po ląstelių išsėjimo (3.18 pav.)



3.18 pav. Auginimo paviršiaus kietumo įtaka MCF-7 ląstelių morfologijai.

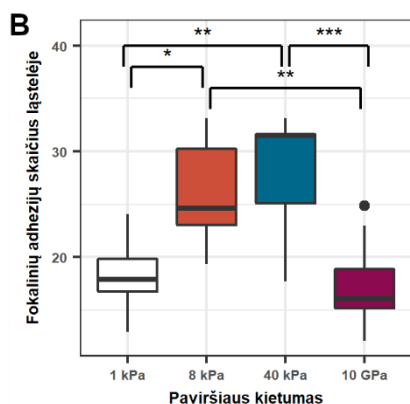
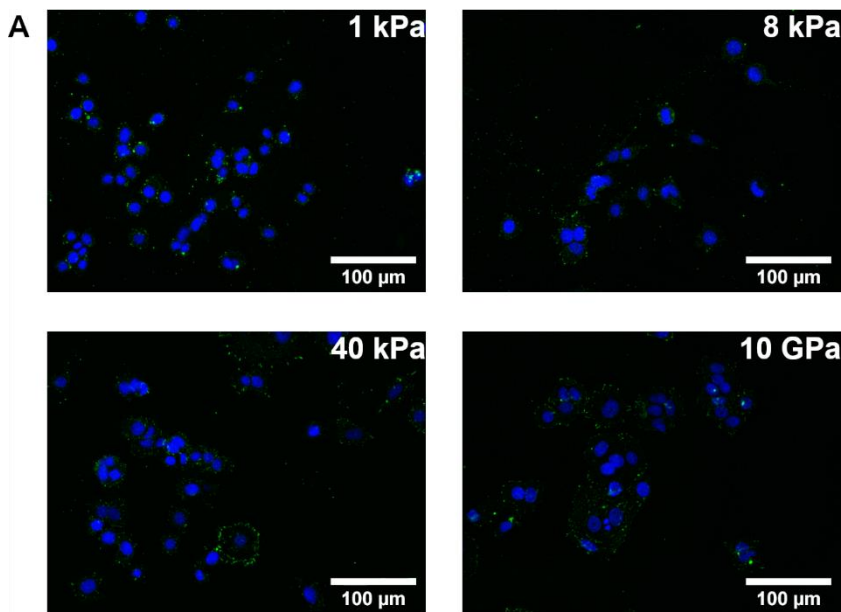
Duomenys pavaizduoti dėžiniais grafikais. Juoda linija – mediana, dėžė žymi tarpkvartilinį regioną, paklaidos mažiausią ir didžiausią reikšmes. Taškais pavaizduotos iškrytos, kurios nuo medianos nutolusios didesniu nei 1,5 tarpkvartilinio regiono pločio atstumu.

Matome, kad, kaip ir DMKL atveju (3.10 pav.), MCF-7 ląstelių ilgis priklausė nuo paviršiaus kietumo. Trumpiausios ląstelės buvo ant 1 kPa kietumo hidrogelio, o ant kitų tiriamųjų paviršių ląstelės buvo panašaus ilgio. Labiausiai išstisusios MCF-7 ląstelės buvo ant 40 kPa paviršiaus. Kitaip nei ląstelių ilgis, MCF-7 ląstelių plotis kito daug labiau. Kaip ir ląstelių ilgio atveju, mažiausias ląstelių plotis nustatytas ant minkščiausio 1 kPa kietumo paviršiaus. Kietėjant hidrogelių paviršiui, ląstelių plotis didėjo tiesiškai, tačiau ant plastiko paviršiaus augusios ląstelės buvo reikšmingai siauresnės už MCF-7 ląstelės, augusias ant vidutinio 8 kPa ir kietčiausio 40 kPa hidrogelių. Vertinant ląstelių bendrą morfologiją, nustatyta, kad visoms MCF-7 ląstelėms

buvo būdinga ovali morfologija, kuri ne žymiai kito didėjant auginimo paviršiaus kietumui. Labiausiai išilgėjusios buvo ląstelės, augusios ant plastiko paviršiaus, mažiausiai – ant 1 kPa kietumo hidrogelio.

3.3.3. Skirtingų kietumų paviršių įtaka MCF-7 adhezijai

Ląstelių adhezijos kinetikos ir morfologijos eksperimentai parodė, kad MCF-7 ląstelės, kaip ir DMKL, nevienodai sąveikauja su skirtingo kietumo paviršiais. Dėl to toliau buvo vertintas MCF-7 ląstelių suformuotas fokalinių adhezijų skaičius, jas 24 valandas auginat ant tiriamųjų paviršių (3.19 pav. A). Fokalinės adhezijos buvo vizualizuotos dažant fosforilintą FAK (Tyr397). Šio tyrimo duomenys parodė, kad ląstelės suformuoja skirtingą fokalinių adhezijų skaičių ir jis priklauso nuo paviršiaus kietumo (3.19 pav. B). Hidrogelių atveju, kuo kietesnis buvo auginimo paviršius, tuo daugiau fokalinių adhezijų MCF-7 ląstelės buvo linkusios sudaryti. Ant 1 kPa kietumo paviršiaus vidutiniškai ląstelės suformavo $18,5 \pm 3,4$ fokalinių adhezijos kompleksus, ant 8 kPa – $25,9 \pm 5,2$, o ant 40 kPa – 28 ± 6 kompleksų. Tačiau lyginant plastikinį paviršių (10 GPa) su hidrogeliais, MCF-7 suformuotas fokalinių adhezijų kompleksų skaičius nesiskyrė nuo ant 1 kPa hidrogelio auginamų ląstelių – $17,4 \pm 3,9$. Šie rezultatai parodo, kad paviršiaus kietumas daro įtaką ląstelių sąveikai su paviršiumi – kuo kietesnis paviršius, tuo MCF-7 ląstelės stipriau su juo sąveikauja, tačiau ši priklausomybė galioja tik poliakrilamidinių hidrogelių atveju.

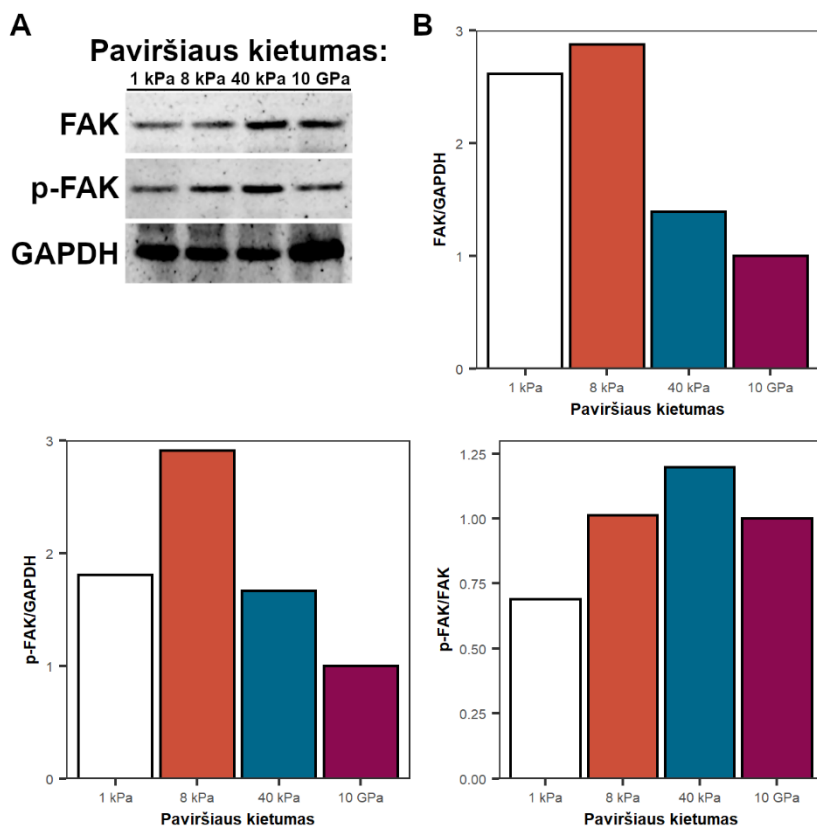


3.19 pav. Paviršiaus kietumo įtaka MCF-7 suformuotam fokalinų adhezijų skaičiui.

A – fokalinės adhezijos kompleksai suformuoti MCF-7 ląstelių, jas auginant ant skirtingo kietumo paviršių. Žaliai pažymėta fosfo-FAK (Tyr397), mėlynai – ląstelių branduoliai nudažyti fluorescenciniu DAPI dažu. **B** – ląstelių suformuotų fokalinų adhezijų skaičius ant skirtingų kietumų paviršių. Duomenys pateikti dėžiniais grafikais. Juoda linija – mediana, dėžė žymi tarpkvartilinį regioną, paklaidos mažiausią ir didžiausią reikšmes. Taškais pavaizduotos iškrytos, kurios nuo medianos nutolusios didesniu nei 1,5 tarpkvartilinio regiono pločio atstumu.

Siekdami geriau suprasti ląstelių adhezijos skirtumus ant tiriamųjų paviršių, įvertinome FAK baltymo raiškos ir aktyvinimo pokyčius MCF-7 ląstelėse po 24 val. sąveikos su paviršiais (3. 20 pav. A). Imunoblotingo tyrimas parodė netiesinę priklausomybę tarp paviršiaus kietumo ir FAK raiškos bei aktyvinimo (3.20 pav. B). Didžiausias FAK baltymo ir jo fosforilintos formos kiekis nustatytas ant vidutinio 8 kPa kietumo paviršiaus augintose MCF-7 ląstelėse. Didėjant paviršiaus kietumui, FAK kiekis tirtose MCF-7 ląstelėse mažėjo. Su fosforilinta FAK forma stebėta tokia pat tendencija. Didžiausias fosfo-FAK kiekis nustatytas ant vidutinio kietumo hidrogelio. Tuo tarpu, vertinant fosfo-FAK/FAK santykį, didelių skirtumų

nebuvo registruota. Tik ant minkščiausio 1 kPa hidrogelio augintose ląstelėse šis santykis buvo šiek tiek mažesnis.

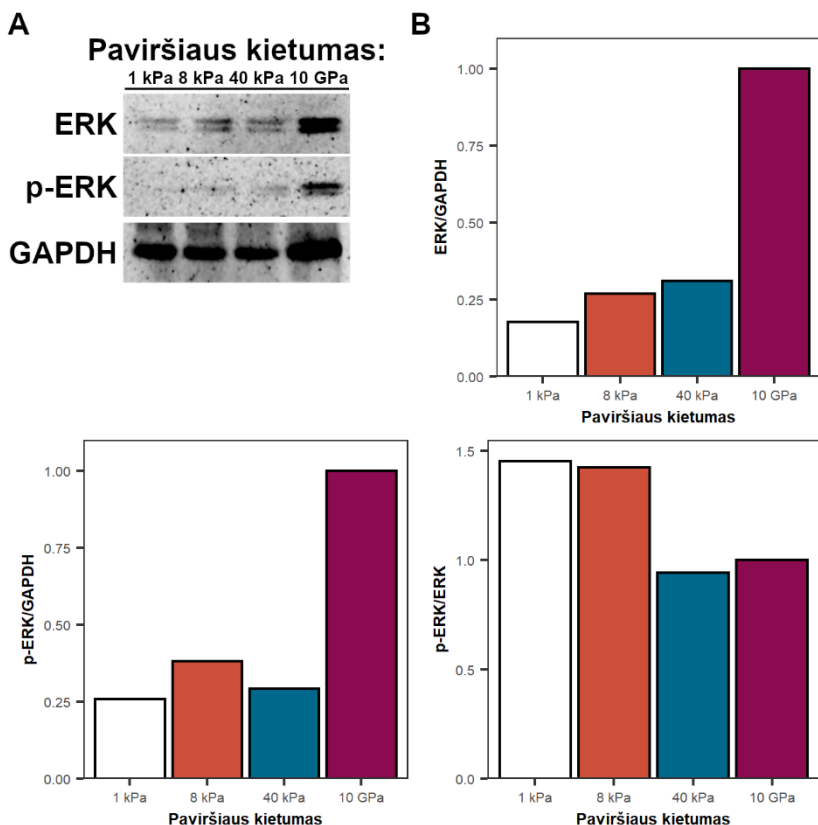


3.20 pav. FAK raiškos ir aktyvinimo pokyčiai MCF-7 ląstelėse auginant ant skirtingo kietumo paviršių. MCF-7 buvo augintos ant 1, 8 ir 40 kPa hidrogelių ir 10 GPa plastiko paviršių 24 val ir tada įvertinti FAK raiškos ir aktyvinimo (fosfo-FAK (Tyr397)) pokyčiai. **A** – FAK ir fosfo-FAK *Western blot* membranų nuotraukos. Kaip užnešimo kontrolė buvo naudotas GAPDH baltymas. **B** – kiekybinė FAK ir fosfo-FAK analizė. Duomenys standartizuoti pagal GAPDH raišką ir normalizuoti pagal ant 10 GPa augintų MCF-7 tiriamųjų baltymų kiekius.

3.3.4. Paviršių kietumo įtaka MAPK raiškai ir aktyvinimui MCF-7 ląstelėse

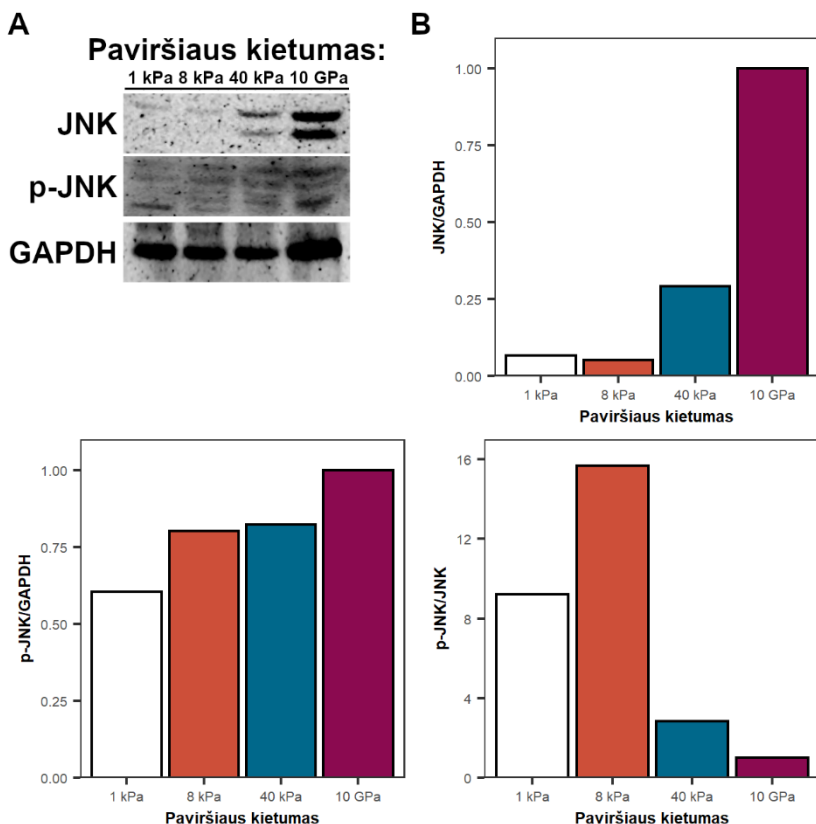
Nustatėme, kad paviršiaus mechaninės savybės daro įtaką FAK raiškai ir aktyvinimui. Atsižvelgę į tai, kad fosforilinta FAK Tyr397 padėtyje inicijuoja signalinius kelius, kurių metu gali būti aktyvinamos ir MAP kinazės [308], toliau vertinome MAP kinazių ERK, JNK ir p38 raiškos ir aktyvinimo pokyčius, nulemtus ląstelių sąveikos su skirtingų kietumų paviršiais.

Pirmiausia ištyrėme ERK raiškos bei aktyvinimo pokyčius ir nustatėme, kad abiem atvejais paviršiaus kietumas turėjo įtakos (3.21 pav. A ir B). ERK raiška koreliavo su paviršiaus kietumu – kuo kietesnis paviršius buvo tiriamas, tuo daugiau ERK baltymo MCF-7 ląstelės turėjo. Ant plokštelės augintos MCF-7 ląstelės turėjo net ~4 kartus daugiau ERK baltymo nei ant hidrogelių paviršių augintos ląstelės. Vertinant pokyčius tik ant hidrogelių augintose MCF-7, jie nebuvo tokie ryškūs ir silpnai kito kietėjant paviršiui. Analogiškai kito ir fosforilintos ERK formos kiekis MCF-7 ląstelėse. Vertinant p-ERK/ERK santykį išsiskyrė ant minkščiausio 1 kPa ir vidutinio 8 kPa kietumų augintos MCF-7 – čia stebėtas padidėjęs šių ERK formų santykis.



3.21 pav. ERK raiškos ir aktyvinimo pokyčiai MCF-7 ląstelėse auginant ant skirtingų kietumų paviršių. MCF-7 buvo augintos ant 1, 8 ir 40 kPa hidrogelių ir 10 GPa plastiko paviršių 24 val ir tada įvertinti ERK raiškos ir aktyvinimo (fosfo-ERK (Thr 202/Tyr 204)) pokyčiai. **A** – ERK ir fosfo-ERK Western blot membranų nuotraukos. Kaip užnešimo kontrolė buvo naudotas GAPDH baltymas. **B** – kiekybinė ERK ir fosfo-ERK analizė. Duomenys standartizuoti pagal GAPDH raišką ir normalizuoti pagal ant 10 GPa augintų MCF-7 tiriamųjų baltymų kiekius.

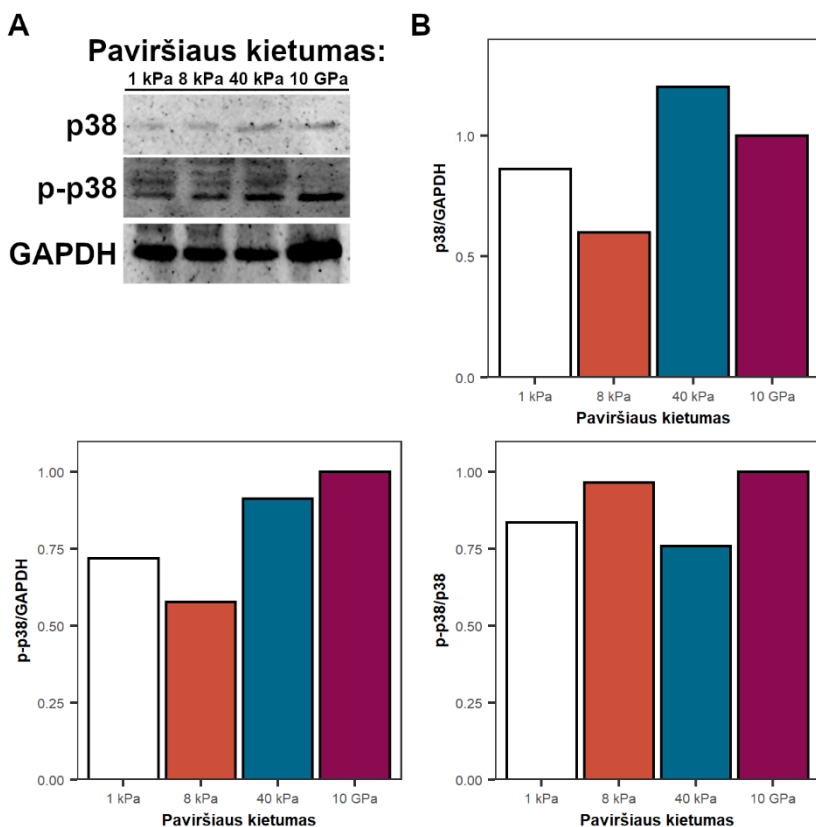
JNK kinazės atveju, jos raiška MCF-7 ląstelėse daug labiau priklausė nuo paviršiaus kietumo (3.22 pav. A ir B). Kuo kietesnė aplinka, tuo daugiau šios kinazės MCF-7 turėjo. Tuo tarpu fosforilintos JNK formos (Thr183, Tyr185 padėtyse) nustatytas panašus lygis, tendencingai didėjantis paviršiaus kietumo atžvilgiu. Tik kitaip nei bendros formos atveju, jis kito ne taip žymiai. Vertinant p-JNK/JNK santykį, taip pat smarkiai išsiskyrė ant 8 ir 1 kPa augintos MCF-7 ląstelės.



3.22 pav. JNK raiškos ir aktyvinimo pokyčiai MCF-7 ląstelėse auginant ant skirtingo kietumo paviršių. MCF-7 buvo augintos ant 1, 8 ir 40 kPa hidrogelių ir 10 GPa plastiko paviršių 24 val ir tada įvertinti JNK raiškos ir aktyvinimo (fosfo-JNK (Thr183, Tyr185)) pokyčiai. **A** – JNK ir fosfo-JNK imunoblotingo membranų nuotraukos. Kaip užnešimo kontrolė buvo naudotas GAPDH baltymas. **B** – kiekybinė JNK ir fosfo-JNK analizė. Duomenys standartizuoti pagal GAPDH raišką ir normalizuoti pagal ant 10 GPa augintų MCF-7 tiriamųjų baltymų kiekius.

p38 raiška ir aktyvinimas MCF-7 ląstelėse, kitaip nei ERK ir JNK kinazių atvejais, mažiau priklausė nuo paviršiaus kietumo (3.23 pav. A ir B). Tačiau skirtumai visgi stebėti. Šiuo atveju, įdomu tai, kad tiek pilnos, tiek fosforilintos p38 formos, MCF-7 ląstelėse mažiausiai registruota ant 8 kPa kietumo paviršių, net mažiau nei ant minkščiausio 1 kPa hidrogelio. Tuo tarpu

ant kietiausių paviršių – 40 kPa hidrogelio ir 10 GPa plastiko paviršiaus, šių formų kiekis buvo panašus. Vertinant p-p38/p38 santykį, taip pat stebėta ne linijinė priklausomybė nuo paviršiaus, ant kurio buvo augintos MCF-7 ląstelės, kietumo.

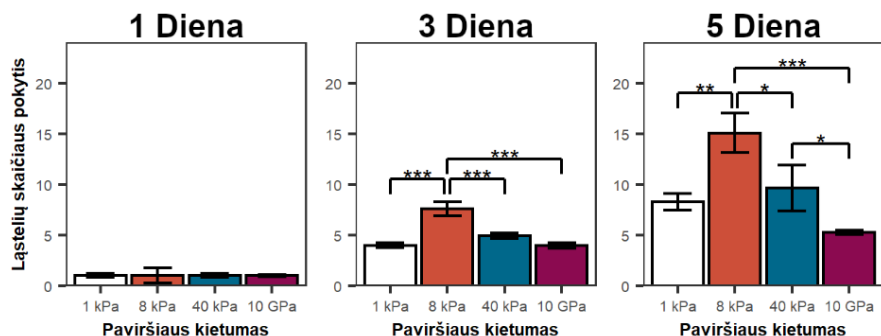


3.23 pav. p38 raiškos ir aktyvinimo pokyčiai MCF-7 ląsteles auginant ant skirtingo kietumo paviršių. MCF-7 buvo augintos ant 1, 8 ir 40 kPa hidrogelių ir 10 GPa plastiko paviršių 24 val ir tada įvertinti p38 raiškos ir aktyvinimo (fosfo-p38 (Thr180, Tyr182)) pokyčiai. **A** – p38 ir fosfo-p38 imunoblotingo membranų nuotraukos. Kaip užnešimo kontrolė buvo naudotas GAPDH baltymas. **B** – kiekybinė p38 ir fosfo-p38 analizė. Duomenys standartizuoti pagal GAPDH raišką ir normalizuoti pagal ant 10 GPa augintų MCF-7 tiriamųjų baltymų kiekius.

Taigi, ERK ir JNK kinazių raiška ir aktyvinimas tiesiogiai koreliavo su paviršiaus, ant kurio buvo augintos MCF-7 ląstelės, kietumu. Tuo tarpu, p38 kinazės atveju procesai kito netiesiškai, tačiau paviršiaus mechaninės savybės taip pat turėjo įtakos šios kinazės raiškai.

3.3.5. MCF-7 proliferacija ant skirtingo kietumų paviršių

Mechaninė aplinka darė įtaką tiek FAK, tiek MAP kinazių raiškai ir aktyvinimui. Šios kinazės inicijuoja įvairius signalinius kelius, kuriais kontroliuojami įvairūs ląsteliniai procesai, įskaitant ir ląstelių proliferaciją. Dėl to, toliau tyrėme, ar paviršiaus mechaninės savybės turi įtakos MCF-7 ląstelių dauginimuisi. Tuo tikslu, ląstelės buvo išsėjamos ant tiriamųjų paviršių (1, 8 ir 40 kPa hidrogelių ir 10 GPa plastiko paviršiaus), o ląstelių skaičius vertintas praėjus 1, 3 ir 5 dienoms po ląstelių išsėjimo. Iš 3.24 paveiksle pateikiamų duomenų matyti, kad jau po trijų dienų ant 8 kPa kietumo hidrogelio registruotas reikšmingai didesnis MCF-7 ląstelių skaičiaus prieaugis. Penktą tyrimo dieną, jau išsiskyrė ant 8 ir 40 kPa paviršiai, ant kurių augintos MCF-7 ląstelės dalijosi greičiau nei ant plastiko paviršiaus. Ant minkščiausio 1 kPa paviršiaus ląstelių skaičius buvo panašus kaip ant 40 kPa hidrogelio augintų ląstelių populiacijos. 5-ąją dieną daugiausiai ląstelių registruota ant 8 kPa paviršiaus.

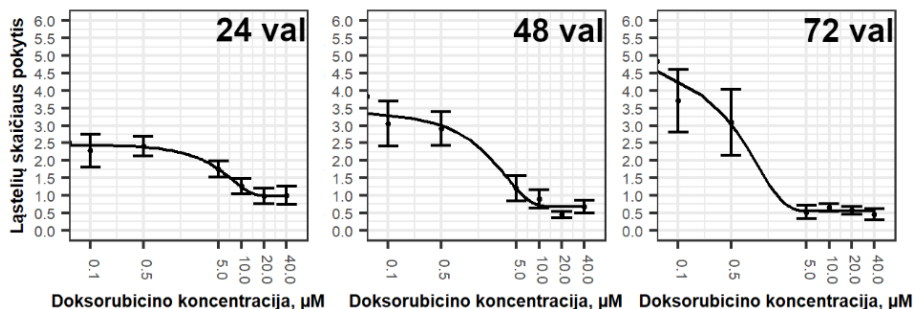


3.24 pav. MCF-7 ląstelių proliferacija ant skirtingo kietumo paviršių. Ląstelės buvo išsėtos ant tiriamųjų paviršių: 1, 8 ir 40 kPa hidrogelių bei 10 GPa plastiko paviršiaus ir po 1, 3 bei 5 dienų vertintas ląstelių skaičiaus pokytis. Ląstelių skaičius vertintas DAPI metodu, aprašytu 2.2.9 dalyje. Duomenys pateikti sulpeliniais grafikais kur stulpelio aukštis – vidurkis, paklaida SN.

3.3.6. MCF-7 ląstelių jautrumas doksorubicinui

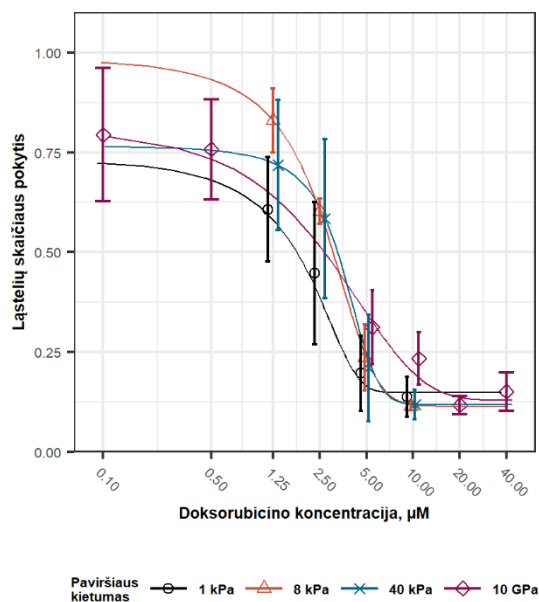
Parodėme, kad mechaninė aplinka tikrai turi didelę įtaką įvairiems MCF-7 ląstelių procesams. Todėl šioje darbo dalyje siekėme įvertinti, ar aplinkos kietumas – minkštumas gali veikti vėžinių ląstelių jautrumą vienam iš populiariausių priešvėžinių vaistų – doksorubicinui. Iš pradžių ištyrėme įvairių doksorubicino koncentracijų poveikį ant plastiko paviršiaus 24, 48 ir 72 valandas auginamoms ląstelėms (3.25 pav.). Po 24 valandų poveikio nei viena tirta koncentracija neturėjo citotoksinio poveikio, tačiau $\geq 5 \mu\text{M}$ koncentracijos pasižymėjo MCF-7 ląstelių proliferaciją slopinančiu efektu.

Kitoks efektas stebėtas po 48 ir 72 poveikio valandų – po 48 val. ląstelių žūtis nustatyta ląstelių populiacijose, veiktose $\geq 10 \mu\text{M}$ doksorubicino koncentracijomis, o po 72 valandų poveikio tiriamos ląstelės žuvo jau ir populiacijose, kurios buvo veiktos $\geq 5 \mu\text{M}$ doksorubicino koncentracijomis.



3.25 pav. Poveikio trukmės nulemtas MCF-7 ląstelių jautrumas doksorubicinui. MCF-7 ląstelės veiktos 0,1; 0,5; 5; 10; 20 ir 40 μM doksorubicino koncentracijomis; poveikis vertintas praėjus 24, 48 ir 72 valandoms po poveikio. Duomenys pavaizduoti taškiniais grafikais, kur taškai – vidurkiai, paklaidos – SN. Linijos tai 5 parametrų ląstelių citotoksiškumo prognostiniai modeliai.

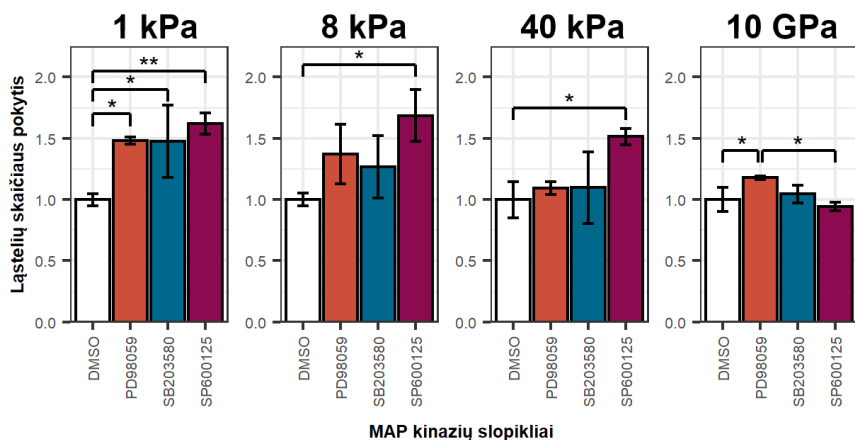
Taigi, tolesniems tyrimams pasirinkome 1,25; 2,5; 5 ir 10 μM doksorubicino koncentracijas, kuriomis veikėme ant hidrogelių augintas MCF-7 ląsteles, o doksorubicino poveikį vertinome praėjus 48 poveikio valandoms. Kaip matome iš 3.26 paveiksle pateiktų duomenų, ant hidrogelių paviršių augintos MCF-7 ląstelės buvo jautresnės doksorubicino poveikiui nei ant plastiko paviršiaus augintos ląstelės – 5 μM šio vaisto koncentracija ant plokštelės augintoms MCF-7 turėjo mažesnę toksišią poveikį lyginant su ant hidrogelių augintomis ląstelėmis. Ta pati tendencija stebėta ir su 10 μM doksorubicino koncentracija. Nors aiškių skirtumų tarp atsikirų tirtų hidrogelių nenustatyta, visgi stebėta tendencija, kad didesniu atsparumu doksorubicinui MCF-7 ląstelės pasižymėjo jas auginant ant 8 kPa paviršiaus (kai vaisto koncentracija $< 5 \mu\text{M}$).



3.26 pav. Ant skirtingo kietumo paviršių auginamų MCF-7 ląstelių jautrumas doksorubicino poveikiui. MCF-7 ląstelės augintos ant 1, 8 ir 40 kPa hidrogelių ir 10 GPa plastiko paviršiaus paveiktos įvairiomis doksorubicino koncentracijomis ir jų poveikis vertintas po 48 val. Taškai – vidurkiai, paklaidos – SN. Linijos tai 5 parametrų ląstelių citotoksiškumo prognostiniai modeliai.

3.3.7. Paviršiaus kietumo įtaka MAP kinazių vaidmeniui MCF-7 atsakant į doksorubicino poveikį

Imunoblotingo metodu stebėjome skirtingus MAP kinazių raiškos ir aktyvinimo profilius MCF-7 ląsteles auginant ant 1, 8 ir 40 kPa bei 10 GPa kietumų paviršių. Tikėtina, kad šios kinazės gali turėti įtaką moduluojant krūties vėžio ląstelių jautrumą doksorubicinui. Todėl toliau tyrėme, ar kinta ir, jei taip, kaip kinta šių kinazių vaidmuo MCF-7 ląstelėse priklausomai nuo aplinkos mechaninių savybių. Tuo tikslu, MCF-7 ląstelės buvo išsėjamos ant paviršių ir kitą dieną veikiamos MAP kinazių slopikliais – PD98059 (ERK), SP600125 (JNK) ir SB203580 (p38) (3.27 pav.).



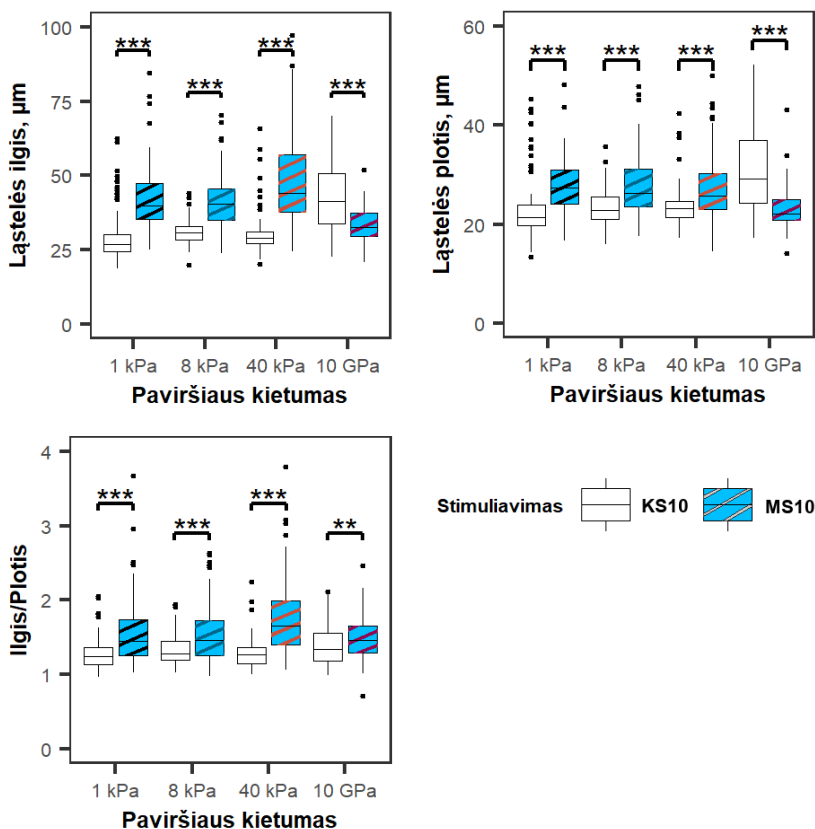
3.27 pav. Paviršiaus kietumo įtaka MAP kinazių vaidmeniui MCF-7 ląstelėms atsakant į doksorubicino poveikį. MCF-7 ląstelės buvo išsėtos ant 1, 8 ir 40 kPa paviršių ir 10 GPa plastiko paviršiaus ir kitą dieną, 30 min. prieš 2,5 μ M doksorubicino poveikį, ląstelės buvo paveiktos MAP kinazių slopikliais: 0,4 μ M PD98059 (ERK), 40 μ M SP600125 (JNK) ir 30 μ M – SB203580 (p38). Po 48 val MTT metodu įvertintas ląstelių skaičiaus pokytis ir pagal tai įvertintas ERK, JNK ir p38 MAP kinazių vaidmuo MCF-7 ląstelėse. Duomenys pavaizduoti stulpeliniais grafikais kur stulpelio aukštis – vidurkis, paklaida – SN.

Nustatėme, kad auginant MCF-7 ląsteles ant minkščiausio 1 kPa kietumo hidrogelio, visos trys tirtos MAP kinazės skatino ląstelių žūtį – jas nuslopinus net iki 50 % padidėjo ląstelių išgyvenamumas. Didėjant hidrogelių paviršiaus kietumui, ERK ir p38 MAP kinazių vaidmuo silpnėjo. Ant 8 ir 40 kPa hidrogelių augusiose ląstelėse, ląstelių žūtį iniciavo tik JNK kinazė. Tuo tarpu ant plastiko paviršiaus augusiose MCF-7 ląstelėse, JNK kinazė neturėjo reikšmingos įtakos ląstelių išgyvenamumui. Ant šio paviršiaus tik ERK skatino ląstelių žūtį. Taigi, MCF-7 ląstelėse, kaip ir prieš tai tirtose DMKL, MAP kinazių vaidmuo priklausė nuo paviršiaus kietumo.

3.3.8. Mechaninio stimuliavimo įtaka MCF-7 morfologijai

Mechaninė aplinka veikė MCF-7 ląstelių morfologiją, adheziją ir proliferaciją, tačiau jos poveikis šių ląstelių jautrumui priešvėžiniui vaistui doksorubicinui buvo silpnai išreikštas. Dėl to, siekiant geriau išsiaiškinti mechaninės aplinkos įtaką MCF-7 ląstelėms, jos buvo 10 dienų mechaniškai stimuliuotos dvejais skirtingo kietumo paviršiais – kietu ir minkštu. Pirmuoju atveju, MCF-7 ląstelės 10 dienų buvo auginamos ant 10 GPa plastiko paviršiaus, minkštai stimuliacijai jos augintos ant 1 kPa hidrogelio. Po 10 dienų, skirtingo kietumo aplinka stimuliuotos ląstelės buvo išsėtos ant tų pačių tiriamųjų hidrogelių ir kontrolinio plastiko paviršiaus ir įvertinti šių ląstelių

morfologijos pokyčiai (3.28 pav.). Gauti rezultatai parodė, kad minkštu paviršiumi stimuliuotos ląstelės daug labiau išplito ant visų tirtų hidrogelių, tiek jų ilgis, tiek plotis buvo didesni už kietai stimuliuotų MCF-7. Tuo tarpu, ant kietiausio plastiko paviršiaus labiausiai išplito kietu paviršiumi stimuliuotos ląstelės. Bendra ląstelių morfologija taip pat skyrėsi. Minkštu paviršiumi 10 d. stimuliuotos ląstelės ant visų tirtų paviršių buvo labiau ištysusios. Taigi, mechaninis MCF-7 ląstelių stimuliavimas turėjo įtakos šių ląstelių morfologijai.

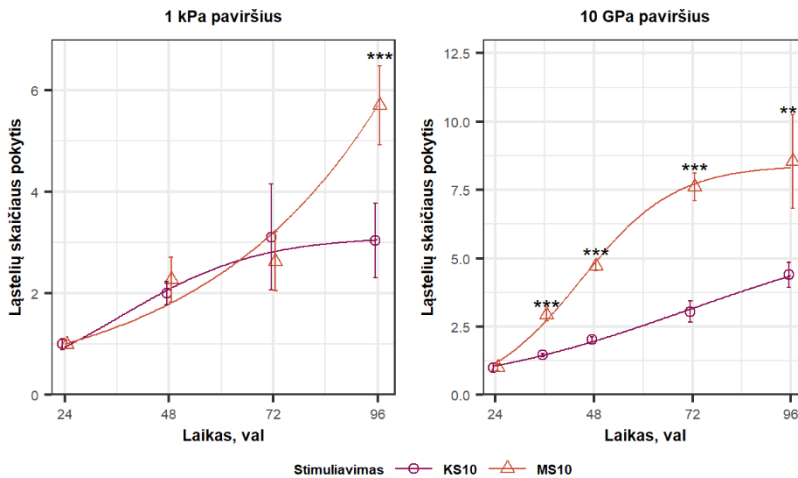


3.28 pav. Mechaninio stimuliavimo įtaka MCF-7 ląstelių morfologijai. MCF-7 ląstelės 10 dienų buvo stimuliuotos dvejais skirtingais paviršiais – kietu paviršiumi (KS10) ir minkštu paviršiumi (MS10). Duomenys pateikti dėžiniais grafikais. Juoda linija – mediana, dėžė žymi tarpkvartilinį regioną, paklaidos mažiausią ir didžiausią reikšmes. Taškais pavaizduotos iškrytos, kurios nuo medianos nutolusios didesniu nei 1,5 tarpkvartilinio regiono pločio atstumu.

3.3.9. Mechaninio stimuliavimo įtaka MCF-7 ląstelių proliferacijai

Nustatėme, kad skirtingai mechaniškai stimuliuotos ląstelės nevienodai sąveikavo su tiriamaisiais paviršiais. Todėl toliau įvertinome, ar

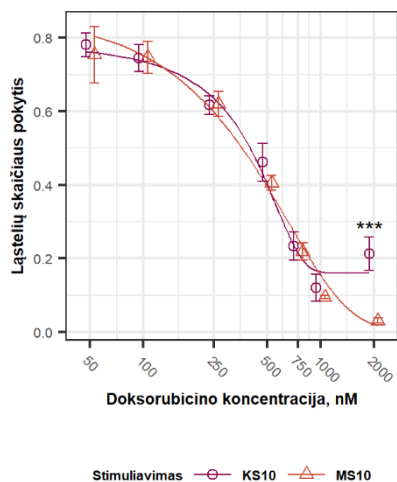
stimuliavimas kietu (10 GPa) ir minkštu (1 kPa) paviršiais turėjo įtakos MCF-7 proliferacijai. Ląstelės buvo auginamos ant stimuliacijai naudotų paviršių ir jų proliferacija buvo stebėta 96 valandas po jų išsėjimo. Proliferacijai vertinta naudojant 2.2.9 skyriuje aprašytą DAPI metodą. Kaip galima matyti iš 3.29 paveiksle pateiktų rezultatų, 10-ies dienų stimuliavimas minkštu paviršiumi lėmė padidėjusį šių ląstelių dauginimosi potencialą ant abiejų tirtųjų paviršių. Auginant ląsteles ant 1 kPa hidrogelio, skirtumai tarp grupių išryškėjo tik po 96 val, tuo tarpu minkštu paviršiumi stimuliuotos ląstelės ant 10 GPa plastiko paviršiaus pradėjo sparčiai proliferuoti ir jau po 36 tyrimo valandų buvo stebėti reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų grupių.



3.29 pav. Mechaninio stimuliavimo įtaka MCF-7 ląstelių proliferacijai. MCF-7 ląstelės 10 dienų buvo stimuliuotos dvejais skirtingais paviršiais – kietu paviršiumi (KS10) ir minkštu paviršiumi (MS10). Po to kietu ir minkštu paviršiumi stimuliuotos ląstelės buvo išsėtos ant minkšto (1 kPa) ir kieto (10 GPa) paviršių ir jų skaičiaus pokytis vertintas po 24, 36 (tik ant kieto paviršiaus), 48, 72 ir 96 val. Proliferacija įvertinta 2.2.9 skyriuje aprašytu DAPI metodu. Duomenys pavaizduoti taškiniais grafikais, kur taškai – vidurkiai, paklaidos SN. Linijos tai 5 parametų ląstelių citotoksiškumo prognostiniai modeliai.

3.3.10. Mechaninio stimuliavimo įtaka MCF-7 ląstelių jautrumui doksorubicino poveikiui

Pabaigoje įvertinome, ar MCF-7 ląstelių stimuliavimas minkštu paviršiumi daro įtaką jų jautrumui doksorubicino poveikiui vėliau jas auginant ant kieto plastiko paviršiaus (3.30 pav.). Kaip galima matyti iš gautų rezultatų, ląstelių jautrumas padidėjo tik paveikus jas didesnėmis doksorubicino koncentracijomis. Iki 1000 nM doksorubicino koncentracijų, mechaninis stimuliavimas ryškaus poveikio MCF-7 ląstelių jautrumui neturėjo.



3.30 pav. Mechaninio stimuliavimo įtaka MCF-7 ląstelių jautrumui doksorubicinui. MCF-7 ląstelės 10 dienų buvo stimuliuotos dvejais skirtingais paviršiais: kietu paviršiumi – KS10 ir minkštu paviršiumi – MS10. Po to kietu ir minkštu paviršiumi stimuliuotos ląstelės buvo išsėtos ant minkšto (1 kPa) ir kieto (10 GPa) paviršių ir jų skaičiaus pokytis vertintas po 48 val. doksorubicino poveikio. Citotoksiškumas įvertintas MTT metodu. Duomenys pavaizduoti taškiniais grafikais, kur taškai – vidurkiai, paklaidos SN. Linijos tai 5 parametru ląstelių citotoksiškumo prognostiniai modeliai.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

4.1. Metodas ląstelių skaičiaus įvertinimui 2D–3D aplinkose

Auginant ląsteles 3D aplinkoje yra labai svarbu gebėti sekti jų skaičiaus kitimą, leidžiantį tinkamai įvertinti ląstelių generuojamus signalus į įvairius išorės poveikius [309]. Šiuo metu, didžioji dalis metodų, sukurtų ląstelių skaičiui įvertinti, tinka tik 2D aplinkai. Jų veikimas yra pagrįstas ląstelių metabolizmo procesų matavimu, su ląstelių skaičiumi koreliuojančių molekulių koncentracijos matavimu ar tiesiog ląstelių vizualiu skaičiavimu [310–312]. Dauguma šių metodų puikiai tinka darbui 2D aplinkoje, bet yra nesuderinami su ląstelių skaičiaus vertinimu 2,5D ir 3D aplinkose [313,314]. Gantenbein-Ritter su kolegomis atliko tyrimą, kurio metu palygino trijų ląstelių skaičiaus vertinimo metodų tikslumą 3D aplinkoje – ląstelių dažymą tripano mėliu ir skaičiavimą hemocitometru, laktato dehidrogenazės aktyvumo matavimo ir kalceino AM/etidžio homodimero-1 dažymo metodus [315]. Visi šie metodai buvo suderinami su ląstelių skaičiaus vertinimu 3D aplinkoje, tačiau jų atlikimui reikėjo panaudoti virškinimo fermentus, kurie, savo ruožtu, lėmė ganėtinai dideles ląstelių skaičiaus paklaidas. Be to, metodai, kurių atlikimui naudojami šie fermentai, turi polinkį santykinai padidinti gyvų ląstelių skaičių žuvusių ląstelių sąskaita [316]. Kitame tyrime buvo vertinamas rezasurino dažą naudojančio metodo efektyvumas ląstelių, augintų porėtose 3D struktūrose, skaičiaus nustatymui [317]. Kadangi šis metodas yra pagrįstas ląstelių metabolizmo efektyvumo vertinimu, jis nėra tinkamas tuose tyrimuose, kuriuose keičiasi ląstelių metabolinis aktyvumas. O tokių tyrimų audinių inžinerijos srityse yra labai daug. Auginant ląsteles 3D struktūrose, taip pat inicijuojant ląstelių diferenciaciją, tiek ląstelių proteomas, tiek ir metabolizmas kinta bei prisitaiko prie naujos aplinkos sąlygų, tad ląstelių metabolizmo efektyvumo matavimais pagrįsti metodai nėra tinkami ląstelių skaičiaus vertinimui 3D aplinkoje [317]. Tuo tarpu DNR molekulių skaičius ląstelėse yra pakankamai pastovus. Jis kinta tik ląstelei dalijantis, tam tikrų vėžinių ląstelių atveju gali susidaryti nevienodas chromosomų kopijų skaičius tarp skirtingų ląstelių, taip pat pvz. raumeninės diferenciacijos atveju susidaro daugiabranduolinės ląstelės [318]. Tačiau daugeliu atveju, DNR kiekis ląstelėje tiesiogiai koreliuoja su ląstelių skaičiumi. Dėl šių priežasčių vis daugėja metodų, kurie yra pagrįsti ląstelių visuminės DNR kiekio vertinimu [319–321]. Šios disertacijos dalies tikslas buvo sukurti metodą, pagrįstą DNR koncentracijos matavimu, kuris būtų tinkamas 2,5 ir 3D aplinkoje auginamų ląstelių skaičiaus nustatymui. DNR kiekio įvertinimui pasitelkėme plačiai ląstelių tyrimuose naudojamą DAPI dažą. Kadangi, tam

tikrais atvejais bendras DNR kiekis gali skirtis skirtinguose ląstelių tipuose, mūsų sukurto metodo efektyvumas buvo įvertintas panaudojant platų spektrą skirtingos kilmės ląstelių – dvi vėžio kilmės ląstelių linijas (žmogaus krūties vėžio linija MCF-7 ir pelės hepatomos vėžio linija MH-22a), pelių embrionų fibroblastų liniją Swiss 3T3 bei pirmines iš žiurkių dantų pulpos išskirtas mezenchiminės kamieninės ląstelės DPKL. Tyrimo metu buvo įvertinta skirtingų genomų ilgio (žmogaus, pelės ir žiurkės), taip pat poliploidinių genomų, būdingų vėžinėms ląstelėms, įtaka metodo jautrumui ir tinkamumui.

Tuo tikslu, pradžioje buvo vertinama dviejų skirtingų sudėčių (NDS ir Triton-X100) ląstelių lizės buferinių tirpalų įtaka DAPI foninei fluorescencijai. Abiejų detergentų koncentracijoms didėjant, didėjo ir DAPI foninis signalas (nesant tirpale DNR), tačiau su NDS detergentu pastebėti du tiesiniai procesai. Esant didesnei nei 0,02 % NDS koncentracijai DAPI fluorescencijos signalas smarkiai sustiprėjo nei lyginant su mažesnėmis NDS koncentracijomis. Yra žinoma, kad NDS gali suformuoti mices, kurių viduje susidaro hidrofobinė aplinka. Į šią aplinką patekus DAPI dažo molekulių fluorescencijos signalas smarkiai išauga [322,323]. Triton-X100 atveju, didėjant detergento koncentracijai, DAPI foninis fluorescencijos signalo stiprumas taip pat didėjo ir procesas buvo tiesinis visame tirtame koncentracijų intervale.

DAPI yra DNR specifinis dažas. Jam susijungus su DNR, DAPI sužadavimo koeficientas išauga ~20 kartų, tuo tarpu susijungus DAPI su RNR, sužadavimo koeficientas beveik nepakinta ir fluorescencijos emisijos maksimumas pasislenka link 500 nm, kai tuo tarpu DAPI susijungimo su DNR atveju, emisijos maksimumas būna ties 460 nm bangos ilgiu [324,325]. Šios DAPI dažo savybės lemia platų jo pritaikymą ląstelių branduolių dažymui. Tačiau, esant labai mažoms DNR koncentracijomis, DNR-DAPI nulemtų sąveikų metu DAPI fluorescencija kinta netiesiškai, o tai neleidžia tiksliai įvertinti mažų DNR kiekių. Tačiau mūsų tyrimo atveju, panašu, tai neturėjo įtakos matuojant net nedidelius ląstelių skaičius. Tiriant Swiss 3T3 ląstelių skaičių, nustatyta tiesinė DAPI fluorescencijos signalo priklausomybė nuo ląstelių skaičiaus dideliame, net 200–100 000 ląstelių, intervale. Toks platus intervalas gali būti nesunkiai pritaikytas plačiam spektrui tyrimų, kurių metu svarbu įvertinti ląstelių skaičių. Tačiau, dėl genomų ilgių skirtumų ir vėžinėms ląstelėms būdingo genomo poliploidiskumo, vienodas ląstelių skaičius generavo skirtingo stiprumo DAPI fluorescenciją [326,327]. Todėl norint taikyti šį metodą pirmausia reiktų įsivertinti, kokiame ląstelių intervale DAPI fluorescencijos signalas tiesiškai priklauso nuo ląstelių skaičiaus. Kaip matyti iš tiesinių modelių, vėžinių ląstelių atveju, šis metodas buvo beveik dvigubai

jautresnis (k koeficientai MCF-7 ir MH-22a – 0,0047 ir 0,0041 atitinkamai), nei lyginant su kamieninėmis ląstelėmis (k koeficientai Swiss 3T3 ir DPSC 0,0021 ir 0,0026 atitinkamai).

Pastebėtina, kad mūsų pasiūlytas metodas negali atskirti gyvų ir žuvusių ląstelių, todėl nėra tinkamas vertinti ląstelių žūties sukeltiems ląstelių skaičiaus pokyčiams, tačiau sėkmingai buvo išbandytas vertinant pirminių DPKL ląstelių proliferaciją ant trijų tipų paviršių – 2D plastiko paviršiaus bei 3D spausdinimo būdu gautų 2,5D ir 3D paviršių. Kadangi šis metodas nėra pagrįstas ląstelių metabolizmo matavimu, jis gali būti plačiai naudojamas įvairiuose diferenciacijos tyrimuose, taip pat yra tinkamas mažai metaboliškai aktyvioms ląstelėms tirti. Be to, skirtingų detergentų tyrimai parodė, kad ląsteles galima lizuoti keliomis stadijomis, pvz. iš pradžių lizės buferiu savo sudėtyje turinčiu 0,02 % Triton-X100 galima ištirpinti ląstelių membraną ir viduląstelinį baltymus, o vėliau panaudojus lizės buferinį tirpalą su 0,02 % NDS detergentu galima baigti sulizuoti ląstelių branduolius. Taip vieno eksperimento metu būtų galima vertinti keletą aspektų, pvz. galima įvertinti šarminės fosfatazės fermentinį aktyvumą ir išmatuoti ląstelių skaičių viename mėginyje.

4.2. DMKL jautrumas oksidaciniam stresui skirtingo kietumo mechaninėse aplinkose

Mezenchiminės kamieninės ląstelės yra plačiai naudojamos įvairių ligų gydymui ir pažeistų audinių regeneracijai [328–334]. Pažeistuose audiniuose vyksta įvairūs stresą indukuojantys procesai. Vienas jų - oksidacinis stresas. Literatūroje aprašoma daug būdų, skirtų sumažinti žalingą oksidacinio streso poveikį ląstelėms, pvz. audinių inžinerijoje yra naudojami karkasai praturtinti antioksidantais, ląstelių terapijoje kamieninės ląstelės prieš gražinimą atgal į organizmą yra auginamos antioksidantų turinčiose mitybinėse terpėse [128,335–339]. Tačiau, nepaisant šių pastangų, didžioji dalis ląstelių gražintų į organizmą žūva arba kamieninėse ląstelėse oksidacinis stresas inicijuoja senėjimo procesus, kurie lemia suprastėjusias regeneracines bei imunomoduliacines šių ląstelių funkcijas [128,340,341].

Mezenchiminės kamieninės ląstelės randamos įvairiuose audiniuose, kurie turi jiems specifinę mechaninę aplinką [340,342]. Ši audinio mechaninė aplinka yra labai svarbi jo homeostazei, todėl net nedideli nuokrypiai gali sukelti negrįžtamus žalingus audinių pokyčius [300,343–345]. Vėžinių susirgimų atveju taip pat stebimas audinio užląstelinio užpildo kietėjimas, kuris lemia padidėjusį vėžinių ląstelių atsparumą daliai priešvėžinių vaistų [346–348]. Tai rodo, kad mechaninės aplinkos poveikis tiek vėžinėms, tiek

kamieninėms ląstelėms yra labai svarbus. Nepaisant to, kol kas beveik nėra duomenų apie mechaninės aplinkos įtaką MKL atsparumui oksidacinio streso poveikiui, nors šios ląstelės jau yra plačiai naudojamos audinių inžinerijoje ir ląstelių terapijoje [328–330]. Dėl to, šio tiriamojo darbo dalyje įvertinome, kaip keičiasi DMKL jautrumas oksidaciniam stresui priklausomai nuo paviršiaus, ant kurio jos buvo auginamos, kietumo. Mūsų rezultatai parodė tiesioginę koreliaciją tarp paviršiaus kietumo ir DMKL jautrumo oksidaciniam stresui – kuo kietesnis paviršius, tuo atsparesnės DMKL buvo vandenilio peroksido indukuotam oksidaciniam stresui.

Ląstelės mechaninės aplinkos pokyčius jaučia dėka keturių pagrindinių sistemų – mechanojautrių jonų kanalų, fokolinių adhezijų, tarpląstelių sąveikos kompleksų bei branduolio-citoskeleto jungčių kompleksų [2,9,349]. Dalyvaujant šioms sistemoms ląstelėse yra inicijuojami įvairūs signaliniai keliai, reguliuojantys jų elgesį ir likimą. Ląstelės jaučia padidėjusį užląstelinės aplinkos kietumą ir atsako į pokyčius padidindamos savo sąveikos su užląstelinio užpildu stiprumą bei padidindamos savo citoskeleto įtempį dalyvaujant aktino-miozino kompleksui [189,350]. Tai lemia ląstelių adhezijos ir morfologijos pokyčius. Mūsų gauti duomenys taip pat patvirtino šiuos procesus DMKL – nuo paviršiaus kietumo priklausė DMKL adhezija ir morfologija. Ant kuo kietesnio paviršiaus ląstelės augo, tuo greičiau jos kibo prie paviršiaus ir tuo labiau ant jo išplito. Ši ląstelių adhezijos ir morfologijos priklausomybė nuo auginimo paviršiaus kietumo būdinga ne tik DMKL, bet ir iš kitų audinių išskirtoms MKL [351–353].

Paviršiaus kietumas taip pat turi įtakos MKL proliferacijai. Ląstelės yra linkusios proliferuoti greičiau ant kietesnių paviršių, tačiau šis procesas nėra linijinis ir gali priklausyti nuo konkretaus ląstelių tipo [351,353]. Pavyzdžiui, suaugusio individo nervinės kilmės kamieninės ląstelės greičiau proliferuoja ant vidutinio kietumo (3,5 kPa) paviršių nei ant kietesnių (10 ir 30 kPa) karkasų [354]. Mūsų tirtų DMKL proliferacijos greitis taip pat priklausė nuo paviršiaus kietumo – ant kuo kietesnio hidrogelio ląstelės buvo auginamos, tuo greičiau jos proliferavo. Greičiausiai ląstelės dalijosi ant 40 kPa kietumo hidrogelio, kurio mechaninės savybės yra panašios į dantenų audinio (~25 kPa). Tačiau ant kietiausio (10 GPa) plastiko paviršiaus augintos ląstelės dalijosi panašiai kaip ir ant vidutinio (8 kPa) kietumo hidrogelio augintos DMKL. Tyrimams naudoti hidrogeliai buvo dengti I tipo kolagenu, kai tuo tarpu plastikinis paviršius buvo padengiamas vitronektinu ir fibronektinu, kurių šaltinis – auginimo terėje esantis FVS. Akivaizdu, ląstelės yra linkusios geriau kibti prie kolagenu dengtų paviršių nei prie plastikinio paviršiaus, ypač pirmosiomis valandomis po išsėjimo [355]. Todėl, ne tik paviršiaus

mechaninės savybės, bet ir pačių ląstelių gebėjimas su juo sąveikauti turi įtakos ląstelių procesams. Be to, nors DMKL buvo linkusios proliferuoti greičiau ant kietesnių karkasų, tačiau šis procesas nebuvo tiesinis ir gali būti nulemtas mezenchiminių ląstelių šaltinio.

Oksidacinis stresas indukuotas vandenilio peroksidu lėmė MAP kinazių raiškos ir fosforilavimo pokyčius. Tačiau paviršiaus kietumas skirtingai veikė atskiras MAP kinazes. Taipogi, visos MAP kinazės buvo atsakingos už ląstelių išgyvenimo skatinimą, tačiau tik p38 MAP kinazė buvo svarbi audinių kietumus atitinkančių hidrogelių atvejais. ERK ir JNK skatino tik ant plastiko paviršiaus augintų ląstelių išgyvenimą. Šie rezultatai parodo, kaip svarbu yra pasirinkti tinkamą ląstelių tyrimų modelį, kuris leistų tinkamai prognozuoti *in vivo* rezultatus [356].

Taip pat ištyrėme, kaip nuo aplinkos kietumo priklauso transkripcijos veiksnio AP-1 komponentų c-Jun ir c-Fos raiška ir aktyvinimas oksidacinio streso poveikyje. Įdomu tai, kad tik c-Jun raiškos ir fosforilinimas kito paveikus ant skirtingų kietumų paviršių augintas ląsteles oksidaciniu stresu. Tuo tarpu, c-Fos raiška beveik nekito. Yra žinoma, kad AP-1 gali būti sudarytas iš c-Jun šeimos homodimerų arba c-Jun/c-Fos šeimų heterodimerų [357]. Nuo AP-1 sudėties priklauso sąveikos su DNR stiprumas. AP-1 sudarytas iš c-Jun/c-Fos heterodimero su DNR sąveikauja stipriau nei c-Jun homodimeras. Tačiau, dažniausiai, pradiniam atsake dalyvauja c-Jun homodimeras, o c-Jun/c-Fos heterodimeras stebimas vėlyvesnio atsako metu [357,358]. Kadangi vertiname baltymų raiškos pokyčius praėjus valandai po poveikio vandenilio peroksidu, gali būti, kad c-Jun/c-Fos heterodimeras dar nebuvo inicijuotas. Tuo tarpu, c-Jun raiška ir aktyvinimas tiesiogiai koreliavo su MAP kinazės p38 pilnos ir fosforilintos formos kiekiu, o tai sufleruoja, kad būtent p38 inicijuoja c-Jun raišką ir fosforilinimą DMKL oksidacinio streso metu.

Mūsų tirtų atveju, geriausiai pasirodė DMKL, augintos ant 40 kPa kietumo paviršių. Šios ląstelės greičiausiai tvirtinosi prie paviršiaus ir suformavo daugiausiai fokolinių adhezijų. Taip pat, ant 40 kPa augusios DMKL greičiausiai dauginosi ir buvo atsparesnės oksidaciniam stresui, lyginant su ant kitų hidrogelių augusiomis ląstelėmis. Sveikas dantenų audinys yra apie 25 kPa kietumo. Iš visų mūsų tirtų skirtingo kietumo hidrogelių, 40 kPa hidrogelis savo mechaninėmis savybėmis buvo artimiausias dantenų audiniui, todėl, tikėtina, kad į dantenų audinį panašios paviršiaus mechaninės savybės būtent ir nulėmė tokią ląstelių elgseną ant šio paviršiaus. Tačiau, vis dar yra per mažai žinoma, kad būtų galima tai patvirtinti ar paneigti. Skirtingų šaltinių MKL, jas auginant ant plastiko

paviršiaus, į oksidacinį stresą reaguoja panašiai [359,360]. Mūsų tyrimas parodė, kad DMKL MAP kinazių raiška ir aktyvinimas skyrėsi jas auginant ant skirtingų kietumų paviršių. Taip pat, skyrėsi ir jų vaidmuo ląstelėms atsakant į oksidacinį stresą. p38 MAPK, kuri buvo svarbi ląstelių išgyvenimui, kai DMKL buvo auginamos ant audiniams būdingų kietumų paviršių, neturėjo didelės įtakos šių ląstelių išgyvenimui jas auginant ant plastikinio 10 GPa paviršiaus. Ląstelių terapijoje smegenų (0,5–1,5 kPa) ir plaučių (0,6–5,1 kPa) audiniuose vykstančių, oksidacinio streso inicijuotų procesų malšinimui yra naudojamos iš kaulų čiulpų (0,1–10,9 kPa) ir riebalinio audinio (~2 kPa) išskirtos MKL. Abu MKL šaltiniai turi palyginamas audinių mechanines savybes, kaip ir gydomi audiniai. Taigi, jeigu MKL jautrumas oksidaciniam stresui skirtingose mechaninėse aplinkose priklauso nuo jų pirminio audinio mechaninių savybių, į tai atsižvelgiant būtų galima padidinti tiek ląstelių terapijos, tiek ir audinių inžinerijos efektyvumą [331,361–365].

4.3. Paviršiaus kietumo įtaka MCF-7 ląstelių atsparumui doksorubicinui

2020 m. pasaulyje buvo diagnozuota daugiau nei 19,3 milijonai naujų vėžinių susirgimų ir net 10 milijonų mirčių. Dažniausiai diagnozuojamas vėžinis susirgimas yra krūties vėžys (2,3 milijonai naujų atvejų), po jo seka plaučių (2,2 milijonai naujų atvejų) ir prostatos (1,4 milijonai naujų atvejų) vėžiniai susirgimai. Daugiausiai gyvybių nusinešė plaučių (1,79 milijonai mirčių), kepenų (0,8 milijonai mirčių) ir skrandžio (0,7 milijonai mirčių) vėžiniai susirgimai [366]. 2020 m. duomenimis, JAV tik širdies ir kraujagyslių ligos nusinešė daugiau gyvybių [367]. Taigi, vėžiniai susirgimai išlieka viena iš pagrindinių mirties priežasčių pasaulyje. Ir nors šiuo metu yra sukurta daug naujų inovatyvių vėžio gydymo metodikų, vis dar ieškoma naujų, terapinių potencialą turinčių, sprendimų. Vienas jų – pastaruoju metu daug dėmesio vėžinių susirgimų tyrimuose susilaukusi mechanobiologija [187], kuri tiria kaip užląstelinio užpildo bei audinio ląstelių mechaninės savybės veikia įvairius ląstelių procesus. Yra žinoma, kad mechaninė aplinka daro įtaką vėžinių ląstelių standumui, migracijai, poliarizacijai, žūčiai ir išgyvenimui, citoskeleto ir organelių organizacijai ir net genų raiškai [187]. Dėl to, mechanojutime dalyvaujantys baltymų kompleksai ir jų inicijuojami signaliniai keliai gali būti naujais terapiniais taikiniais. Tikimasi, kad vėžio mechanobiologijos tyrimai atskleis procesus, vykstančius vėžinėse ląstelėse joms atsakant į priešvėžinius vaistus bei padės išsiaiškinti metastazavimo mechanizmus. Tikimasi, kad šios žinios leis pagerinti vėžinių susirgimų gydymo veiksmingumą. Dėl to, šioje darbo dalyje tyrėme, kokią įtaką krūties vėžio ląstelių linijai MCF-7 turi skirtingo kietumo poliakrilamidiniai paviršiai,

atitinkantys organizmo minkštuosius, vidutinio kietumo ir kietuosius audinius. Taip pat, įvertinome, ar mechaninė aplinka daro įtaką vieno populiariausių krūties vėžio gydymui naudojamam vaistui, doksorubicinui, efektyvumui.

Mūsų rezultatai parodė, kad mechaninė aplinka svarbi krūties vėžio MCF-7 ląstelių linijai – net sąlyginai trumpai ant hidrogelių augintos ląstelės pradėjo elgtis kitaip nei ant plastiko paviršiaus. Nuo paviršiaus kietumo priklausė MCF-7 ląstelių adhezijos kinetika, morfologija ir netgi proliferacija. Tokie patys pokyčiai buvo pademonstruoti ir kitose vėžinėse ląstelėse naudojant įvairiai struktūrizuotus paviršius, PDMS mikroskysčių sistemas [9,296,368–371]. Šie procesai reguliuojami dalyvaujant įvairiems signaliniams keliams, įskaitant ir Rho-ROCK-Miozino bei YAP/TAZ signalinius kelius [371,372].

Paviršiaus kietumas taip pat lėmė skirtingus MAP kinazių raiškos ir aktyvinimo profilius MCF-7 ląstelėse. Nustatėme, kad fosfo-FAK kiekis ląstelėse priklausė nuo paviršiaus kietumo ant kurio MCF-7 buvo auginamos, o tai galėjo turėti įtakos skirtingam MAPK kiekiui ir aktyvinimui skirtingo kietumo aplinkose [373]. Kadangi MAP kinazės reguliuoja įvairius ląstelėse vykstančius procesus, tarp jų ir ląstelių žūtį bei išgyvenimą, todėl įvertinome, ar skirtingi MAP kinazių raiškos ir aktyvinimo pokyčiai darė įtaką šių MAP kinazių vaidmeniui vėžinėms ląstelėms atsakant į doksorubicino poveikį skirtingo kietumo aplinkose. Iš tiesų, nuo paviršiaus kietumo, ant kurio augo MCF-7 ląstelės, priklausė ir MAPK vaidmuo. Visos trys MAP kinazės – ERK, JNK ir p38 – buvo atsakingos už ląstelių žūties reguliavimą esant minkščiausiai 1 kPa aplinkai, tuo tarpu ant kietesnių hidrogelių – 8 ir 40 kPa, augintose ląstelėse tik JNK kinazė darė reikšmingą įtaką ląstelių skaičiaus pokyčiui. Ši kinazė ant visų tirtų hidrogelių skatino ląstelių žūtį. Tuo tarpu, ant kieto 10 GPa plastiko paviršiaus nei JNK, nei p38 MAP kinazės neturėjo aiškiai išreikštos rolės atsakant ląstelėms į doksorubicino poveikį. Tačiau MAP kinazė – ERK, buvo atsakinga už ląstelių žūties inicijavimą ir ant plastiko augintose MCF-7 ląstelėse. Yra žinoma, kad padidėjusi MAP kinazių raiška ir aktyvinimas krūties vėžio atveju yra siejamas su didesne mirties rizika, blogesne prognoze [374]. Kadangi ant minkštesnių paviršių stebėtas MAP kinazių raiškos ir aktyvinimo sumažėjimas, tai galėjo lemti pasikeitusi šių kinazių vaidmenį.

Nustatėme, kad paviršiaus kietumas turėjo įtakos ir MCF-7 ląstelių atsparumui doksorubicino poveikiui, tačiau šis efektas nebuvo aiškiai išreikštas. Tik esant $>10\ \mu\text{M}$ chemoterapinio vaisto koncentracijai stebėti skirtumai tarp ant hidrogelių ir ant plastiko augintų ląstelių skaičiaus pokyčio.

Siekiant detalizuoti mechaninės aplinkos svarbą, nusprendėme 10 dienų tiriamas krūties vėžio ląsteles stimuliuoti skirtingo kietumo aplinka. Tuo tikslu, ląstelės nustatytą laiko tarpą buvo auginamos arba ant minkščiausio 1 kPa hidrogelio ir kietiausio 10 GPa plastiko paviršiaus. Šis ląstelių mechaninis stimuliavimas minkštu paviršiumi turėjo įtakos jų morfologijai ant tirtų skirtingų kietumų paviršių. 1 kPa paviršiumi stimuliuotos ląstelės buvo labiau išplitusios ant visų tirtų hidrogelių, tuo tarpu su plastikiniu paviršiumi stipriau sąveikavo kietu paviršiumi stimuliuotos MCF-7 ląstelės. Šie skirtumai galėjo būti nulemti ląstelių mechaninės atminties [375]. Yra žinoma, kad po 10 dienų MKL auginimo ant kieto paviršiaus, jos išsėjus ant minkšto, jos toliau elgiasi it augtų ant kieto paviršiaus [298,375]. Šiuo atveju, su krūties vėžio ląstelių linija MCF-7 mes pademonstravome atvirkšią procesą. YAP/TAZ baltymų ląstelinis pasiskirstymas taip pat priklauso nuo ląstelių auginimo aplinkos [376–378]. Auginant MCF-7 ląsteles ant minkštų paviršių, YAP/TAZ telkiasi ląstelių citoplazmoje, tuo tarpu auginant ant kietų paviršių – branduolyje. Šiuo atveju, YAP/TAZ kompleksas veikia kaip reostatas ir jo pasiskirstymo skirtumai leidžia ląstelėms jausti ir prisitaikyti prie kintančios mechaninės aplinkos [66,379]. Tai reiškia, kad 10 dienų laikotarpis MCF-7 stimuliuojant minkšta aplinka yra pakankamas, kad MCF-7 labiau prisitaikytų augti minkštoje aplinkoje, nei tik ant kieto paviršiaus augintos ląstelės.

Mechaninis stimuliavimas taip pat turėjo įtakos MCF-7 ląstelių proliferacijai. Minkštai stimuliuotos ląstelės greičiau dalijosi tiek ant minkšto, tiek ant kieto paviršiaus. Tą galėjo lemti YAP/TAZ baltymo pasiskirstymas. Yra žinoma, kad YAP/TAZ kontroliuoja įvairius procesus ląstelėse, tarp jų ir proliferaciją [380,381]. Kietėjant paviršiui mes stebėjome didėjančią MAP kinazių raišką, kuri taip pat reguliuoja ląstelių proliferacijos procesus.

Mechaninis stimuliavimas lėmė ląstelių jautrumo padidėjimą doksorubicinui. Tiek minkštai, tiek kietai stimuliuotos ląstelės apie 10 kartų buvo jautresnės doksorubicino poveikiui nei nestimuluotos MCF-7 ląstelės. Tai galėjo nulemti taikyta tyrimo metodiką. Iš karto po stimuliacijos, ląstelės buvo užšaldomos ir atšildomos prieš pat eksperimentą. Perkeltos ant tiriamo paviršiaus ląstelės jau po 24 valandų buvo veikiamos tiriamosiomis vaisto koncentracijomis. Tačiau, kadangi buvo tiriama ir kietai stimuliuota kontrolė, tai leido tinkamai įvertinti stimuliacijos bei ląstelių užšaldymo–atšildymo poveikį doksorubicino jautrumui. Kietai stimuliuotos ląstelės tik esant didesnėms koncentracijoms buvo atsparesnės šio vaisto poveikiui. Tai parodė, kad mechaninės aplinkos kietumas silpnai veikė ląstelių atsaką į doksorubicino poveikį. Qin su kolegomis, atlikę panašius tyrimus su kita krūties vėžio ląstelių linija MDA-MB-231, gavo priešingus rezultatus [382].

Šiuo atveju, MDA-MB-231 tyrėjai augino ant 10, 38 ir 57 kPa poliakrilamidinių hidrogelių ir nustatė, kad 38 kPa paviršius beveik padvigubino ląstelių atsparumą doksorubicino poveikiui. Tuo tarpu, mūsų tyrime naudoti panašaus kietumo paviršiai (8 ir 40 kPa) neturėjo reikšmingesnio poveikio. Ant 10 ir 8 kPa augintos ląstelės demonstravo labai panašų, nuo doksorubicino priklausomą ląstelių citotoksiškumą. Taigi, arba šio tyrimo duomenys prieštarauja mūsų gautiems rezultatams, arba nedidelis ~2 kPa kietumų skirtumas galėjo turėti reikšmingos įtakos ląstelių jautrumui doksorubicino poveikiui. Gautus skirtumus galimai būtų galima būtų paaiškinti ir šių dviejų ląstelių linijų skirtumais – MDA-MB-231 neturi PR, ER ir ŽEAV2R (sudaro 15–20 % visų krūties vėžio atvejų), kai tuo tarpu MCF-7 neekspresuoja tik ŽEAV2R žymens (~70 % visų krūties vėžio atvejų) [231,383]. Taipogi, MDA-MB-231 yra daug invazyvesnė krūties vėžio ląstelių linija, kuriai būdinga padidėjusi užląstelinio užpildo proteazių raiška, kai tuo tarpu, MCF-7 metastazės nėra labai būdingos ir pelėse jos išsivysto tik padidinus estrogeno kiekį [384,385]. Galimai šie skirtumai lemia ir šių dviejų krūties vėžio ląstelių linijų skirtingą reakciją į mechaninius veiksnius.

Kitame tyrime, analizuojant ant minkštų (0,2 ir 2 kPa) alginato matrigelių auginamas MCF-7 ląsteles nebuvo nustatyta ryškesnė aplinkos kietumo įtaka ląstelių jautrumui doksorubicino poveikiui [386]. Taigi, galime teikti, kad mechaninė aplinka visgi daro įtaką MCF-7 ląstelėms – priklausomai nuo aplinkos kietumo keičiasi ląstelių adhezija, morfologija ir proliferacija. Taip pat kinta ir MAP kinazių raiška bei aktyvinimas, suformuotų fokolinių adhezijų skaičius. Tačiau, mechaninė aplinka turėjo tik nežymų poveikį MCF-7 ląstelių jautrumui doksorubicino poveikiui. Net papildomai 10 dienų minkštai stimuliuotos ląstelės panašiai reagavo į doksorubicino poveikį. Gali būti, kad doksorubicino veikimo mechanizmas yra nepriklausomas nuo mechaninių veiksnių įtakos šioje krūties vėžio ląstelių linijoje.

IŠVADOS

1. Sukurtas metodas, pagrįstas DAPI sąveika su DNR, leidžiantis įvertinti ląstelių skaičių 2D, 2,5D ir 3D aplinkose, nepriklausomai nuo ląstelių metabolizmo. Šiuo metodu negalima atskirti gyvų ir žuvusių ląstelių, todėl jis nėra tinkamas vertinti poveikiams, sukeliantiems ląstelių žūtį. Prieš taikant šį metodą rekomenduotina įvertinti, kokiam ląstelių skaičiaus intervale DAPI fluorescencijos signalas tiesiškai priklauso nuo ląstelių skaičiaus.
2. Žmogaus dantenų mezenchiminių kamieninių ląstelių adhezija, morfologija, suformuotas fokolinių adhezijų skaičius, proliferacija, MAPK raiška ir aktyvinimas priklauso nuo paviršiaus kietumo – nustatytas optimalus paviršiaus kietumas šioms ląstelėms – 40 kPa hidrogelis. Paviršiaus mechaninės savybės taip pat daro įtaką dantenų mezenchiminių kamieninių ląstelių atsparumui oksidacinio streso poveikiui – kuo paviršius kietesnis, tuo mezenchiminės kamieninės ląstelės atsparesnės oksidaciniam stresui.
3. MAPK vaidmuo mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse kinta keičiantis paviršiaus mechaninėms savybėms. Nustatyta, kad ant skirtingų audinių kietumus atitinkančių paviršių augintose dantenų mezenchiminėse kamieninėse ląstelėse p38 MAPK atsakinga už ląstelių išgyvenimo skatinimą, kai tuo tarpu ERK ir JNK MAPK neturi aiškaus vaidmens. Tačiau ant plastiko paviršiaus stebėta priešinga tendencija – JNK ir ERK skatina ląstelių išgyvenimą, o p38 neturi aiškos funkcijos.
4. MCF-7 ląstelių adhezija, morfologija ir suformuotų fokolinių adhezijų skaičius, proliferacija, FAK ir MAPK raiška bei fosforilinimas priklauso nuo paviršiaus mechaninių savybių, tačiau mechaninės aplinkos savybės beveik neturi įtakos šių ląstelių atsakui į chemoterapinio vaisto doksorubicino poveikį – nustatytas tik nežymus MCF-7 ląstelių jautrumo doksorubicinui didėjimas mažėjant paviršiaus kietumui.
5. MAPK vaidmuo krūties vėžio linijos MCF-7 ląstelėse kinta keičiantis paviršiaus mechaninėms savybėms. Nustatyta, kad ant minkščiausio, 1 kPa paviršiaus visos trys MAPK atsakingos už ląstelių žūties iniciavimą. Kietėjant hidrogelio paviršiui, tik JNK išlaiko šį savo vaidmenį, kai tuo tarpu ERK ir p38 aiškiai išreikštos funkcijos ant kietesnių hidrogelių neturi. Tuo tarpu ant plastiko paviršiaus, tik ERK kinazė atsakinga už žūties iniciavimą.

6. Mechaninis stimuliavimas minkšta aplinka reikšmingai veikia tirtų krūties vėžio ląstelių morfologiją ir proliferaciją – šios ląstelės daug geriau sąveikauja su hidrogeliais nei kietu paviršiumi stimuliuotos ląstelės. Minkštu paviršiumi stimuliuotos ląstelės pasižymi daug didesniu proliferacijos potencialu tiek minkštoje, tiek kietoje aplinkoje. Tačiau mechaninis stimuliavimas neturi aiškiai išreikštos įtakos MCF-7 ląstelių jautrumui doksorubicino poveikiui kietoje aplinkoje. Skirtumai nustatomi tik ląsteles paveikus didžiausia doksorubicino koncentracija.

MOKSLINIAI PASIEKIMAI

Mokslinės publikacijos disertacijos tema:

1. Šimoliūnas, E., Kantakevičius, P., Kalvaitytė, M., Bagdzevičiūtė, L., Alksnė, M., & Baltriukienė, D. (2021). DNA-DAPI Interaction-Based Method for Cell Proliferation Rate Evaluation in 3D Structures. *Current Issues in Molecular Biology*, 43(1), 251-263. Q2, IF: 2.1.
2. Šimoliūnas, E., Ivanauskienė, I., Bagdzevičiūtė, L., Rinkūnaitė, I., Alksnė, M., & Baltriukienė, D. (2021). Surface stiffness depended gingival mesenchymal stem cell sensitivity to oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 169, 62-73. Q1, IF – 6.2.

Kitos publikacijos išspausdintos disertacijos metu:

1. Pranskunas, M., Šimoliūnas, E., Alksne, M., Kaupinis, A., Juodzbaly, G. (2021). Periosteum-Derived Mesenchymal Stem Cells Secretome – Cell-Free Strategy for Endogenous Bone Regeneration: Proteomic Analysis in Vitro. *Journal of Oral & Maxillofacial Research*, 12(2):e2
2. Pranskunas, M., Šimoliūnas, E., Alksne, M., Martin, V., Gomes, P. S., Puisys, A., ... & Juodzbaly, G. (2021). Assessment of the Bone Healing Process Mediated by Periosteum-Derived Mesenchymal Stem Cells' Secretome and a Xenogenic Bioceramic—An In Vivo Study in the Rabbit Critical Size Calvarial Defect Model. *Materials*, 14(13), 3512.
3. Gendvilienė, I., Šimoliūnas, E., Alksnė, M., Dibart, S., Jasiūnienė, E., Cicėnas, V., ... & Rutkūnas, V. (2021). Effect of extracellular matrix and dental pulp stem cells on bone regeneration with 3D printed PLA/HA composite scaffolds. *European cells and materials*, 41, 204-215.
4. Rinkūnaitė, I., Šimoliūnas, E., Bironaitė, D., Rutkienė, R., Bukelskienė, V., Meškys, R., & Bogomolovas, J. (2021). The Effect of a Unique Region of Parvovirus B19 Capsid Protein VP1 on Endothelial Cells. *Biomolecules*, 11(4), 606.
5. Rinkūnaitė, I., Šimoliūnas, E., Alksne, M., Dapkute, D., & Bukelskiene, V. (2021). Anti-inflammatory effect of different curcumin preparations on adjuvant-induced arthritis in rats. *BMC complementary medicine and therapies*, 21(1), 1-12.

6. Alksne, M., Kalvaityte, M., Simoliunas, E., Rinkunaite, I., Gendviliene, I., Locs, J., ... & Bukelskiene, V. (2020). In vitro comparison of 3D printed polylactic acid/hydroxyapatite and polylactic acid/bioglass composite scaffolds: Insights into materials for bone regeneration. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 104, 103641.
7. Baltrūnienė, V., Rinkūnaitė, I., Bogomolovas, J., Bironaitė, D., Kažukauskienė, I., Šimoliūnas, E., ... & Grabauskienė, V. (2020). The role of cardiac T-cadherin in the indicating heart failure severity of patients with non-ischemic dilated cardiomyopathy. *Medicina*, 56(1), 27.
8. Gendviliene, I., Simoliunas, E., Rekstyte, S., Malinauskas, M., Zaleckas, L., Jegelevicius, D., ... & Rutkunas, V. (2020). Assessment of the morphology and dimensional accuracy of 3D printed PLA and PLA/HAp scaffolds. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 104, 103616.
9. Balčiūnas, E., Dreizė, N., Grubliauskaitė, M., Urnikytė, S., Šimoliūnas, E., Bukelskienė, V., ... & Baltriukienė, D. (2019). Biocompatibility investigation of hybrid organometallic polymers for sub-micron 3D printing via laser two-photon polymerisation. *Materials*, 12(23), 3932.
10. Šimoliūnas, E., Rinkūnaitė, I., Bukelskienė, Ž., & Bukelskienė, V. (2019). Bioavailability of different vitamin D Oral supplements in laboratory animal model. *Medicina*, 55(6), 265.
11. Alksne, M., Simoliunas, E., Kalvaityte, M., Skliutas, E., Rinkunaite, I., Gendviliene, I., ... & Bukelskiene, V. (2019). The effect of larger than cell diameter polylactic acid surface patterns on osteogenic differentiation of rat dental pulp stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 107(1), 174-186.
12. Bogomolovas, J., Šimoliūnas, E., Rinkūnaitė, I., Smalinskaitė, L., Podkopajev, A., Bironaitė, D., ... & Labeit, S. (2016). A novel murine model of parvovirus associated dilated cardiomyopathy induced by immunization with VP1-unique region of parvovirus B19. *BioMed research international*, 2016.

Disertacijos rezultatų pristatymas konferencijoje:

1. E. Šimoliūnas. **The Role of MAP Kinases in Human GMSCs in Response to Different Degrees of Matrix Stiffness**. 3D3C: Toward new vista of in-vitro 3-dimensional organization and cell to cell communication. Beit Maiersdorf, The Hebrew University, Mount Scopus, Jeruzalm, Izrael. 2020 March 3-6 d. [Žodinis pranešimas]
2. E. Simoliunas, M. Alksne, M. Kalvaityte, V. Bukelskiene, D. Baltriukiene. **PLA composites and pure PLA decorated with cell-derived extracellular matrix impact on the fate of dental pulp stem cells osteogenic differentiation**. Workshop 2019 “Cells communicate!”. March 13-15th, 2019. Belgrade, Serbia. [Stendinis pranešimas]
3. E. Simoliunas, M. Alksne, M. Kalvaitytė, E. Skliutas, P. Barasa, D. Baltriukienė, V. Bukelskienė. **The influence of ordered 3D printed PLA scaffold microstructurization on rat dental pulp stem cells**. 2017 TERMIS-EU Conference Davos, Switzerland. 2017-06-26 – 2017-06-30. [Stendinis pranešimas]

Kiti konferencijų pranešimai:

1. V. Rutkūnas, E. Šimoliūnas. **Dental implantology and 3D bioprinting. Clinical and research perspectives**. International conference “nanostructured bioceramic materials 2020”, Vilnius University, Vilnius, Lithuania. December 1-3, 2020. [Žodinis pranešimas]
2. M. Alksne, M. Kalvaityte, E. Simoliunas, V. Bukelskiene, D. Baltriukiene. **Macro-structured polylactic acid scaffolds for osteogenic regeneration**. Workshop 2019 “Cells communicate!”. March 13-15th, 2019. Belgrade, Serbia. [Žodinis pranešimas]
3. M. Vitosyte, I. Gendviliene, E. Simoliunas, M. Alksne, S. Rekstyte, R. Jacobs, ... & V. Rutkunas. **Effect of 3D printed PLA HAP and their decellularized scaffolds on new bone formation**. 28th annual scientific meeting of European association of osteointegration. September 26-28, 2019. Lisbon, Portugal. [Stendinis pranešimas]
4. I. Gendvilienė, M. Alksnė, S. Rekšytė, E. Šimoliūnas, E. Skliutas, M. Malinauskas, S. Dibart, V. Bukelskienė, V. Rutkūnas. **Effect of 3d**

- PLLA, PLLA/HAP scaffolds on new bone formation.** CED-IADR/NOF .Oral Health Research Congress. 2017-09-21/23. Viena (Austria). [Stendinis pranešimas]
5. I. Gendvilienė, S. Rekštytė, R. Borusevičius, E. Šimoliūnas, M. Alksnė, E. Skliutas, S. Grybauskas, M. Vaitiekūnas, V. Bukelskienė, V. Rutkūnas. **Assessment of 3D printed PLLA and PLLA/Hap scaffolds geometry.** Bruker micro-CT User Meeting 2018. 2018-04-16/19. Aula (Belgium). [Stendinis pranešimas]
 6. I. Gendvilienė, E. Šimoliūnas, M. Alksnė, S. Rekštytė, E. Skliutas, M. Malinauskas, S. Dibart, V. Bukelskienė, V. Rutkūnas. **Effect of 3d printed scaffolds on new bone formation.** IADR/PER General Session. 2018-07-25/28. London (England). [Stendinis pranešimas]
 7. E. Šimoliūnas, M. Grubliauskaitė, D. Baltriukienė. **The influence of co-culture on cell proliferation, migration and cytokine expression.** Tarptautinė XV Lietuvos biochemijos draugijos konferencija. 2018-06-26/29. Dubingiai (Lithuania). [Stendinis pranešimas]
 8. E Simoliunas, D Jasmontaite, R Vaineikyte, I Bruzaite, D Baltriukiene. **The effect of ZnO and TiO2 nanoparticles on co-cultures composed of endothelial and myogenic stem cells.** EMBO Conference: Advances in Stem Cells and Regenerative Medicine; Heidelberg, Germany. 2017-05-23 – 2017-05-26. [Stendinis pranešimas]
 9. E Šimoliūnas. **Parvoviruso B19 kapsidės baltymo VP1 unikalaus regiono poveikis endotelinėms ląstelėms.** Bioateitis: gamtos ir gyvybės mokslų perspektyvos. Vilnius, Lithuania. 2016-12-07. [Žodinis pranešimas]
 10. E Šimoliūnas. **The role of Parvovirus B19 capsid protein VP1 unique region in endothelial damage during DCM in vitro.** 20th Anniversary Conference. Laboratory Animals in Research. Vilnius, Lithuania. 2016-11-24 – 2016-11-25. [Žodinis pranešimas]

FINANSINĖ PARAMA

- Tyrimai dalinai buvo finansuoti Vilniaus universiteto mokslo skatinimo projekto lėšomis. Projekto nr. MSF-JM-8.
- Lietuvos mokslo akademija skyrė paramą doktorantams (parama už studijų rezultatus), reg. Nr. P-DAP-19-211.
- COST programa „CellFit“ (COST Action CA16119) finansavo dalyvavimą konferencijoje „CellFit Workshop – Cells Communicate!“

PADĖKA

Norėčiau išreikšti nuoširdžią padėką savo darbo vadovei dr. Daivai Baltriukienei, už mokslines diskusijas, palaikymą, pagalbą ir visą skirtą laiką. Taip pat, norėčiau padėkoti visam Biologinių Modelių Skyriui, o ypač skyriaus vadovei dr. Virginijai Bukelskienei ir dr. Mildai Alksnei už prasmingas diskusijas, draugišką bendravimą, palaikymą ir pagalbą. Dr. Marijai Jankunec iš Bioelektrochemijos ir Biospektroskopijos Skyriaus už konsultacijas ir atominės jėgos mikroskopijos tiriamųjų paviršių matavimus. Gyd. Ievai Gendvilienei už atliktas pacientų dantenų audinių biopsijas. Žinoma, esu labai dėkingas savo šeimai: Ievai, Tėvams ir Broliui už visą palaikymą ir pagalbą visų studijų metu.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- [1] J. Wolff, Das Gesetz der Transformation der Knochen, Dtsch. Medizinische Wochenschrift. 19 (1893) 1222–1224. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1144106>.
- [2] M. Wall, D. Butler, A. El Haj, J.C. Bodle, E.G. Lobo, A.J. Banes, A. El Haj, J.C. Bodle, E.G. Lobo, A.J. Banes, Key developments that impacted the field of mechanobiology and mechanotransduction, J. Orthop. Res. 36 (n.d.) 605–619. <https://doi.org/10.1002/jor.23707>.
- [3] J. Eyckmans, T. Boudou, X. Yu, C.S. Chen, A Hitchhiker’s Guide to Mechanobiology, Dev. Cell. 21 (2011) 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.015>.
- [4] F. Liu, J.D. Mih, B.S. Shea, A.T. Kho, A.S. Sharif, A.M. Tager, D.J. Tschumperlin, Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression, J. Cell Biol. 190 (2010) 693–706. <https://doi.org/10.1083/jcb.201004082>.
- [5] T.R. Cox, J.T. Erler, Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: Implications for fibrotic diseases and cancer, DMM Dis. Model. Mech. 4 (2011) 165–178. <https://doi.org/10.1242/dmm.004077>.
- [6] J.J. Northey, L. Przybyla, V.M. Weaver, Tissue force programs cell fate and tumor aggression, Cancer Discov. 7 (2017) 1224–1237. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0733>.
- [7] H.-H. Lin, H.-K. Lin, I.-H. Lin, Y.-W. Chiou, H.-W. Chen, C.-Y. Liu, H.I.-C. Harn, W.-T. Chiu, Y.-K. Wang, M.-R. Shen, M.-J. Tang, Mechanical phenotype of cancer cells: cell softening and loss of stiffness sensing, Oncotarget. 6 (2015). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4173>.
- [8] Q.-P. Liu, Q. Luo, B. Deng, Y. Ju, G.-B. Song, Stiffer Matrix Accelerates Migration of Hepatocellular Carcinoma Cells through Enhanced Aerobic Glycolysis Via the MAPK-YAP Signaling, Cancers (Basel). 12 (2020) 490. <https://doi.org/10.3390/cancers12020490>.
- [9] A. Malandrino, M. Mak, R.D. Kamm, E. Moeendarbary, A.D. Theocharis, S.S. Skandalis, C. Gialeli, N.K. Karamanos, T. Ebata, Y. Mitsui, W. Sugimoto, M. Maeda, K. Araki, H. Machiyama, I. Harada, Y. Sawada, H. Fujita, H. Hirata, K. Kawauchi, F.C. Chang, C.T. Tsao,

- A. Lin, M.M. Zhang, S.L. Levensgood, M.M. Zhang, A.W. Holle, J.L. Young, J.P. Spatz, A. Malandrino, M. Mak, R.D. Kamm, E. Moeendarbary, H.-H.H.-K. Lin, H.-H.H.-K. Lin, I.-H. Lin, Y.-W. Chiou, H.-W. Chen, C.-Y. Liu, H.I.-C. Harn, W.-T. Chiu, Y.-K. Wang, M.-R. Shen, M.-J. Tang, A. Rauscher, M. Gyimesi, M. Kovács, A. Málnási-Csizmadia, S. Piccolo, S. Dupont, M. Cordenonsi, F. Zanconato, G. Battilana, M. Cordenonsi, S. Piccolo, R.J. Whitson, A. Lee, N.M. Urman, A. Mirza, C.Y. Yao, A.S. Brown, J.R. Li, G. Shankar, M.A. Fry, S.X. Atwood, E.Y. Lee, S.T. Hollmig, S.Z. Aasi, K.Y. Sarin, M.P. Scott, E.H. Epstein, J.Y. Tang, A.E. Oro, T. V. Nguyen, M. Sleiman, T. Moriarty, W.G. Herrick, S.R. Peyton, NIST, K. Ohashi, S. Fujiwara, K. Mizuno, L. Hui, J. Zhang, X. Ding, X. Guo, X. Jiang, R. Rafael, M.H. Joyce, C. Lu, E.R. James, R. Hegab, S.C. Allen, L.J. Suggs, A. Brock, J. Feng, Y. Tang, Y. Xu, Q. Sun, F. Liao, D. Han, Complex mechanics of the heterogeneous extracellular matrix in cancer, *Extrem. Mech. Lett.* 21 (2018) 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.eml.2018.02.003>.
- [10] S. Zustiak, R. Nossal, D.L. Sackett, Multiwell stiffness assay for the study of cell responsiveness to cytotoxic drugs, *Biotechnol. Bioeng.* 111 (2014) 396–403. <https://doi.org/10.1002/bit.25097>.
- [11] C.A. Hall, R. Wang, J. Miao, E. Oliva, X. Shen, T. Wheeler, S.G. Hilsenbeck, S. Orsulic, S. Goode, Hippo pathway effector Yap is an ovarian cancer oncogene., *Cancer Res.* 70 (2010) 8517–25. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1242>.
- [12] T. Fischer, A. Hayn, C.T. Mierke, Effect of Nuclear Stiffness on Cell Mechanics and Migration of Human Breast Cancer Cells, *Front. Cell Dev. Biol.* 8 (2020). <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00393>.
- [13] E. Tzima, M. Irani-Tehrani, W.B. Kiosses, E. Dejana, D.A. Schultz, B. Engelhardt, G. Cao, H. DeLisser, M.A. Schwartz, A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress, *Nature.* 437 (2005) 426–431. <https://doi.org/10.1038/nature03952>.
- [14] S.J. Kunnen, T.B. Malas, C.M. Semeins, A.D. Bakker, D.J.M. Peters, Comprehensive transcriptome analysis of fluid shear stress altered gene expression in renal epithelial cells, *J. Cell. Physiol.* 233 (2018) 3615–3628. <https://doi.org/10.1002/jcp.26222>.
- [15] A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D.E. Discher, Matrix Elasticity

- Directs Stem Cell Lineage Specification, *Cell*. 126 (2006) 677–689.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>.
- [16] J. Swift, D.E. Discher, The nuclear lamina is mechano-responsive to ECM elasticity in mature tissue, *J. Cell Sci.* 127 (2014) 3005–3015.
<https://doi.org/10.1242/jcs.149203>.
- [17] E. Canetta, A. Duperray, A. Leyrat, C. Verdier, Measuring cell viscoelastic properties using a force-spectrometer: Influence of protein–cytoplasm interactions, *Biorheology*. 42 (2005) 321–333.
- [18] G. Charras, A.S. Yap, Tensile Forces and Mechanotransduction at Cell–Cell Junctions, *Curr. Biol.* 28 (2018) R445–R457.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.003>.
- [19] D. Spadaro, S. Le, T. Laroche, I. Mean, L. Jond, J. Yan, S. Citi, Tension-Dependent Stretching Activates ZO-1 to Control the Junctional Localization of Its Interactors, *Curr. Biol.* 27 (2017) 3783–3795.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.11.014>.
- [20] D. Pinheiro, Y. Bellaïche, Mechanical Force-Driven Adherens Junction Remodeling and Epithelial Dynamics, *Dev. Cell*. 47 (2018) 3–19.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.09.014>.
- [21] K. Takemoto, S. Ishihara, T. Mizutani, K. Kawabata, H. Haga, Compressive Stress Induces Dephosphorylation of the Myosin Regulatory Light Chain via RhoA Phosphorylation by the Adenylyl Cyclase/Protein Kinase A Signaling Pathway, *PLoS One*. 10 (2015) e0117937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117937>.
- [22] B.R. Freedman, N.D. Bade, C.N. Riggin, S. Zhang, P.G. Haines, K.L. Ong, P.A. Janmey, The (dys)functional extracellular matrix, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1853 (2015) 3153–3164.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.04.015>.
- [23] A.E. Stanton, X. Tong, F. Yang, Extracellular matrix type modulates mechanotransduction of stem cells, *Acta Biomater.* 96 (2019) 310–320.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.06.048>.
- [24] J.E. Murphy-Ullrich, E.H. Sage, Revisiting the matricellular concept, *Matrix Biol.* 37 (2014) 1–14.
<https://doi.org/10.1016/j.matbio.2014.07.005>.
- [25] A.D. Theocharis, S.S. Skandalis, C. Gialeli, N.K. Karamanos,

- Extracellular matrix structure, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97 (2016) 4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.
- [26] R.O. Hynes, The extracellular matrix: Not just pretty fibrils, *Science* (80-.). 326 (2009) 1216–1219. <https://doi.org/10.1126/science.1176009>.
- [27] D. Mohammed, M. Versaemel, C. Bruyère, L. Alaimo, M. Luciano, E. Vercruysse, A. Procès, S. Gabriele, Innovative tools for mechanobiology: Unraveling outside-in and inside-out mechanotransduction, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7 (2019) 162. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00162>.
- [28] A. Hassan, L. Sapir, I. Nitsan, R.T. Greenblatt Ben-El, N. Halachmi, A. Salzberg, S. Tzliil, A Change in ECM Composition Affects Sensory Organ Mechanics and Function, *Cell Rep.* 27 (2019) 2272–2280.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.04.092>.
- [29] C. Frantz, K.M. Stewart, V.M. Weaver, The extracellular matrix at a glance, *J. Cell Sci.* 123 (2010) 4195–4200. <https://doi.org/10.1242/jcs.023820>.
- [30] I.A. Janson, A.J. Putnam, Extracellular matrix elasticity and topography: Material-based cues that affect cell function via conserved mechanisms, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 103 (2015) 1246–1258. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35254>.
- [31] M. Najafi, B. Farhood, K. Mortezaee, Extracellular matrix (ECM) stiffness and degradation as cancer drivers, *J. Cell. Biochem.* 120 (2019) 2782–2790. <https://doi.org/10.1002/jcb.27681>.
- [32] P. Roca-Cusachs, V. Conte, X. Trepas, Quantifying forces in cell biology, *Nat. Cell Biol.* 19 (2017) 742–751. <https://doi.org/10.1038/ncb3564>.
- [33] M. Klaas, T. Kangur, J. Viil, K. Mäemets-Allas, A. Minajeva, K. Vadi, M. Antsov, N. Lapidus, M. Järvekülg, V. Jaks, The alterations in the extracellular matrix composition guide the repair of damaged liver tissue, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep27398>.
- [34] P. Lu, V.M. Weaver, Z. Werb, The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression, *J. Cell Biol.* 196 (2012) 395–406. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102147>.

- [35] S. Seetharaman, S. Etienne-Manneville, Integrin diversity brings specificity in mechanotransduction, *Biol. Cell.* 110 (2018) 49–64. <https://doi.org/10.1111/boc.201700060>.
- [36] A. De Arcangelis, E. Georges-Labouesse, Integrin and ECM functions: Roles in vertebrate development, *Trends Genet.* 16 (2000) 389–395. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02074-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02074-6).
- [37] P. Atherton, F. Lausecker, A. Carisey, A. Gilmore, D. Critchley, I. Barsukov, C. Ballestrem, Force-independent interactions of talin and vinculin govern integrin-mediated mechanotransduction, *BioRxiv.* (2019) 629683. <https://doi.org/10.1101/629683>.
- [38] M.A. Pearson, D. Reczek, A. Bretscher, P.A. Karplus, Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain, *Cell.* 101 (2000) 259–270. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80836-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80836-3).
- [39] H. Huang, L. Li, C. Wu, D. Schibli, K. Colwill, S. Ma, C. Li, P. Roy, K. Ho, Z. Songyang, T. Pawson, Y. Gao, S.S.C. Li, Defining the specificity space of the human Src homology 2 domain, *Mol. Cell. Proteomics.* 7 (2008) 768–784. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700312-MCP200>.
- [40] D.S. Wang, G. Shaw, The Association of the C-Terminal Region of β 1 Σ II Spectrin to Brain Membranes Is Mediated by a pH Domain, Does Not Require Membrane Proteins, and Coincides with a Inositol-1,4,5 Trisphosphate Binding Site, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 217 (1995) 608–615. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.2818>.
- [41] F. Martino, A.R. Perestrelo, V. Vinarský, S. Pagliari, G. Forte, Cellular mechanotransduction: From tension to function, *Front. Physiol.* 9 (2018) 824. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00824>.
- [42] C. Ciobanasu, B. Faivre, C. Le Clainche, Actomyosin-dependent formation of the mechanosensitive talin-vinculin complex reinforces actin anchoring, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3095. <https://doi.org/10.1038/ncomms4095>.
- [43] A. Elosegui-Artola, R. Oria, Y. Chen, A. Kosmalska, C. Pérez-González, N. Castro, C. Zhu, X. Trepát, P. Roca-Cusachs, Mechanical regulation of a molecular clutch defines force transmission and transduction in response to matrix rigidity, *Nat. Cell Biol.* 18 (2016)

- 540–548. <https://doi.org/10.1038/ncb3336>.
- [44] F. D’Angelo, R. Tiribuzi, I. Armentano, J.M. Kenny, S. Martino, A. Orlacchio, Mechanotransduction: Tuning Stem Cells Fate, *J. Funct. Biomater.* 2 (2011) 67–87. <https://doi.org/10.3390/jfb2020067>.
 - [45] K. Burridge, E. Monaghan-Benson, D.M. Graham, Mechanotransduction: From the cell surface to the nucleus via RhoA, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 374 (2019). <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0229>.
 - [46] R. Rahikainen, T. Ohman, P. Turkki, M. Varjosalo, V.P. Hytonen, Talin-mediated force transmission and talin rod domain unfolding independently regulate adhesion signaling, *J. Cell Sci.* 132 (2019). <https://doi.org/10.1242/jcs.226514>.
 - [47] G. Giannone, G. Jiang, D.H. Sutton, D.R. Critchley, M.P. Sheetz, Talin1 is critical for force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton bonds but not tyrosine kinase activation, *J. Cell Biol.* 163 (2003) 409–419. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302001>.
 - [48] J. Kuo, Mechanotransduction at focal adhesions: integrating cytoskeletal mechanics in migrating cells, *J. Cell. Mol. Med.* 17 (2013) 704–712. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12054>.
 - [49] A.A. Khalil, J. de Rooij, Cadherin mechanotransduction in leader-follower cell specification during collective migration, *Exp. Cell Res.* 376 (2019) 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.01.006>.
 - [50] M. Takeichi, Dynamic contacts: Rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 397–410. <https://doi.org/10.1038/nrm3802>.
 - [51] V. Braga, Epithelial cell shape: Cadherins and small GTPases, *Exp. Cell Res.* 261 (2000) 83–90. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5050>.
 - [52] S. Sluysmans, E. Vasileva, D. Spadaro, J. Shah, F. Rouaud, S. Citi, The role of apical cell-cell junctions and associated cytoskeleton in mechanotransduction, *Biol. Cell.* 109 (2017) 139–161. <https://doi.org/10.1111/boc.201600075>.
 - [53] N. Ishiyama, R. Sarpal, M.N. Wood, S.K. Barrick, T. Nishikawa, H. Hayashi, A.B. Kobb, A.S. Flozak, A. Yemelyanov, R. Fernandez-Gonzalez, S. Yonemura, D.E. Leckband, C.J. Gottardi, U. Tepass, M.

- Ikura, Force-dependent allostery of the α -catenin actin-binding domain controls adherens junction dynamics and functions, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07481-7>.
- [54] E. Hirata, D. Park, E. Sahai, Retrograde flow of cadherins in collective cell migration, *Nat. Cell Biol.* 16 (2014) 621–623. <https://doi.org/10.1038/ncb2995>.
- [55] O. Hamant, D. Inoue, D. Bouchez, J. Dumais, E. Mjolsness, Are microtubules tension sensors?, *Nat. Commun.* 10 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10207-y>.
- [56] A.R. Harris, P. Jreij, D.A. Fletcher, Mechanotransduction by the Actin Cytoskeleton: Converting Mechanical Stimuli into Biochemical Signals, *Annu. Rev. Biophys.* 47 (2018) 617–631. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070816-033547>.
- [57] A.F. Pegoraro, P. Janmey, D.A. Weitz, Mechanical properties of the cytoskeleton and cells, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9 (2017) a022038. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022038>.
- [58] S.X. Sun, S. Walcott, C.W. Wolgemuth, Cytoskeletal cross-linking and bundling in motor-independent contraction, *Curr. Biol.* 20 (2010) R649–R654. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.07.004>.
- [59] R. Hart, D. Kota, F. Li, D. Ramallo, A. Price, K. Otterpohl, S. Smith, A. Dunn, J. Liu, I. Chandrasekar, Myosin II Tension Sensors Visualize Force Generation within the Actin Cytoskeleton in Living Cells, *BioRxiv.* (2019) 623249. <https://doi.org/10.1101/623249>.
- [60] D. Zimmermann, D.R. Kovar, Feeling the force: formin’s role in mechanotransduction, *Curr. Opin. Cell Biol.* 56 (2019) 130–140. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.12.008>.
- [61] P. Isermann, J. Lammerding, Nuclear mechanics and mechanotransduction in health and disease, *Curr. Biol.* 23 (2013) R1113–R1121. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.11.009>.
- [62] S. Cho, J. Irianto, D.E. Discher, Mechanosensing by the nucleus: From pathways to scaling relationships, *J. Cell Biol.* 216 (2017) 305–315. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610042>.
- [63] D.M. Graham, K. Burrridge, Mechanotransduction and nuclear function, *Curr. Opin. Cell Biol.* 40 (2016) 98–105.

- <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2016.03.006>.
- [64] Y.A. Miroshnikova, M.M. Nava, S.A. Wickström, Emerging roles of mechanical forces in chromatin regulation, *J. Cell Sci.* 130 (2017) 2243–2250. <https://doi.org/10.1242/jcs.202192>.
 - [65] M. Aragona, T. Panciera, A. Manfrin, S. Giulitti, F. Michielin, N. Elvassore, S. Dupont, S. Piccolo, A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors, *Cell.* 154 (2013) 1047–1059. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.042>.
 - [66] F. Zanconato, M. Cordenonsi, S. Piccolo, YAP/TAZ at the Roots of Cancer, *Cancer Cell.* 29 (2016) 783–803. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.005>.
 - [67] T. Panciera, L. Azzolin, M. Cordenonsi, S. Piccolo, Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18 (2017) 758–770. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.87>.
 - [68] M. Hieda, Signal Transduction across the Nuclear Envelope: Role of the LINC Complex in Bidirectional Signaling, *Cells.* 8 (2019) 124. <https://doi.org/10.3390/cells8020124>.
 - [69] N.M. Ramdas, G. V. Shivashankar, Cytoskeletal control of nuclear morphology and chromatin organization, *J. Mol. Biol.* 427 (2015) 695–706. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.09.008>.
 - [70] S. Wang, E. Stoops, C.P. Unnikannan, B. Markus, A. Reuveny, E. Ordan, T. Volk, Mechanotransduction via the LINC complex regulates DNA replication in myonuclei, *J. Cell Biol.* 217 (2018) 2005–2018. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708137>.
 - [71] B. Burke, C.L. Stewart, The nuclear lamins: Flexibility in function, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14 (2013) 13–24. <https://doi.org/10.1038/nrm3488>.
 - [72] J. Swift, I.L. Ivanovska, A. Buxboim, T. Harada, P.C.D.P. Dingal, J. Pinter, J.D. Pajerowski, K.R. Spinler, J.W. Shin, M. Tewari, F. Rehfeldt, D.W. Speicher, D.E. Discher, Nuclear lamin-A scales with tissue stiffness and enhances matrix-directed differentiation, *Science* (80-.). 341 (2013). <https://doi.org/10.1126/science.1240104>.
 - [73] G.G. Luxton, D.A. Starr, KASHing up with the nucleus: Novel

- functional roles of KASH proteins at the cytoplasmic surface of the nucleus, *Curr. Opin. Cell Biol.* 28 (2014) 69–75. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.03.002>.
- [74] H. Hao, D.A. Starr, SUN/KASH interactions facilitate force transmission across the nuclear envelope, *Nucleus*. 10 (2019) 73–80. <https://doi.org/10.1080/19491034.2019.1595313>.
- [75] R. Langer, J. Vacanti, Advances in tissue engineering, in: *J. Pediatr. Surg.*, W.B. Saunders, 2016: pp. 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022>.
- [76] S. Derakhshanfar, R. Mbeleck, K. Xu, X. Zhang, W. Zhong, M. Xing, 3D bioprinting for biomedical devices and tissue engineering: A review of recent trends and advances, *Bioact. Mater.* 3 (2018) 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.11.008>.
- [77] R. Elahimehr, A.T. Scheinok, D.B. McKay, Hematopoietic stem cells and solid organ transplantation, *Transplant. Rev.* 30 (2016) 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.trre.2016.07.005>.
- [78] D.A. Taylor, L.C. Sampaio, Z. Ferdous, A.S. Gobin, L.J. Taite, Decellularized matrices in regenerative medicine, *Acta Biomater.* 74 (2018) 74–89. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.044>.
- [79] D.G. Tamay, T.D. Usal, A.S. Alagoz, D. Yucel, N. Hasirci, V. Hasirci, 3D and 4D printing of polymers for tissue engineering applications, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 7 (2019) 164. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00164>.
- [80] M. Marchand, C. Monnot, L. Muller, S. Germain, Extracellular matrix scaffolding in angiogenesis and capillary homeostasis, *Semin. Cell Dev. Biol.* 89 (2019) 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.08.007>.
- [81] J.S. Lee, Y.S. Choi, S.W. Cho, Decellularized tissue matrix for stem cell and tissue engineering, in: *Adv. Exp. Med. Biol.*, Springer New York LLC, 2018: pp. 161–180. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0445-3_10.
- [82] B. Bakhshandeh, P. Zarrintaj, M.O. Oftadeh, F. Keramati, H. Fouladiha, S. Sohrabi-jahromi, Z. Ziraksaz, Tissue engineering: strategies, tissues, and biomaterials, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 33 (2017) 144–172. <https://doi.org/10.1080/02648725.2018.1430464>.

- [83] A. Xue, G. Niu, Y. Chen, K. Li, Z. Xiao, Y. Luan, C. Sun, X. Xie, D. Zhang, X. Du, F. Kong, Y. Guo, H. Zhang, G. Cheng, Q. Xin, Y. Guan, S. Zhao, Recellularization of well-preserved decellularized kidney scaffold using adipose tissue-derived stem cells, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 106 (2018) 805–814. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36279>.
- [84] K.H. Nakayama, C.C.I. Lee, C.A. Batchelder, A.F. Tarantal, Tissue Specificity of Decellularized Rhesus Monkey Kidney and Lung Scaffolds, *PLoS One*. 8 (2013) e64134. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064134>.
- [85] H.C. Ott, T.S. Matthiesen, S.K. Goh, L.D. Black, S.M. Kren, T.I. Netoff, D.A. Taylor, Perfusion-decellularized matrix: Using nature's platform to engineer a bioartificial heart, *Nat. Med.* 14 (2008) 213–221. <https://doi.org/10.1038/nm1684>.
- [86] N. Hong, G.-H. Yang, J. Lee, G. Kim, 3D bioprinting and its *in vivo* applications, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 106 (2018) 444–459. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33826>.
- [87] J. Feng, Y. Tang, Y. Xu, Q. Sun, F. Liao, D. Han, Substrate stiffness influences the outcome of antitumor drug screening in vitro, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* 55 (2013) 121–131. <https://doi.org/10.3233/CH-131696>.
- [88] A.S. Neto, J.M.F. Ferreira, Synthetic and marine-derived porous scaffolds for bone tissue engineering, *Materials (Basel)*. 11 (2018) 1702. <https://doi.org/10.3390/ma11091702>.
- [89] M. Alizadeh-Osgouei, Y. Li, C. Wen, A comprehensive review of biodegradable synthetic polymer-ceramic composites and their manufacture for biomedical applications, *Bioact. Mater.* 4 (2019) 22–36. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2018.11.003>.
- [90] S.P. Low, K.A. Williams, L.T. Canham, N.H. Voelcker, Evaluation of mammalian cell adhesion on surface-modified porous silicon, *Biomaterials*. 27 (2006) 4538–4546. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.04.015>.
- [91] A. Moshaverinia, C. Chen, X. Xu, K. Akiyama, S. Ansari, H.H. Zadeh, S. Shi, Bone regeneration potential of stem cells derived from periodontal ligament or gingival tissue sources encapsulated in RGD-modified alginate scaffold, *Tissue Eng. - Part A*. 20 (2014) 611–621.

- <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0229>.
- [92] D. Mao, Q. Li, D. Li, Y. Chen, X. Chen, X. Xu, Fabrication of 3D porous poly(lactic acid)-based composite scaffolds with tunable biodegradation for bone tissue engineering, *Mater. Des.* 142 (2018) 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.MATDES.2018.01.016>.
 - [93] H. Zhang, X. Mao, Z. Du, W. Jiang, X. Han, D. Zhao, D. Han, Q. Li, Three dimensional printed macroporous polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffolds for promoting bone formation in a critical-size rat calvarial defect model, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 17 (2016) 136. <https://doi.org/10.1080/14686996.2016.1145532>.
 - [94] N. Gómez-Cerezo, L. Casarrubios, M. Saiz-Pardo, L. Ortega, D. de Pablo, I. Díaz-Güemes, B. Fernández-Tomé, S. Enciso, F.M. Sánchez-Margallo, M.T. Portolés, D. Arcos, M. Vallet-Regí, Mesoporous bioactive glass/ ϵ -polycaprolactone scaffolds promote bone regeneration in osteoporotic sheep, *Acta Biomater.* (2019). <https://doi.org/10.1016/J.ACTBIO.2019.04.019>.
 - [95] J. Esmaeilzadeh, S. Hesarak, M.H. Ebrahimzadeh, G.H. Asghari, A.R. Kachooei, Creep behavior of Biodegradable Triple-component Nanocomposites Based on PLA/PCL/bioactive Glass for ACL Interference Screws., *Arch. Bone Jt. Surg.* 7 (2019) 531–537. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31970258> (accessed June 8, 2021).
 - [96] T.M.B.K. dos Santos, C. Merlini, Á. Aragonés, M.C. Fredel, Manufacturing and characterization of plates for fracture fixation of bone with biocomposites of poly (lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) with calcium phosphates bioceramics, *Mater. Sci. Eng. C.* 103 (2019). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.05.013>.
 - [97] G.H. Yang, M. Yeo, Y.W. Koo, G.H. Kim, 4D Bioprinting: Technological Advances in Biofabrication, *Macromol. Biosci.* 19 (2019). <https://doi.org/10.1002/mabi.201800441>.
 - [98] Y. Wang, J. Dai, Q. Zhang, Y. Xiao, M. Lang, Improved mechanical properties of hydroxyapatite/poly(ϵ -caprolactone) scaffolds by surface modification of hydroxyapatite, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 6107–6112. <https://doi.org/10.1016/J.APSUSC.2010.03.127>.
 - [99] H. Bakhtiar, M. Pezeshki-Modaress, Z. Kiaipour, M. Shafiee, M.R.

- Ellini, A. Mazidi, S. Rajabi, S. Zamanlui Benisi, S.N. Ostad, K. Galler, P. Pakshir, A. Azarpazhooh, A. Kishen, Pulp ECM-derived macroporous scaffolds for stimulation of dental-pulp regeneration process, *Dent. Mater.* 36 (2020) 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.10.011>.
- [100] K. Kanimozhi, S.K. Basha, V.S. Kumari, K. Kaviyarasu, Development of Biomimetic Hybrid Porous Scaffold of Chitosan/Polyvinyl Alcohol/Carboxymethyl Cellulose by Freeze-Dried and Salt Leached Technique, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 18 (2017) 4916–4922. <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.15306>.
- [101] W. Chen, H. Zhou, M. Tang, M.D. Weir, C. Bao, H.H.K. Xu, Gas-foaming calcium phosphate cement scaffold encapsulating human umbilical cord stem cells., *Tissue Eng. Part A.* 18 (2012) 816–27. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0267>.
- [102] S. Florczak, T. Lorson, T. Zheng, M. Mrlik, D.W. Hutmacher, M.J. Higgins, R. Luxenhofer, P.D. Dalton, Melt electrowriting of electroactive poly(vinylidene difluoride) fibers, *Polym. Int.* 68 (2019) 735–745. <https://doi.org/10.1002/pi.5759>.
- [103] S. Infanger, A. Haemmerli, S. Iliev, A. Baier, E. Stoyanov, J. Quodbach, Powder bed 3D-printing of highly loaded drug delivery devices with hydroxypropyl cellulose as solid binder, *Int. J. Pharm.* 555 (2019) 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.048>.
- [104] M. Alksne, M. Kalvaityte, E. Simoliunas, I. Rinkunaite, I. Gendviliene, J. Locs, V. Rutkunas, V. Bukelskiene, In vitro comparison of 3D printed polylactic acid/hydroxyapatite and polylactic acid/bioglass composite scaffolds: Insights into materials for bone regeneration, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 104 (2020) 103641. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.103641>.
- [105] Z.E. Wilson, A. Rostami-Hodjegan, J.L. Burn, A. Tooley, J. Boyle, S.W. Ellis, G.T. Tucker, Inter-individual variability in levels of human microsomal protein and hepatocellularity per gram of liver, *Br. J. Clin. Pharmacol.* 56 (2003) 433–440. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2003.01881.x>.
- [106] W. Zakrzewski, M. Dobrzyński, M. Szymonowicz, Z. Rybak, Stem cells: Past, present, and future, *Stem Cell Res. Ther.* 10 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>.

- [107] L. Bacakova, J. Zarubova, M. Travnickova, J. Musilkova, J. Pajorova, P. Slepicka, N.S. Kasalkova, V. Svorcik, Z. Kolska, H. Motarjemi, M. Molitor, Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review, *Biotechnol. Adv.* 36 (2018) 1111–1126. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.011>.
- [108] C.L. Baker, M.F. Pera, Capturing Totipotent Stem Cells, *Cell Stem Cell*. 22 (2018) 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.12.011>.
- [109] N. Kosaric, H. Kiwanuka, G.C. Gurtner, Stem cell therapies for wound healing, *Expert Opin. Biol. Ther.* 19 (2019) 575–585. <https://doi.org/10.1080/14712598.2019.1596257>.
- [110] K. Takahashi, S. Yamanaka, Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors, *Cell*. 126 (2006) 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- [111] A. Sobhani, N. Khanlarkhani, M. Baazm, F. Mohammadzadeh, A. Najafi, S. Mehdinejadi, F.S. Aval, Multipotent stem cell and current application, *Acta Med. Iran.* 55 (2017) 6–23. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28188938/> (accessed June 8, 2021).
- [112] G. Brown, P. Tsapogas, R. Ceredig, The changing face of hematopoiesis: a spectrum of options is available to stem cells, *Immunol. Cell Biol.* 96 (2018) 898–911. <https://doi.org/10.1111/imcb.12055>.
- [113] S.C. Bozdağ, M.K. Yüksel, T. Demirer, Adult stem cells and medicine, in: *Adv. Exp. Med. Biol.*, Springer New York LLC, 2018: pp. 17–36. https://doi.org/10.1007/5584_2018_184.
- [114] C. Argentati, F. Morena, I. Tortorella, M. Bazzucchi, S. Porcellati, C. Emiliani, S. Martino, Insight into mechanobiology: How stem cells feel mechanical forces and orchestrate biological functions, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20215337>.
- [115] B. Lukomska, L. Stanaszek, E. Zuba-Surma, P. Legosz, S. Sarzynska, K. Drela, Challenges and Controversies in Human Mesenchymal Stem Cell Therapy, *Stem Cells Int.* 2019 (2019). <https://doi.org/10.1155/2019/9628536>.
- [116] H.H.G. Song, R.T. Rumma, C.K. Ozaki, E.R. Edelman, C.S. Chen, Vascular Tissue Engineering: Progress, Challenges, and Clinical

- Promise, *Cell Stem Cell*. 22 (2018) 340–354.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.02.009>.
- [117] E. Sano, C. Mori, Y. Nashimoto, R. Yokokawa, H. Kotera, Y.S. Torisawa, Engineering of vascularized 3D cell constructs to model cellular interactions through a vascular network, *Biomicrofluidics*. 12 (2018) 042204. <https://doi.org/10.1063/1.5027183>.
- [118] E. Buzhor, L. Leshansky, J. Blumenthal, H. Barash, D. Warshawsky, Y. Mazor, R. Shtrichman, Cell-based therapy approaches: The hope for incurable diseases, *Regen. Med.* 9 (2014) 649–672.
<https://doi.org/10.2217/rme.14.35>.
- [119] H.M. Blau, T.R. Brazelton, J.M. Weimann, The evolving concept of a stem cell: Entity or function?, *Cell*. 105 (2001) 829–841.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00409-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00409-3).
- [120] B.E. Strauer, G. Steinhoff, 10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart: From the methodological origin to clinical practice, *J. Am. Coll. Cardiol.* 58 (2011) 1095–1104. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2011.06.016>.
- [121] Y. Yu, J.E. Fisher, J.B. Lillegard, B. Rodysill, B. Amiot, S.L. Nyberg, Cell therapies for liver diseases, *Liver Transplant*. 18 (2012) 9–21.
<https://doi.org/10.1002/lt.22467>.
- [122] C.J. Pino, H.D. Humes, Stem cell technology for the treatment of acute and chronic renal failure, *Transl. Res.* 156 (2010) 161–168.
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2010.07.005>.
- [123] S. Wang, B. Lu, S. Girman, J. Duan, T. McFarland, Q. Zhang, M. Grompe, G. Adamus, B. Appukuttan, R. Lund, Non-Invasive Stem Cell Therapy in a Rat Model for Retinal Degeneration and Vascular Pathology, *PLoS One*. 5 (2010) e9200.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009200>.
- [124] A. Glavaski-Joksimovic, M.C. Bohn, Mesenchymal stem cells and neuroregeneration in Parkinson's disease, *Exp. Neurol.* 247 (2013) 25–38. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.03.016>.
- [125] U.P. Singh, N.P. Singh, B. Singh, M.K. Mishra, M. Nagarkatti, P.S. Nagarkatti, S.R. Singh, Stem cells as potential therapeutic targets for inflammatory bowel disease, *Front. Biosci. - Sch.* 2 S (2010) 993–1008.
<https://doi.org/10.2741/s115>.

- [126] M. Teraa, R.W. Sprengers, Y. Van Der Graaf, C.E.J. Peters, F.L. Moll, M.C. Verhaar, Autologous bone marrow-derived cell therapy in patients with critical limb ischemia: A meta-analysis of randomized controlled clinical trials, *Ann. Surg.* 258 (2013) 922–929. <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3182854cf1>.
- [127] M. Mo, S. Wang, Y. Zhou, H. Li, Y. Wu, Mesenchymal stem cell subpopulations: phenotype, property and therapeutic potential, *Cell. Mol. Life Sci.* 73 (2016) 3311–3321. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2229-7>.
- [128] S. Lee, E. Choi, M.J. Cha, K.C. Hwang, Cell adhesion and long-term survival of transplanted mesenchymal stem cells: A prerequisite for cell therapy, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015 (2015). <https://doi.org/10.1155/2015/632902>.
- [129] M. Krampera, J. Galipeau, Y. Shi, K. Tarte, L. Sensebe, Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells-The international society for cellular therapy (ISCT) working proposal, *Cytotherapy.* 15 (2013) 1054–1061. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.010>.
- [130] D. Baksh, L. Song, R.S. Tuan, Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy, *J. Cell. Mol. Med.* 8 (2004) 301–316. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00320.x>.
- [131] J. Ankrum, J.M. Karp, Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back, *Trends Mol. Med.* 16 (2010) 203–209. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.02.005>.
- [132] K. Zaslav, B. Cole, R. Brewster, T. DeBerardino, J. Farr, P. Fowler, C. Nissen, A prospective study of autologous chondrocyte implantation in patients with failed prior treatment for articular cartilage defect of the knee: Results of the study of the treatment of articular repair (STAR) clinical trial, *Am. J. Sports Med.* 37 (2009) 42–55. <https://doi.org/10.1177/0363546508322897>.
- [133] L.K. Carr, M. Robert, P.L. Kultgen, S. Herschorn, C. Birch, M. Murphy, M.B. Chancellor, Autologous muscle derived cell therapy for stress urinary incontinence: A prospective, dose ranging study, *J. Urol.* 189 (2013) 595–601. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.09.028>.

- [134] K.A. Wright, K.B. Nadire, P. Busto, R. Tubo, J.M. McPherson, B.M. Wentworth, Alternative delivery of keratinocytes using a polyurethane membrane and the implications for its use in the treatment of full-thickness burn injury, *Burns*. 24 (1998) 7–17. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(97\)00075-2](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(97)00075-2).
- [135] F. Dazzi, J.M. Van Laar, A. Cope, A. Tyndall, Cell therapy for autoimmune diseases, *Arthritis Res. Ther.* 9 (2007). <https://doi.org/10.1186/ar2128>.
- [136] I.L. Weissman, Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution, *Cell*. 100 (2000) 157–168. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81692-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81692-X).
- [137] N. Gurusamy, A. Alsayari, S. Rajasingh, J. Rajasingh, Adult Stem Cells for Regenerative Therapy, in: *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, Elsevier B.V., 2018: pp. 1–22. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2018.07.009>.
- [138] Y. Wen, J. Ding, B. Zhang, Q. Gao, Bone marrow-derived mononuclear cell therapy for nonischemic dilated cardiomyopathy—A meta-analysis, *Eur. J. Clin. Invest.* 48 (2018). <https://doi.org/10.1111/eci.12894>.
- [139] F. Timmermans, J. Plum, M.C. Yöder, D.A. Ingram, B. Vandekerckhove, J. Case, Endothelial progenitor cells: Identity defined?, *J. Cell. Mol. Med.* 13 (2009) 87–102. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00598.x>.
- [140] C. Urbich, S. Dimmeler, Endothelial progenitor cells: Characterization and role in vascular biology, *Circ. Res.* 95 (2004) 343–353. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000137877.89448.78>.
- [141] Z. Raval, D.W. Losordo, Cell therapy of peripheral arterial disease: From experimental findings to clinical trials, *Circ. Res.* 112 (2013) 1288–1302. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300565>.
- [142] U. Martin, Therapeutic application of pluripotent stem cells: Challenges and risks, *Front. Med.* 4 (2017) 1. <https://doi.org/10.3389/fmed.2017.00229>.
- [143] M. Karin, H. Clevers, Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration, *Nature*. 529 (2016) 307. <https://doi.org/10.1038/NATURE17039>.

- [144] N.R. West, S. Mccuaig, F. Franchini, F. Powrie, Emerging cytokine networks in colorectal cancer, *Nat. Rev. Immunol.* 15 (2015) 615–629. <https://doi.org/10.1038/nri3896>.
- [145] S.I. Grivennikov, F.R. Greten, M. Karin, Immunity, Inflammation, and Cancer, *Cell.* 140 (2010) 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>.
- [146] B.M. Stramer, R. Mori, P. Martin, The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 1009–1017. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700811>.
- [147] G.C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, M.T. Longaker, Wound repair and regeneration, *Nature.* 453 (2008) 314–321. <https://doi.org/10.1038/nature07039>.
- [148] K.L. Rock, E. Latz, F. Ontiveros, H. Kono, The sterile inflammatory response, *Annu. Rev. Immunol.* 28 (2010) 321–342. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101311>.
- [149] E.I. Elliott, F.S. Sutterwala, Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly, *Immunol. Rev.* 265 (2015) 35–52. <https://doi.org/10.1111/imr.12286>.
- [150] Y. Wang, P. Shi, Q. Chen, Z. Huang, D. Zou, J. Zhang, X. Gao, Z. Lin, Mitochondrial ROS promote macrophage pyroptosis by inducing GSDMD oxidation, *J. Mol. Cell Biol.* 11 (2019) 1069–1082. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz020>.
- [151] C. Garbers, H.M. Hermanns, F. Schaper, G. Müller-Newen, J. Grötzinger, S. Rose-John, J. Scheller, Plasticity and cross-talk of Interleukin 6-type cytokines, *Cytokine Growth Factor Rev.* 23 (2012) 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2012.04.001>.
- [152] T. Kishimoto, IL-6: From its discovery to clinical applications, *Int. Immunol.* 22 (2010) 347–352. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxq030>.
- [153] E. Nikoopour, S.M. Bellemore, B. Singh, IL-22, cell regeneration and autoimmunity, *Cytokine.* 74 (2015) 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.09.007>.
- [154] S. Panayidou, Y. Apidianakis, Regenerative inflammation: Lessons from *Drosophila* intestinal epithelium in health and disease, *Pathogens.*

- 2 (2013) 209–231. <https://doi.org/10.3390/pathogens2020209>.
- [155] N. Buchon, N. Silverman, S. Cherry, Immunity in *Drosophila melanogaster*-from microbial recognition to whole-organism physiology, *Nat. Rev. Immunol.* 14 (2014) 796–810. <https://doi.org/10.1038/nri3763>.
- [156] L. Cuarental, D. Sucunza-Sáenz, L. Valiño-Rivas, B. Fernandez-Fernandez, A.B. Sanz, A. Ortiz, J.J. Vaquero, M.D. Sanchez-Niño, MAP3K kinases and kidney injury, *Nefrología.* 39 (2019) 568–580. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2019.03.004>.
- [157] H. Motomura, S. Seki, S. Shiozawa, Y. Aikawa, M. Nogami, T. Kimura, A selective c-Fos/AP-1 inhibitor prevents cartilage destruction and subsequent osteophyte formation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 497 (2018) 756–761. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.147>.
- [158] E. Stepniak, R. Ricci, R. Eferl, G. Sumara, I. Sumara, M. Rath, L. Hui, E.F. Wagner, c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity, *Genes Dev.* 20 (2006) 2306–2314. <https://doi.org/10.1101/gad.390506>.
- [159] T. Sakurai, S. Maeda, L. Chang, M. Karin, Loss of hepatic NF- κ B activity enhances chemical hepatocarcinogenesis through sustained c-Jun N-terminal kinase 1 activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 10544–10551. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603499103>.
- [160] L. Chang, H. Kamata, G. Solinas, J.L. Luo, S. Maeda, K. Venuprasad, Y.C. Liu, M. Karin, The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF α -induced cell death by inducing c-FLIPL turnover, *Cell.* 124 (2006) 601–613. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.021>.
- [161] S. Papa, F. Zazzeroni, Y.X. Fu, C. Bubici, K. Alvarez, K. Dean, P.A. Christiansen, R.A. Anders, G. Franzoso, Gadd45 β promotes hepatocyte survival during liver regeneration in mice by modulating JNK signaling, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 1911–1923. <https://doi.org/10.1172/JCI33913>.
- [162] R.F. Schwabe, D.A. Brenner, Mechanisms of liver injury. I. TNF- α -induced liver injury: Role of IKK, JNK, and ROS pathways, *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 290 (2006). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00422.2005>.

- [163] P. Hasselblatt, M. Rath, V. Komnenovic, K. Zatloukal, E.F. Wagner, Hepatocyte survival in acute hepatitis is due to c-Jun/AP-1-dependent expression of inducible nitric oxide synthase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 17105–17110. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706272104>.
- [164] E. Seki, D.A. Brenner, M. Karin, A liver full of JNK: Signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches, *Gastroenterology*. 143 (2012) 307–320. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.004>.
- [165] G. Pizzino, N. Irrera, M. Cucinotta, G. Pallio, F. Mannino, V. Arcoraci, F. Squadrito, D. Altavilla, A. Bitto, Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017 (2017). <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>.
- [166] K.H. Al-Gubory, C. Garrel, P. Faure, N. Sugino, Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress, *Reprod. Biomed. Online*. 25 (2012) 551–560. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.08.004>.
- [167] S. Kumar, A. Pandey, Free Radicals: Health Implications and their Mitigation by Herbals, *Br. J. Med. Med. Res.* 7 (2015) 438–457. <https://doi.org/10.9734/bjmmr/2015/16284>.
- [168] I.S. Young, J. V. Woodside, Antioxidants in health and disease, *J. Clin. Pathol.* 54 (2001) 176–186. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>.
- [169] B. Harwell, Biochemistry of oxidative stress, in: *Biochem. Soc. Trans.*, Portland Press, 2007: pp. 1147–1150. <https://doi.org/10.1042/BST0351147>.
- [170] F. Chen, Y. Liu, N.K. Wong, J. Xiao, K.F. So, Oxidative Stress in Stem Cell Aging, *Cell Transplant.* 26 (2017) 1483–1495. <https://doi.org/10.1177/0963689717735407>.
- [171] T. Yahata, T. Takanashi, Y. Muguruma, A.A. Ibrahim, H. Matsuzawa, T. Uno, Y. Sheng, M. Onizuka, M. Ito, S. Kato, K. Ando, Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells, *Blood*. 118 (2011) 2941–2950. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-01-330050>.
- [172] N.E. Sharpless, R.A. DePinho, How stem cells age and why this makes us grow old, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 703–713.

<https://doi.org/10.1038/nrm2241>.

- [173] M. Abe, Y. Takiguchi, S. Ichimaru, K. Tsuchiya, K. Wada, Comparison of the protective effect of N-acetylcysteine by different treatments on rat myocardial ischemia-reperfusion injury, *J. Pharmacol. Sci.* 106 (2008) 571–577. <https://doi.org/10.1254/jphs.FP0071664>.
- [174] L. Drowley, M. Okada, S. Beckman, J. Vella, B. Keller, K. Tobita, J. Huard, Cellular antioxidant levels influence muscle stem cell therapy, *Mol. Ther.* 18 (2010) 1865–1873. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.160>.
- [175] Y.L. Chiou, Y.H. Chen, T. Ke, W.S. Ko, The effect of increased oxidative stress and ferritin in reducing the effectiveness of therapy in chronic hepatitis C patients, *Clin. Biochem.* 45 (2012) 1389–1393. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.06.026>.
- [176] P. Marrazzo, C. O’leary, Repositioning natural antioxidants for therapeutic applications in tissue engineering, *Bioengineering.* 7 (2020) 1–35. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7030104>.
- [177] N. Ahangari, S. Kargozar, M. Ghayour-Mobarhan, F. Baines, A. Pashar, A. Sahebkar, G.A.A. Ferns, H.W. Kim, M. Mozafari, Curcumin in tissue engineering: A traditional remedy for modern medicine, *BioFactors.* 45 (2019) 135–151. <https://doi.org/10.1002/biof.1474>.
- [178] N.S. Chandel, H. Jasper, T.T. Ho, E. Passequé, Metabolic regulation of stem cell function in tissue homeostasis and organismal ageing, *Nat. Cell Biol.* 18 (2016) 823–832. <https://doi.org/10.1038/ncb3385>.
- [179] P.S. Roy, B.J. Saikia, Cancer and cure: A critical analysis, *Indian J. Cancer.* 53 (2016) 441–442. <https://doi.org/10.4103/0019-509X.200658>.
- [180] K.G. Kinsella, Changes in life expectancy 1900–1990, *Am. J. Clin. Nutr.* 55 (1992) 1196S–1202S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/55.6.1196S>.
- [181] D. Belpomme, P. Irigaray, L. Hardell, R. Clapp, L. Montagnier, S. Epstein, A.J. Sasco, The multitude and diversity of environmental carcinogens, *Environ. Res.* 105 (2007) 414–429. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2007.07.002>.
- [182] R.A. Merrill, Regulating Carcinogens in Food: A Legislator’s Guide to the Food Safety Provisions of the Federal Food, Drug, and Cosmetic

- Act, Mich. Law Rev. 77 (1978) 171. <https://doi.org/10.2307/1287920>.
- [183] S. Thakkar, D. Sharma, K. Kalia, R.K. Tekade, Tumor microenvironment targeted nanotherapeutics for cancer therapy and diagnosis: A review, *Acta Biomater.* 101 (2020) 43–68. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.09.009>.
- [184] T. Huo, R. Canepa, A. Sura, F. Modave, Y. Gong, Colorectal cancer stages transcriptome analysis, *PLoS One.* 12 (2017) e0188697. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188697>.
- [185] J.J. Wang, K.F. Lei, F. Han, Tumor microenvironment: Recent advances in various cancer treatments, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 22 (2018) 3855–3864. <https://doi.org/10.26355/eurrev-201806-15270>.
- [186] M. Makale, Cellular mechanobiology and cancer metastasis, *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 81 (2007) 329–343. <https://doi.org/10.1002/bdrc.20110>.
- [187] G. Lee, S.B. Han, J.H. Lee, H.W. Kim, D.H. Kim, Cancer Mechanobiology: Microenvironmental Sensing and Metastasis, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 5 (2019) 3735–3752. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b01230>.
- [188] P.K. Chaudhuri, B.C. Low, C.T. Lim, Mechanobiology of Tumor Growth, *Chem. Rev.* 118 (2018) 6499–6515. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00042>.
- [189] D.T. Butcher, T. Alliston, V.M. Weaver, A tense situation: Forcing tumour progression, *Nat. Rev. Cancer.* 9 (2009) 108–122. <https://doi.org/10.1038/nrc2544>.
- [190] G. Wang, X. Lu, P. Dey, P. Deng, C.-J.C.C. Wu, S. Jiang, Z. Fang, K. Zhao, R. Konaparthi, S. Hua, J. Zhang, E.M. Li-Ning-Tapia, A. Kapoor, C.-J.C.C. Wu, N.B. Patel, Z. Guo, V. Ramamoorthy, T.N. Tieu, T. Heffernan, D. Zhao, X. Shang, S. Khadka, P. Hou, B. Hu, E.-J. Jin, W. Yao, X. Pan, Z. Ding, Y. Shi, L. Li, Q. Chang, P. Troncoso, C.J. Logothetis, M.J. McArthur, L. Chin, Y.A. Wang, R.A. DePinho, Targeting YAP-Dependent MDSC Infiltration Impairs Tumor Progression., *Cancer Discov.* 6 (2016) 80–95. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0224>.
- [191] V. Petrova, M. Annicchiarico-Petruzzelli, G. Melino, I. Amelio, The hypoxic tumour microenvironment, *Oncogenesis.* 7 (2018) 10.

- <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0011-9>.
- [192] F.R. Balkwill, M. Capasso, T. Hagemann, The tumor microenvironment at a glance, *J. Cell Sci.* 125 (2012) 5591–5596. <https://doi.org/10.1242/jcs.116392>.
 - [193] K.P. Olive, M.A. Jacobetz, C.J. Davidson, A. Gopinathan, D. McIntyre, D. Honess, B. Madhu, M.A. Goldgraben, M.E. Caldwell, D. Allard, K.K. Frese, G. DeNicola, C. Feig, C. Combs, S.P. Winter, H. Ireland-Zecchini, S. Reichelt, W.J. Howat, A. Chang, M. Dhara, L. Wang, F. Rückert, R. Grützmann, C. Pilarsky, K. Izeradjene, S.R. Hingorani, P. Huang, S.E. Davies, W. Plunkett, M. Egorin, R.H. Hruban, N. Whitebread, K. McGovern, J. Adams, C. Iacobuzio-Donahue, J. Griffiths, D.A. Tuveson, Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer, *Science* (80-.). 324 (2009) 1457–1461. <https://doi.org/10.1126/science.1171362>.
 - [194] S. Baroni, S. Romero-Cordoba, I. Plantamura, M. Dugo, E. D’Ippolito, A. Cataldo, G. Cosentino, V. Angeloni, A. Rossini, M.G. Daidone, M. V. Iorio, Exosome-mediated delivery of miR-9 induces cancer-Associated fibroblast-like properties in human breast fibroblasts, *Cell Death Dis.* 7 (2016). <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.224>.
 - [195] L. Bochet, C. Lehuédé, S. Dauvillier, Y.Y. Wang, B. Dirat, V. Laurent, C. Dray, R. Guet, I. Maridonneau-Parini, S. Le Gonidec, B. Couderc, G. Escourrou, P. Valet, C. Muller, Adipocyte-derived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer, *Cancer Res.* 73 (2013) 5657–5668. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0530>.
 - [196] J. Lecomte, A. Masset, S. Blacher, L. Maertens, A. Gothot, M. Delgaudine, F. Bruyère, O. Carnet, J. Paupert, M. Illemann, J.M. Foidart, I.K. Lund, G. Høyer-Hansen, A. Noel, Bone marrow-derived myofibroblasts are the providers of pro-invasive matrix metalloproteinase 13 in primary tumor, *Neoplasia (United States)*. 14 (2012) 943–951. <https://doi.org/10.1593/neo.121092>.
 - [197] L.T. McDonald, D.L. Russell, R.R. Kelly, Y. Xiong, A. Motamarry, R.K. Patel, J.A. Jones, P.M. Watson, D.P. Turner, D.K. Watson, A.C. Soloff, V.J. Findlay, A.C. LaRue, Hematopoietic stem cell-derived cancer-associated fibroblasts are novel contributors to the pro-

- tumorigenic microenvironment, *Neoplasia* (United States). 17 (2015) 434–448. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2015.04.004>.
- [198] M. Quante, S.P. Tu, H. Tomita, T. Gonda, S.S.W. Wang, S. Takashi, G.H. Baik, W. Shibata, B. DiPrete, K.S. Betz, R. Friedman, A. Varro, B. Tycko, T.C. Wang, Bone Marrow-Derived Myofibroblasts Contribute to the Mesenchymal Stem Cell Niche and Promote Tumor Growth, *Cancer Cell*. 19 (2011) 257–272. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.01.020>.
- [199] D.C. Radisky, P.A. Kenny, M.J. Bissell, Fibrosis and cancer: Do myofibroblasts come also from epithelial cells via EMT?, *J. Cell. Biochem*. 101 (2007) 830–839. <https://doi.org/10.1002/jcb.21186>.
- [200] X. Tang, Y. Hou, G. Yang, X. Wang, S. Tang, Y.E. Du, L. Yang, T. Yu, H. Zhang, M. Zhou, S. Wen, L. Xu, M. Liu, Stromal miR-200s contribute to breast cancer cell invasion through CAF activation and ECM remodeling, *Cell Death Differ*. 23 (2016) 132–145. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.78>.
- [201] E.M. Zeisberg, S. Potenta, L. Xie, M. Zeisberg, R. Kalluri, Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts, *Cancer Res*. 67 (2007) 10123–10128. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-3127>.
- [202] M. Nurmik, P. Ullmann, F. Rodriguez, S. Haan, E. Letellier, In search of definitions: Cancer-associated fibroblasts and their markers, *Int. J. Cancer*. 146 (2020) 895–905. <https://doi.org/10.1002/ijc.32193>.
- [203] K. Pietras, A. Östman, Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma, *Exp. Cell Res*. 316 (2010) 1324–1331. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.045>.
- [204] S.Z. Chen, L.F. Ning, X. Xu, W.Y. Jiang, C. Xing, W.P. Jia, X.L. Chen, Q.Q. Tang, H.Y. Huang, The MIR-181d-regulated metalloproteinase Adamts1 enzymatically impairs adipogenesis via ECM remodeling, *Cell Death Differ*. 23 (2016) 1778–1791. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.66>.
- [205] L.C.L.T. van Kempen, D.J. Ruiter, G.N.P. van Muijen, L.M. Coussens, The tumor microenvironment: A critical determinant of neoplastic evolution, *Eur. J. Cell Biol*. 82 (2003) 539–548. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00346>.

- [206] I.J. Huijbers, M. Iravani, S. Popov, D. Robertson, S. Al-Sarraj, C. Jones, C.M. Isacke, A role for fibrillar collagen deposition and the collagen internalization receptor endo180 in glioma invasion, *PLoS One*. 5 (2010). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009808>.
- [207] X.F. Li, J.A. O'Donoghue, Hypoxia in microscopic tumors, *Cancer Lett.* 264 (2008) 172–180. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.02.037>.
- [208] R. Du, K. V. Lu, C. Petritsch, P. Liu, R. Ganss, E. Passegué, H. Song, S. VandenBerg, R.S. Johnson, Z. Werb, G. Bergers, HIF1 α Induces the Recruitment of Bone Marrow-Derived Vascular Modulatory Cells to Regulate Tumor Angiogenesis and Invasion, *Cancer Cell*. 13 (2008) 206–220. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.01.034>.
- [209] R. Fernandez-Alonso, M. Martin-Lopez, L. Gonzalez-Cano, S. Garcia, F. Castrillo, I. Diez-Prieto, A. Fernandez-Corona, M.E. Lorenzo-Marcos, X. Li, L. Claesson-Welsh, M.M. Marques, M.C. Marin, P73 is required for endothelial cell differentiation, migration and the formation of vascular networks regulating VEGF and TGF β signaling, *Cell Death Differ.* 22 (2015) 1287–1299. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.214>.
- [210] T.D. Nauta, M. van den Broek, S. Gibbs, T.C.T.M. van der Pouw-Kraan, C.B. Oudejans, V.W.M. van Hinsbergh, P. Koolwijk, Identification of HIF-2 α -regulated genes that play a role in human microvascular endothelial sprouting during prolonged hypoxia in vitro, *Angiogenesis*. 20 (2017) 39–54. <https://doi.org/10.1007/s10456-016-9527-4>.
- [211] M.C. Brahimi-Horn, J. Pouyssegur, Hypoxia in cancer cell metabolism and pH regulation, *Essays Biochem.* 43 (2007) 165–178. <https://doi.org/10.1042/BSE0430165>.
- [212] K. Graham, E. Unger, Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment, *Int. J. Nanomedicine*. 13 (2018) 6049–6058. <https://doi.org/10.2147/IJN.S140462>.
- [213] A. Roy Choudhury, S. Gupta, P.K. Chaturvedi, N. Kumar, D. Pandey, Mechanobiology of Cancer Stem Cells and Their Niche, *Cancer Microenviron.* 12 (2019) 17–27. <https://doi.org/10.1007/s12307-019-00222-4>.

- [214] G. Yeldag, A. Rice, A. Del Río Hernández, Chemoresistance and the Self-Maintaining Tumor Microenvironment, *Cancers* (Basel). 10 (2018) 471. <https://doi.org/10.3390/cancers10120471>.
- [215] T. Bose, A. Ciešlar-Pobuda, E. Wiechec, Role of ion channels in regulating Ca²⁺ homeostasis during the interplay between immune and cancer cells, *Cell Death Dis.* 6 (2015). <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.23>.
- [216] N. Yoshida, D.N. Granger, D.C. Anderson, R. Rothlein, C. Lane, P.R. Kvietys, Anoxia/reoxygenation-induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells, *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 262 (1992). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1992.262.6.h1891>.
- [217] A. Mantovani, M.A. Cassatella, C. Costantini, S. Jaillon, Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 519–531. <https://doi.org/10.1038/nri3024>.
- [218] C. Rolny, M. Mazzone, S. Tugues, D. Laoui, I. Johansson, C. Coulon, M.L. Squadrito, I. Segura, X. Li, E. Knevels, S. Costa, S. Vinckier, T. Dresselaer, P. Åkerud, M. De Mol, H. Salomäki, M. Phillipson, S. Wyns, E. Larsson, I. Buysschaert, J. Botling, U. Himmelreich, J.A. Van Ginderachter, M. De Palma, M. Dewerchin, L. Claesson-Welsh, P. Carmeliet, HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF, *Cancer Cell.* 19 (2011) 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.009>.
- [219] D. Laoui, E. Van Overmeire, G. Di Conza, C. Aldeni, J. Keirsse, Y. Morias, K. Movahedi, I. Houbracken, E. Schouppe, Y. Elkrim, O. Karroum, B. Jordan, P. Carmeliet, C. Gysemans, P. DeBaetselier, M. Mazzone, J.A. Van Ginderachter, Tumor hypoxia does not drive differentiation of tumor-associated macrophages but rather fine-tunes the M2-like macrophage population, *Cancer Res.* 74 (2014) 24–30. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1196>.
- [220] O.R. Colegio, N.Q. Chu, A.L. Szabo, T. Chu, A.M. Rhebergen, V. Jairam, N. Cyrus, C.E. Brokowski, S.C. Eisenbarth, G.M. Phillips, G.W. Cline, A.J. Phillips, R. Medzhitov, Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid, *Nature.* 513 (2014) 559–563. <https://doi.org/10.1038/nature13490>.
- [221] D.I. Gabrilovich, S. Nagaraj, Myeloid-derived suppressor cells as

- regulators of the immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (2009) 162–174. <https://doi.org/10.1038/nri2506>.
- [222] C.H. Chang, J. Qiu, D. O’Sullivan, M.D. Buck, T. Noguchi, J.D. Curtis, Q. Chen, M. Gindin, M.M. Gubin, G.J.W. Van Der Windt, E. Tonc, R.D. Schreiber, E.J. Pearce, E.L. Pearce, Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression, *Cell*. 162 (2015) 1229–1241. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.016>.
- [223] Q.T. Le, G. Shi, H. Cao, D.W. Nelson, Y. Wang, E.Y. Chen, S. Zhao, C. Kong, D. Richardson, K.J. O’Byrne, A.J. Giaccia, A.C. Koong, Galectin-1: A link between tumor hypoxia and tumor immune privilege, *J. Clin. Oncol.* 23 (2005) 8932–8941. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.0206>.
- [224] J. Ben-Shoshan, S. Maysel-Auslender, A. Mor, G. Keren, J. George, Hypoxia controls CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1 α , *Eur. J. Immunol.* 38 (2008) 2412–2418. <https://doi.org/10.1002/eji.200838318>.
- [225] E.T. Clambey, E.N. McNamee, J.A. Westrich, L.E. Glover, E.L. Campbell, P. Jedlicka, E.F. De Zoeten, J.C. Cambier, K.R. Stenmark, S.P. Colgan, H.K. Eltzschig, Hypoxia-inducible factor-1 α -dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012). <https://doi.org/10.1073/pnas.1202366109>.
- [226] E. V. Dang, J. Barbi, H.Y. Yang, D. Jinasena, H. Yu, Y. Zheng, Z. Bordman, J. Fu, Y. Kim, H.R. Yen, W. Luo, K. Zeller, L. Shimoda, S.L. Topalian, G.L. Semenza, C. V. Dang, D.M. Pardoll, F. Pan, Control of TH17/Treg balance by hypoxia-inducible factor 1, *Cell*. 146 (2011) 772–784. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.033>.
- [227] A. Ohta, E. Gorelik, S.J. Prasad, F. Ronchese, D. Lukashev, M.K.K. Wong, X. Huang, S. Caldwell, K. Liu, P. Smith, J.F. Chen, E.K. Jackson, S. Apasov, S. Abrams, M. Sitkovsky, A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 13132–13137. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605251103>.
- [228] K. Synnestvedt, G.T. Furuta, K.M. Comerford, N. Louis, J. Karhausen, H.K. Eltzschig, K.R. Hansen, L.F. Thompson, S.P. Colgan, Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia, *J. Clin. Invest.* 110 (2002)

- 993–1002. <https://doi.org/10.1172/jci15337>.
- [229] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA. Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
 - [230] S. Winters, C. Martin, D. Murphy, N.K. Shokar, Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening, in: *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, Elsevier B.V., 2017: pp. 1–32. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.002>.
 - [231] A.G. Waks, E.P. Winer, Breast Cancer Treatment, *JAMA.* 321 (2019) 288. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>.
 - [232] Female Breast Cancer — Cancer Stat Facts, (n.d.). <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html> (accessed June 12, 2021).
 - [233] X. Dai, H. Cheng, Z. Bai, J. Li, Breast cancer cell line classification and Its relevance with breast tumor subtyping, *J. Cancer.* 8 (2017) 3131–3141. <https://doi.org/10.7150/jca.18457>.
 - [234] E. Leung, J.E. Kim, M. Askarian-Amiri, G.J. Finlay, B.C. Baguley, Evidence for the existence of triple-negative variants in the MCF-7 breast cancer cell population, *Biomed Res. Int.* 2014 (2014). <https://doi.org/10.1155/2014/836769>.
 - [235] H.D. Soule, J. Vazquez, A. Long, S. Albert, M. Brennan, A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma^{1,2}, *J. Natl. Cancer Inst.* 51 (1973) 1409–1416. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1409>.
 - [236] B. C., E. Leung, Heterogeneity of Phenotype in Breast Cancer Cell Lines, in: *Breast Cancer - Carcinog. Cell Growth Signal. Pathways*, InTech, 2011. <https://doi.org/10.5772/21984>.
 - [237] M. Nugoli, P. Chucana, J. Vendrell, B. Orsetti, L. Ursule, C. Nguyen, D. Birnbaum, E.J.P. Douzery, P. Cohen, C. Theillet, Genetic variability in MCF-7 sublines: Evidence of rapid genomic and RNA expression profile modifications, *BMC Cancer.* 3 (2003) 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-3-13>.
 - [238] H. Buteau-Lozano, M. Ancelin, B. Lardeux, J. Milanini, M. Perrot-

- Applanat, Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by estradiol and tamoxifen in breast cancer cells: A complex interplay between estrogen receptors α and β , *Cancer Res.* 62 (2002) 4977–4984. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/62/17/4977> (accessed June 12, 2021).
- [239] F. D’Anselmi, M.G. Masiello, A. Cucina, S. Proietti, S. Dinicola, A. Pasqualato, G. Ricci, G. Dobrowolny, A. Catizone, A. Palombo, M. Bizzarri, Microenvironment promotes tumor cell reprogramming in human breast cancer cell lines, *PLoS One.* 8 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083770>.
- [240] A. Dittmer, K. Hohlfeld, J. Lützkendorf, L.P. Müller, J. Dittmer, Human mesenchymal stem cells induce E-cadherin degradation in breast carcinoma spheroids by activating ADAM10, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009) 3053–3065. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0089-0>.
- [241] A. V. Timoshenko, C. Chakraborty, G.F. Wagner, P.K. Lala, COX-2-mediated stimulation of the lymphangiogenic factor VEGF-C in human breast cancer, *Br. J. Cancer.* 94 (2006) 1154–1163. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603067>.
- [242] M. Aonuma, Y. Saeki, T. Akimoto, Y. Nakayama, C. Hattori, Y. Yoshitake, K. Nishikawa, M. Shibuya, N.G. Tanaka, Vascular endothelial growth factor overproduced by tumour cells acts predominantly as a potent angiogenic factor contributing to malignant progression, *Int. J. Exp. Pathol.* 80 (1999) 271–281. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.1999.00122.x>.
- [243] J.C. Harrell, W.W. Dye, D.C. Allred, P. Jedlicka, N.S. Spoelstra, C.A. Sartorius, K.B. Horwitz, Estrogen receptor positive breast cancer metastasis: Altered hormonal sensitivity and tumor aggressiveness in lymphatic vessels and lymph nodes, *Cancer Res.* 66 (2006) 9308–9315. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1769>.
- [244] R. Simstein, M. Burow, A. Parker, C. Weldon, B. Beckman, Apoptosis, Chemoresistance, and Breast Cancer: Insights From the MCF-7 Cell Model System, *Exp. Biol. Med.* 228 (2003) 995–1003. <https://doi.org/10.1177/153537020322800903>.
- [245] Ş. Comşa, A.M. Cîmpean, M. Raica, The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research, *Anticancer Res.* 35 (2015) 3147–3154. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26026074/> (accessed

June 12, 2021).

- [246] J. Sun, Q. Wei, Y. Zhou, J. Wang, Q. Liu, H. Xu, A systematic analysis of FDA-approved anticancer drugs, *BMC Syst. Biol.* 11 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12918-017-0464-7>.
- [247] P.A.J. Speth, Q.G.C.M. van Hoesel, C. Haanen, Clinical Pharmacokinetics of Doxorubicin, *Clin. Pharmacokinet.* 15 (1988) 15–31. <https://doi.org/10.2165/00003088-198815010-00002>.
- [248] S. Rivankar, An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy, *J. Cancer Res. Ther.* 10 (2014) 853. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139267>.
- [249] F. Arcamone, G. Cassinelli, G. Fantini, A. Grein, P. Orezzi, C. Pol, C. Spalla, Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peuceetii* var. *caesius*, *Biotechnol. Bioeng.* 11 (1969) 1101–1110. <https://doi.org/10.1002/bit.260110607>.
- [250] C. Carvalho, R. Santos, S. Cardoso, S. Correia, P. Oliveira, M. Santos, P. Moreira, Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect, *Curr. Med. Chem.* 16 (2009) 3267–3285. <https://doi.org/10.2174/092986709788803312>.
- [251] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni, Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity, *Pharmacol. Rev.* 56 (2004) 185–229. <https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6>.
- [252] V.G.S. Box, The intercalation of DNA double helices with doxorubicin and nagalomycin, *J. Mol. Graph. Model.* 26 (2007) 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2006.09.005>.
- [253] K.M. Tewey, T.C. Rowe, L. Yang, B.D. Halligan, L.F. Liu, Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II, *Science* (80-.). 226 (1984) 466–468. <https://doi.org/10.1126/science.6093249>.
- [254] A.P. Garner, M.J.I. Paine, I. Rodriguez-Crespo, E.C. Chinje, P.O. De Montellano, I.J. Stratford, D.G. Tew, C.R. Wolf, Nitric oxide synthases catalyze the activation of redox cycling and bio-reductive anticancer agents, *Cancer Res.* 59 (1999) 1929–1934. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/59/8/1929> (accessed June 13, 2021).

- [255] J. Vásquez-Vivar, P. Martasek, N. Hogg, B.S.S. Masters, K.A. Pritchard, B. Kalyanaraman, Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin, *Biochemistry*. 36 (1997) 11293–11297. <https://doi.org/10.1021/bi971475e>.
- [256] S. Cutts, L. Swift, A. Rephaeli, A. Nudelman, D. Phillips, Recent Advances in Understanding and Exploiting the Activation of Anthracyclines by Formaldehyde, *Curr. Med. Chem. Agents*. 5 (2005) 431–447. <https://doi.org/10.2174/1568011054866964>.
- [257] S.M. Cutts, P.G. Parsons, R.A. Sturm, D.R. Phillips, Adriamycin-induced DNA adducts inhibit the DNA interactions of transcription factors and RNA polymerase, *J. Biol. Chem*. 271 (1996) 5422–5429. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.10.5422>.
- [258] L.P. Swift, A. Rephaeli, A. Nudelman, D.R. Phillips, S.M. Cutts, Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death, *Cancer Res*. 66 (2006) 4863–4871. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3410>.
- [259] L.F. Liu, T.C. Rowe, L. Yang, K.M. Tewey, G.L. Chen, Cleavage of DNA by mammalian DNA topoisomerase II., *J. Biol. Chem*. 258 (1983) 15365–15370. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)43815-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)43815-4).
- [260] A.T. Hoye, J.E. Davoren, P. Wipf, M.P. Fink, V.E. Kagan, Targeting mitochondria, *Acc. Chem. Res*. 41 (2008) 87–97. <https://doi.org/10.1021/ar700135m>.
- [261] T.-S. M, D. M, G. I, S. O, W. T, S. U, Reduced creatine-stimulated respiration in doxorubicin challenged mitochondria: particular sensitivity of the heart, *Biochim. Biophys. Acta*. 1767 (2007). <https://doi.org/10.1016/J.BBABIO.2007.08.006>.
- [262] H. Nohl, A novel superoxide radical generator in heart mitochondria, *FEBS Lett*. 214 (1987) 269–273. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(87\)80068-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(87)80068-6).
- [263] H. Nohl, L. Gille, K. Staniek, The exogenous NADH dehydrogenase of heart mitochondria is the key enzyme responsible for selective cardiotoxicity of anthracyclines, *Zeitschrift Fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci*. 53 (1998) 279–285. <https://doi.org/10.1515/znc-1998-3-419>.
- [264] D. Hanahan, R.A. Weinberg, Hallmarks of cancer: The next generation, *Cell*. 144 (2011) 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

- [265] R.K. Jain, J.D. Martin, T. Stylianopoulos, The Role of Mechanical Forces in Tumor Growth and Therapy, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 16 (2014) 321–346. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071813-105259>.
- [266] H.T. Nia, L.L. Munn, R.K. Jain, Physical traits of cancer, *Science* (80-.). 370 (2020) eaaz0868. <https://doi.org/10.1126/science.aaz0868>.
- [267] G. Helmlinger, P.A. Netti, H.C. Lichtenbeld, R.J. Melder, R.K. Jain, Solid stress inhibits the growth of multicellular tumor spheroids, *Nat. Biotechnol.* 15 (1997) 778–783. <https://doi.org/10.1038/nbt0897-778>.
- [268] H.T. Nia, H. Liu, G. Seano, M. Datta, D. Jones, N. Rahbari, J. Incio, V.P. Chauhan, K. Jung, J.D. Martin, V. Askoxylakis, T.P. Padera, D. Fukumura, Y. Boucher, F.J. Hornicek, A.J. Grodzinsky, J.W. Baish, L.L. Munn, R.K. Jain, Solid stress and elastic energy as measures of tumour mechanopathology, *Nat. Biomed. Eng.* 1 (2017) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41551-016-0004>.
- [269] E. Sahai, I. Astsaturov, E. Cukierman, D.G. DeNardo, M. Egeblad, R.M. Evans, D. Fearon, F.R. Greten, S.R. Hingorani, T. Hunter, R.O. Hynes, R.K. Jain, T. Janowitz, C. Jorgensen, A.C. Kimmelman, M.G. Kolonin, R.G. Maki, R.S. Powers, E. Puré, D.C. Ramirez, R. Scherz-Shouval, M.H. Sherman, S. Stewart, T.D. Tlsty, D.A. Tuveson, F.M. Watt, V. Weaver, A.T. Weeraratna, Z. Werb, A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts, *Nat. Rev. Cancer.* 20 (2020) 174–186. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0238-1>.
- [270] T.P. Padera, B.R. Stoll, J.B. Tooredman, D. Capen, E. Di Tomaso, R.K. Jain, Cancer cells compress intratumour vessels, *Nature.* 427 (2004) 695. <https://doi.org/10.1038/427695a>.
- [271] G. Griffon-Etienne, Y. Boucher, C. Brekken, H.D. Suit, R.K. Jain, Taxane-induced apoptosis decompresses blood vessels and lowers interstitial fluid pressure in solid tumors: Clinical implications, *Cancer Res.* 59 (1999) 3776–3782. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10446995/> (accessed June 16, 2021).
- [272] T. Stylianopoulos, J.D. Martin, V.P. Chauhan, S.R. Jain, B. Diop-Frimpong, N. Bardeesy, B.L. Smith, C.R. Ferrone, F.J. Hornicek, Y. Boucher, L.L. Munn, R.K. Jain, Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors, *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (2012) 15101–15108.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1213353109>.
- [273] V.P. Chauhan, J.D. Martin, H. Liu, D.A. Lacorre, S.R. Jain, S. V. Kozin, T. Stylianopoulos, A.S. Mousa, X. Han, P. Adstamongkonkul, Z. Popović, P. Huang, M.G. Bawendi, Y. Boucher, R.K. Jain, Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels, *Nat. Commun.* 4 (2013) 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms3516>.
- [274] R.K. Jain, Antiangiogenesis Strategies Revisited: From Starving Tumors to Alleviating Hypoxia, *Cancer Cell.* 26 (2014) 605–622. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.10.006>.
- [275] L.L. Munn, R.K. Jain, Vascular regulation of antitumor immunity, *Science* (80-.). 365 (2019) 544–545. <https://doi.org/10.1126/science.aaw7875>.
- [276] C. Clavería, G. Giovinazzo, R. Sierra, M. Torres, Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo, *Nature.* 500 (2013) 39–44. <https://doi.org/10.1038/nature12389>.
- [277] M.M. Merino, R. Levayer, E. Moreno, Survival of the Fittest: Essential Roles of Cell Competition in Development, Aging, and Cancer, *Trends Cell Biol.* 26 (2016) 776–788. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.05.009>.
- [278] V.P. Chauhan, Y. Boucher, C.R. Ferrone, S. Roberge, J.D. Martin, T. Stylianopoulos, N. Bardeesy, R.A. DePinho, T.P. Padera, L.L. Munn, R.K. Jain, Compression of Pancreatic Tumor Blood Vessels by Hyaluronan Is Caused by Solid Stress and Not Interstitial Fluid Pressure, *Cancer Cell.* 26 (2014) 14–15. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.06.003>.
- [279] M.A. Swartz, A.W. Lund, Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: Linking mechanobiology with immunity, *Nat. Rev. Cancer.* 12 (2012) 210–219. <https://doi.org/10.1038/nrc3186>.
- [280] J.W. Song, L.L. Munn, Fluid forces control endothelial sprouting, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 15342–15347. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105316108>.
- [281] H. Qazi, Z.-D. Shi, J.M. Tarbell, Fluid Shear Stress Regulates the Invasive Potential of Glioma Cells via Modulation of Migratory

- Activity and Matrix Metalloproteinase Expression, *PLoS One*. 6 (2011) e20348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020348>.
- [282] W.J. Polacheck, J.L. Charest, R.D. Kamm, Interstitial flow influences direction of tumor cell migration through competing mechanisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 11115–11120. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103581108>.
- [283] H. Qazi, R. Palomino, Z.-D. Shi, L.L. Munn, J.M. Tarbell, Cancer cell glycocalyx mediates mechanotransduction and flow-regulated invasion, *Integr. Biol.* 5 (2013) 1334–1343. <https://doi.org/10.1039/c3ib40057c>.
- [284] R.K. Jain, Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: Bench to bedside to biomarkers, in: *J. Clin. Oncol.*, American Society of Clinical Oncology, 2013: pp. 2205–2218. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.3653>.
- [285] D. Fukumura, J. Kloepper, Z. Amoozgar, D.G. Duda, R.K. Jain, Enhancing cancer immunotherapy using antiangiogenics: Opportunities and challenges, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 15 (2018) 325–340. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.29>.
- [286] C.F. Guimarães, L. Gasperini, A.P. Marques, R.L. Reis, The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering, *Nat. Rev. Mater.* 5 (2020) 351–370. <https://doi.org/10.1038/s41578-019-0169-1>.
- [287] D.L. Cochlin, R.H. Ganatra, D.F.R. Griffiths, Elastography in the detection of prostatic cancer, *Clin. Radiol.* 57 (2002) 1014–1020. <https://doi.org/10.1053/crad.2002.0989>.
- [288] N.F. Boyd, Q. Li, O. Melnichouk, E. Huszti, L.J. Martin, A. Gunasekara, G. Mawdsley, M.J. Yaffe, S. Minkin, Evidence That Breast Tissue Stiffness Is Associated with Risk of Breast Cancer, *PLoS One*. 9 (2014) e100937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100937>.
- [289] G. Maskarinec, I.S. Pagano, M.A. Little, S.M. Conroy, S.Y. Park, L.N. Kolonel, Mammographic density as a predictor of breast cancer survival: The Multiethnic Cohort, *Breast Cancer Res.* 15 (2013) R7. <https://doi.org/10.1186/bcr3378>.
- [290] M.J. Paszek, N. Zahir, K.R. Johnson, J.N. Lakins, G.I. Rozenberg, A. Gefen, C.A. Reinhart-King, S.S. Margulies, M. Dembo, D. Boettiger, D.A. Hammer, V.M. Weaver, Tensional homeostasis and the malignant

- p phenotype,
- Cancer Cell*
- . 8 (2005) 241–254.
-
- <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.08.010>
- .
- [291] T.A. Ulrich, E.M. De Juan Pardo, S. Kumar, The mechanical rigidity of the extracellular matrix regulates the structure, motility, and proliferation of glioma cells, *Cancer Res.* 69 (2009) 4167–4174.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4859>.
- [292] F. Bordeleau, B.N. Mason, E.M. Lollis, M. Mazzola, M.R. Zanotelli, S. Somasegar, J.P. Califano, C. Montague, D.J. LaValley, J. Huynh, N. Mencia-Trinchant, Y.L.N. Abril, D.C. Hassane, L.J. Bonassar, J.T. Butcher, R.S. Weiss, C.A. Reinhart-King, Matrix stiffening promotes a tumor vasculature phenotype, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) 492–497. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613855114>.
- [293] J.C. Tung, J.M. Barnes, S.R. Desai, C. Sistrunk, M.W. Conklin, P. Schedin, K.W. Eliceiri, P.J. Keely, V.L. Seewaldt, V.M. Weaver, Tumor mechanics and metabolic dysfunction, *Free Radic. Biol. Med.* 79 (2015) 269–280.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.020>.
- [294] D. Wirtz, K. Konstantopoulos, P.C. Searson, The physics of cancer: The role of physical interactions and mechanical forces in metastasis, *Nat. Rev. Cancer*. 11 (2011) 512–522. <https://doi.org/10.1038/nrc3080>.
- [295] A. Pathak, S. Kumar, Independent regulation of tumor cell migration by matrix stiffness and confinement, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 10334–10339. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118073109>.
- [296] G. Charras, E. Sahai, Physical influences of the extracellular environment on cell migration, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15 (2014) 813–824. <https://doi.org/10.1038/nrm3897>.
- [297] D. Öhlund, E. Elyada, D. Tuveson, Fibroblast heterogeneity in the cancer wound, *J. Exp. Med.* 211 (2014) 1503–1523.
<https://doi.org/10.1084/jem.20140692>.
- [298] C.X. Li, N.P. Talele, S. Boo, A. Koehler, E. Knee-Walden, J.L. Balestrini, P. Speight, A. Kapus, B. Hinz, MicroRNA-21 preserves the fibrotic mechanical memory of mesenchymal stem cells, *Nat. Mater.* 16 (2017) 379–389. <https://doi.org/10.1038/nmat4780>.
- [299] J. Incio, P. Suboj, S.M. Chin, T. Vardam-Kaur, H. Liu, T. Hato, S. Babykutty, I. Chen, V. Deshpande, R.K. Jain, D. Fukumura, Metformin

- reduces desmoplasia in pancreatic cancer by reprogramming stellate cells and tumor-associated macrophages, *PLoS One*. 10 (2015) e0141392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141392>.
- [300] Y. Dong, Q. Zheng, Z. Wang, X. Lin, Y. You, S. Wu, Y. Wang, C. Hu, X. Xie, J. Chen, D. Gao, Y. Zhao, W. Wu, Y. Liu, Z. Ren, R. Chen, J. Cui, Higher matrix stiffness as an independent initiator triggers epithelial-mesenchymal transition and facilitates HCC metastasis, *J. Hematol. Oncol.* 12 (2019). <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0795-5>.
- [301] T.J. Kirby, J. Lammerding, Emerging views of the nucleus as a cellular mechanosensor, *Nat. Cell Biol.* 20 (2018) 373–381. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0038-y>.
- [302] C.M. Denais, R.M. Gilbert, P. Isermann, A.L. McGregor, M. Te Lindert, B. Weigelin, P.M. Davidson, P. Friedl, K. Wolf, J. Lammerding, Nuclear envelope rupture and repair during cancer cell migration, *Science* (80-.). 352 (2016) 353–358. <https://doi.org/10.1126/science.aad7297>.
- [303] J. Irianto, Y. Xia, C.R. Pfeifer, A. Athirasala, J. Ji, C. Alvey, M. Tewari, R.R. Bennett, S.M. Harding, A.J. Liu, R.A. Greenberg, D.E. Discher, DNA Damage Follows Repair Factor Depletion and Portends Genome Variation in Cancer Cells after Pore Migration, *Curr. Biol.* 27 (2017) 210–223. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.049>.
- [304] M. Raab, M. Gentili, H. De Belly, H.R. Thiam, P. Vargas, A.J. Jimenez, F. Lautenschlaeger, R. Voituriez, A.M. Lennon-Duménil, N. Manel, M. Piel, ESCRT III repairs nuclear envelope ruptures during cell migration to limit DNA damage and cell death, *Science* (80-.). 352 (2016) 359–362. <https://doi.org/10.1126/science.aad7611>.
- [305] U. Horzum, B. Ozdil, D. Pesen-Okvur, Step-by-step quantitative analysis of focal adhesions, *MethodsX*. 1 (2014) 56–59. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.06.004>.
- [306] J.R. Tse, A.J. Engler, Preparation of Hydrogel Substrates with Tunable Mechanical Properties, *Curr. Protoc. Cell Biol.* 47 (2010) 10.16.1–10.16.16. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1016s47>.
- [307] D.D. Schlaepfer, S.K. Mitra, D. Ilic, Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase, *Biochim. Biophys. Acta - Mol.*

- Cell Res. 1692 (2004) 77–102.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2004.04.008>.
- [308] J.G. Wang, M. Miyazu, P. Xiang, S.N. Li, M. Sokabe, K. Naruse, Stretch-induced cell proliferation is mediated by FAK-MAPK pathway, *Life Sci.* 76 (2005) 2817–2825.
<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.10.050>.
- [309] B. Knapp, I. Rebhan, A. Kumar, P. Matula, N.A. Kiani, M. Binder, H. Erfle, K. Rohr, R. Eils, R. Bartenschlager, L. Kaderali, Normalizing for individual cell population context in the analysis of high-content cellular screens, *BMC Bioinformatics.* 12 (2011) 485.
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-485>.
- [310] L. Śliwka, K. Wiktorska, P. Suchocki, M. Milczarek, S. Mielczarek, K. Lubelska, T. Cierpiął, P. Łyzwa, P. Kielbasiński, A. Jaromin, A. Flis, Z. Chilmonczyk, The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions, *PLoS One.* 11 (2016) 155772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155772>.
- [311] O. Ghali, O. Broux, G. Falgayrac, N. Haren, J.P.T.M. Van Leeuwen, G. Penel, P. Hardouin, C. Chauveau, Dexamethasone in osteogenic medium strongly induces adipocyte differentiation of mouse bone marrow stromal cells and increases osteoblast differentiation, *BMC Cell Biol.* 16 (2015). <https://doi.org/10.1186/s12860-015-0056-6>.
- [312] Y. Lee, B. Kim, S. Choi, On-chip cell staining and counting platform for the rapid detection of blood cells in cerebrospinal fluid, *Sensors (Switzerland).* 18 (2018). <https://doi.org/10.3390/s18041124>.
- [313] R.W. Forsey, J.B. Chaudhuri, Validity of DNA analysis to determine cell numbers in tissue engineering scaffolds, *Biotechnol. Lett.* 31 (2009) 819–823. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-9940-5>.
- [314] Y. Pan, N. Hu, X. Wei, L. Gong, B. Zhang, H. Wan, P. Wang, 3D cell-based biosensor for cell viability and drug assessment by 3D electric cell/matrigel-substrate impedance sensing, *Biosens. Bioelectron.* 130 (2019) 344–351. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.09.046>.
- [315] B. Gantenbein-Ritter, E. Potier, S. Zeiter, M. van der Werf, C.M. Sprecher, K. Ito, Accuracy of Three Techniques to Determine Cell Viability in 3D Tissues or Scaffolds, *Tissue Eng. Part C Methods.* 14 (2008) 353–358. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2008.0313>.

- [316] C. Divieto, M.P. Sassi, A first approach to evaluate the cell dose in highly porous scaffolds by using a nondestructive metabolic method, *Futur. Sci. OA.* 1 (2015) fso.15.58. <https://doi.org/10.4155/fso.15.58>.
- [317] Q. Li, Z. Gao, Y. Chen, M.X. Guan, The role of mitochondria in osteogenic, adipogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Protein Cell.* 8 (2017) 439–445. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0385-7>.
- [318] J.F. Gillooly, A. Hein, R. Damiani, Nuclear DNA Content Varies with Cell Size across Human Cell Types, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7 (2015) a019091. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019091>.
- [319] C.J. Gomes, M.W. Harman, S.M. Centuori, C.W. Wolgemuth, J.D. Martinez, Measuring DNA content in live cells by fluorescence microscopy., *Cell Div.* 13 (2018) 6. <https://doi.org/10.1186/s13008-018-0039-z>.
- [320] M. Ruoff, V. Kieber, S. Rebholz, C. Linnemann, H. Rinderknecht, V. Häussling, M. Häcker, L.H.H. Olde Damink, S. Ehnert, A.K. Nussler, Cell-Type-Specific Quantification of a Scaffold-Based 3D Liver Co-Culture, *Methods Protoc.* 3 (2019) 1. <https://doi.org/10.3390/mps3010001>.
- [321] R.E. Rivero, V. Capella, A. Cecilia Liaudat, P. Bosch, C.A. Barbero, N. Rodríguez, C.R. Rivarola, Mechanical and physicochemical behavior of a 3D hydrogel scaffold during cell growth and proliferation, *RSC Adv.* 10 (2020) 5827–5837. <https://doi.org/10.1039/c9ra08162c>.
- [322] M. Lavkush Bhaisare, S. Pandey, M. Shahnawaz Khan, A. Talib, H.F. Wu, Fluorophotometric determination of critical micelle concentration (CMC) of ionic and non-ionic surfactants with carbon dots via Stokes shift, *Talanta.* 132 (2015) 572–578. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.09.011>.
- [323] R. Favilla, A. Parisoli, A. Mazzini, Alkaline denaturation and partial refolding of pepsin investigated with DAPI as an extrinsic probe, *Biophys. Chem.* 67 (1997) 75–83. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(97\)00016-1](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(97)00016-1).
- [324] T.L. Riss, R.A. Moravec, A.L. Niles, S. Duellman, H.A. Benink, T.J. Worzella, L. Minor, *Cell Viability Assays*, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2016.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23805433> (accessed January 7, 2019).
- [325] L. Qi, E.K. Knapton, X. Zhang, T. Zhang, C. Gu, Y. Zhao, Pre-culture Sudan Black B treatment suppresses autofluorescence signals emitted from polymer tissue scaffolds, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08723-2>.
- [326] Adam Shlien and David Malkin, Copy number variations and cancer, *Genome Med.* 1 (2009) 1–9. <https://doi.org/10.1186/gm62>.
- [327] R.D. Emes, L. Goodstadt, E.E. Winter, C.P. Ponting, Comparison of the genomes of human and mouse lays the foundation of genome zoology, *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003) 701–709. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg078>.
- [328] M.L. Calió, D.S. Marinho, G.M. Ko, R.R. Ribeiro, A.F. Carbonel, L.M. Oyama, M. Ormanji, T.P. Guirao, P.L. Calió, L.A. Reis, M.D.J. Simões, T. Lisboa-Nascimento, A.T. Ferreira, C.R.A. Bertoncini, Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells decreases oxidative stress, apoptosis, and hippocampal damage in brain of a spontaneous stroke model, *Free Radic. Biol. Med.* 70 (2014) 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.024>.
- [329] Z. Liu, Y. Xu, Y. Wan, J. Gao, Y. Chu, J. Li, Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells prevent cardiomyocyte apoptosis induced by oxidative stress, *Cell Death Discov.* 5 (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41420-019-0159-5>.
- [330] J. Yao, J. Zheng, J. Cai, K. Zeng, C. Zhou, J. Zhang, S. Li, H. Li, L. Chen, L. He, H. Chen, H. Fu, Q. Zhang, G. Chen, Y. Yang, Y. Zhang, Extracellular vesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells alleviate rat hepatic ischemia-reperfusion injury by suppressing oxidative stress and neutrophil inflammatory response, *FASEB J.* 33 (2019) 1695–1710. <https://doi.org/10.1096/fj.201800131RR>.
- [331] D. Mushahary, A. Spittler, C. Kasper, V. Weber, V. Charwat, Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells, *Cytom. Part A.* 93 (2018) 19–31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242>.
- [332] L. Tang, N. Li, H. Xie, Y. Jin, Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva, *J. Cell. Physiol.* 226

- (2011) 832–842. <https://doi.org/10.1002/jcp.22405>.
- [333] M. Gneccchi, P. Danieli, G. Malpasso, M.C. Ciuffreda, Paracrine Mechanisms of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair, in: *Methods Mol. Biol.*, 2016: pp. 123–146. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3584-0_7.
 - [334] J.L. Spees, R.H. Lee, C.A. Gregory, Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function, *Stem Cell Res. Ther.* 7 (2016). <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0363-7>.
 - [335] R. van Lith, E.K. Gregory, J. Yang, M.R. Kibbe, G.A. Ameer, Engineering biodegradable polyester elastomers with antioxidant properties to attenuate oxidative stress in tissues, *Biomaterials.* 35 (2014) 8113–8122. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.06.004>.
 - [336] J. Li, W. Fang, T. Hao, D. Dong, B. Yang, F. Yao, C. Wang, An anti-oxidative and conductive composite scaffold for cardiac tissue engineering, *Compos. Part B Eng.* 199 (2020) 108285. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2020.108285>.
 - [337] J. Witherick, A. Wilkins, N. Scolding, K. Kemp, Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and a cell therapy approach to treatment, *Autoimmune Dis.* 1 (2011). <https://doi.org/10.4061/2011/164608>.
 - [338] F.U.R. Bhatti, S.J. Kim, A.K. Yi, K.A. Hasty, H. Cho, Cytoprotective role of vitamin E in porcine adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells against hydrogen-peroxide-induced oxidative stress, *Cell Tissue Res.* 374 (2018) 111–120. <https://doi.org/10.1007/s00441-018-2857-3>.
 - [339] D.-Y. Zhang, C.-F. Zhang, B.-C. Fu, L. Sun, X.-Q. Wang, W. Chen, W. Liu, K.-Y. Liu, G.-Q. Du, C.-Y. Ma, S.-L. Jiang, R.-K. Li, H. Tian, Sirtuin3 protects aged human mesenchymal stem cells against oxidative stress and enhances efficacy of cell therapy for ischaemic heart diseases, *J. Cell. Mol. Med.* 22 (2018) 5504–5517. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13821>.
 - [340] A. Brandl, M. Meyer, V. Bechmann, M. Nerlich, P. Angele, Oxidative stress induces senescence in human mesenchymal stem cells, *Exp. Cell Res.* 317 (2011) 1541–1547. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.02.015>.
 - [341] S. Wang, X. Qu, R.C. Zhao, Clinical applications of mesenchymal stem

- cells, *J. Hematol. Oncol.* 5 (2012) 19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-5-19>.
- [342] H. Lv, L. Li, M. Sun, Y. Zhang, L. Chen, Y. Rong, Y. Li, Mechanism of regulation of stem cell differentiation by matrix stiffness, *Stem Cell Res. Ther.* 6 (2015) 103. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0083-4>.
- [343] K. Jandl, G. Kwapiszewska, Stiffness of the extracellular matrix: A regulator of prostaglandins in pulmonary fibrosis?, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 63 (2020) 721–722. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2020-0398ED>.
- [344] I. Mozos, C. Malainer, J. Horbanczuk, C. Gug, D. Stoian, C.T. Luca, A.G. Atanasov, Inflammatory markers for arterial stiffness in cardiovascular diseases, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1058. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01058>.
- [345] S. Guixé-Muntet, M. Ortega-Ribera, C. Wang, S. Selicean, I. Andreu, J.Z. Kechagia, C. Fondevila, P. Roca-Cusachs, J.-F. Dufour, J. Bosch, A. Berzigotti, J. Gracia-Sancho, Nuclear deformation mediates liver cell mechanosensing in cirrhosis, *JHEP Reports.* 2 (2020) 100145. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100145>.
- [346] M. Islam, R. Mezencev, B. McFarland, H. Brink, B. Campbell, B. Tasadduq, E.K. Waller, W. Lam, A. Alexeev, T. Sulchek, Microfluidic cell sorting by stiffness to examine heterogenic responses of cancer cells to chemotherapy, *Cell Death Dis.* 9 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0266-x>.
- [347] A.W. Holle, J.L. Young, J.P. Spatz, In vitro cancer cell-ECM interactions inform in vivo cancer treatment, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97 (2016) 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.10.007>.
- [348] S.H. Medina, B. Bush, M. Cam, E. Sevcik, F.W. DelRio, K. Nandy, J.P. Schneider, Identification of a mechanogenetic link between substrate stiffness and chemotherapeutic response in breast cancer, *Biomaterials.* 202 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.02.018>.
- [349] G. V. Shivashankar, M. Sheetz, P. Matsudaira, *Mechanobiology, Integr. Biol. (United Kingdom).* 7 (2015) 1091–1092. <https://doi.org/10.1039/c5ib90040a>.
- [350] M.S. Samuel, J.I. Lopez, E.J. McGhee, D.R. Croft, D. Strachan, P. Timpson, J. Munro, E. Schröder, J. Zhou, V.G. Brunton, N. Barker, H.

- Clevers, O.J. Sansom, K.I. Anderson, V.M. Weaver, M.F. Olson, Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and β -catenin activation to induce epidermal hyperplasia and tumor growth, *Cancer Cell*. 19 (2011) 776–791. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.05.008>.
- [351] M. Sun, G. Chi, P. Li, S. Lv, J. Xu, Z. Xu, Y. Xia, Y. Tan, J. Xu, L. Li, Y. Li, Effects of matrix stiffness on the morphology, adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Int. J. Med. Sci.* 15 (2018) 257–268. <https://doi.org/10.7150/ijms.21620>.
- [352] T. Yeung, P.C. Georges, L.A. Flanagan, B. Marg, M. Ortiz, M. Funaki, N. Zahir, W. Ming, V. Weaver, P.A. Janmey, Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion, *Cell Motil. Cytoskeleton*. 60 (2005) 24–34. <https://doi.org/10.1002/cm.20041>.
- [353] C.M. Lo, H.B. Wang, M. Dembo, Y.L. Wang, Cell movement is guided by the rigidity of the substrate, *Biophys. J.* 79 (2000) 144–152. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(00\)76279-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(00)76279-5).
- [354] N.D. Leipzig, M.S. Shoichet, The effect of substrate stiffness on adult neural stem cell behavior, *Biomaterials*. 30 (2009) 6867–6878. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.002>.
- [355] N. Zöller, S. Schreiner, L. Petry, S. Hoffmann, K. Steinhorst, J. Kleemann, M. Jäger, R. Kaufmann, M. Meissner, S. Kippenberger, Collagen I Promotes Adipocytogenesis in Adipose-Derived Stem Cells In Vitro, *Cells*. 8 (2019) 302. <https://doi.org/10.3390/cells8040302>.
- [356] S.R. Caliari, J.A. Burdick, A practical guide to hydrogels for cell culture, *Nat. Methods*. 13 (2016) 405–414. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3839>.
- [357] E. Tsiambas, N. Mastronikolis, P.P. Fotiades, E. Kyrodi-Mos, A. Chrysovergis, V. Papanikolaou, S. Mastronikolis, D. Peschos, D. Roukas, V. Ragos, C-Jun/c-Fos complex in laryngeal squamous cell carcinoma, *J. B.U.ON.* 25 (2020) 618–620.
- [358] K.J. Kovács, c-Fos as a transcription factor: A stressful (re)view from a functional map, *Neurochem. Int.* 33 (1998) 287–297. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(98\)00023-0](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(98)00023-0).

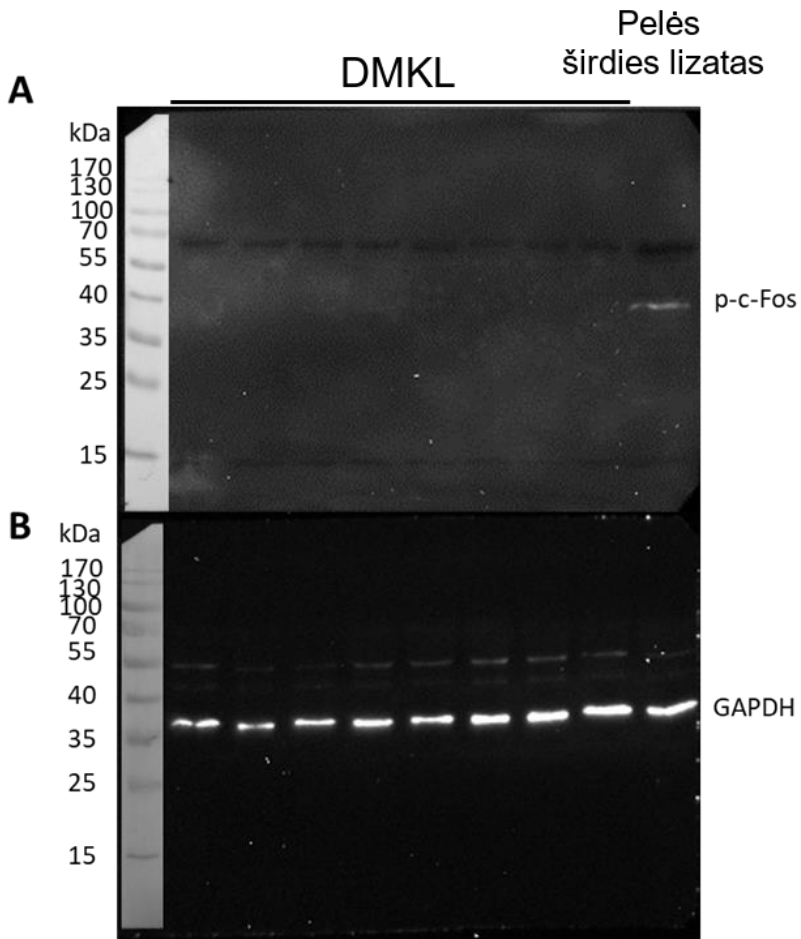
- [359] F.-W. Wang, Z. Wang, Y.-M. Zhang, Z.-X. Du, X.-L. Zhang, Q. Liu, Y.-J. Guo, X.-G. Li, A.-J. Hao, Protective effect of melatonin on bone marrow mesenchymal stem cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis in vitro, *J. Cell. Biochem.* 114 (2013) 2346–2355. <https://doi.org/10.1002/jcb.24582>.
- [360] J.H. Lee, H.K. Jung, Y.S. Han, Y.M. Yoon, C.W. Yun, H.Y. Sun, H.W. Cho, S.H. Lee, Antioxidant effects of *Cirsium setidens* extract on oxidative stress in human mesenchymal stem cells, *Mol. Med. Rep.* 14 (2016) 3777–3784. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5706>.
- [361] S.E. Hanson, J. Kim, B.H.Q. Johnson, B. Bradley, M.J. Breunig, P. Hematti, S.L. Thibeault, Characterization of mesenchymal stem cells from human vocal fold fibroblasts, *Laryngoscope.* 120 (2010) 546–551. <https://doi.org/10.1002/lary.20797>.
- [362] H. Yoshimura, T. Muneta, A. Nimura, A. Yokoyama, H. Koga, I. Sekiya, Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle, *Cell Tissue Res.* 327 (2007) 449–462. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0308-z>.
- [363] M.J. Hoogduijn, M.J. Crop, A.M.A. Peeters, G.J.V.M. Van Osch, A.H.M.M. Balk, J.N.M. Ijzermans, W. Weimar, C.C. Baan, Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities, *Stem Cells Dev.* 16 (2007) 597–604. <https://doi.org/10.1089/scd.2006.0110>.
- [364] M. Alksne, E. Simoliunas, M. Kalvaityte, E. Skliutas, I. Rinkunaite, I. Gendviliene, D. Baltriukiene, V. Rutkunas, V. Bukelskiene, The effect of larger than cell diameter polylactic acid surface patterns on osteogenic differentiation of rat dental pulp stem cells, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 9999 (2018) 1–13. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36547>.
- [365] Q.Z. Zhang, A.L. Nguyen, W.H. Yu, A.D. Le, Human oral mucosa and gingiva: A unique reservoir for mesenchymal stem Cells, *J. Dent. Res.* 91 (2012) 1011–1018. <https://doi.org/10.1177/0022034512461016>.
- [366] J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, D.M. Parkin, M. Piñeros, A. Znaor, F. Bray, Cancer statistics for the year 2020: An overview, *Int. J. Cancer.* (2021) ijc.33588. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>.
- [367] F.B. Ahmad, R.N. Anderson, The Leading Causes of Death in the US

- for 2020, JAMA - J. Am. Med. Assoc. 325 (2021) 1829–1830. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.5469>.
- [368] Y. Cui, F.M. Hameed, B. Yang, K. Lee, C.Q. Pan, S. Park, M. Sheetz, Cyclic stretching of soft substrates induces spreading and growth, *Nat. Commun.* 6 (2015) 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms7333>.
- [369] M. Ao, B.M. Brewer, L. Yang, O.E. Franco Coronel, S.W. Hayward, D.J. Webb, D. Li, Stretching fibroblasts remodels fibronectin and alters cancer cell migration, *Sci. Rep.* 5 (2015) 8334. <https://doi.org/10.1038/srep08334>.
- [370] J.M. Tse, G. Cheng, J.A. Tyrrell, S.A. Wilcox-Adelman, Y. Boucher, R.K. Jain, L.L. Munn, Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 911–916. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118910109>.
- [371] P.K. Chaudhuri, C.Q. Pan, B.C. Low, C.T. Lim, Topography induces differential sensitivity on cancer cell proliferation via Rho-ROCK-Myosin contractility, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep19672>.
- [372] S. Dupont, L. Morsut, M. Aragona, E. Enzo, S. Giullitti, M. Cordenonsi, F. Zanconato, J. Le Digabel, M. Forcato, S. Bicciato, N. Elvassore, S. Piccolo, Role of YAP/TAZ in mechanotransduction, *Nature.* 474 (2011) 179–184. <https://doi.org/10.1038/nature10137>.
- [373] J.F. Hastings, J.N. Skhinas, D. Fey, D.R. Croucher, T.R. Cox, The extracellular matrix as a key regulator of intracellular signalling networks, *Br. J. Pharmacol.* 176 (2019) 82–92. <https://doi.org/10.1111/bph.14195>.
- [374] W. Yue, J.-P. Wang, M. Conaway, S. Masamura, Y. Li, R.J. Santen, Activation of the MAPK Pathway Enhances Sensitivity of MCF-7 Breast Cancer Cells to the Mitogenic Effect of Estradiol, *Endocrinology.* 143 (2002) 3221–3229. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220186>.
- [375] C. Yang, M.W. Tibbitt, L. Basta, K.S. Anseth, Mechanical memory and dosing influence stem cell fate, *Nat. Mater.* 13 (2014) 645–652. <https://doi.org/10.1038/nmat3889>.
- [376] H. Li, Z. Huang, M. Gao, N. Huang, Z. Luo, H. Shen, X. Wang, T. Wang, J. Hu, W. Feng, Inhibition of YAP suppresses CML cell

- proliferation and enhances efficacy of imatinib in vitro and in vivo., *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 35 (2016) 134. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0414-z>.
- [377] L. Zhang, S. Yang, X. Chen, S. Stauffer, F. Yu, S.M. Lele, K. Fu, K. Datta, N. Palermo, Y. Chen, J. Dong, The hippo pathway effector YAP regulates motility, invasion, and castration-resistant growth of prostate cancer cells., *Mol. Cell. Biol.* 35 (2015) 1350–62. <https://doi.org/10.1128/MCB.00102-15>.
- [378] X. Wang, L. Su, Q. Ou, Yes-associated protein promotes tumour development in luminal epithelial derived breast cancer, *Eur. J. Cancer.* 48 (2012) 1227–1234. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2011.10.001>.
- [379] S. Piccolo, S. Dupont, M. Cordenonsi, The Biology of YAP/TAZ: Hippo Signaling and Beyond, *Physiol. Rev.* 94 (2014) 1287–1312. <https://doi.org/10.1152/physrev.00005.2014>.
- [380] Q. Chen, N. Zhang, R.S. Gray, H. Li, A.J. Ewald, C.A. Zahnow, D. Pan, A temporal requirement for Hippo signaling in mammary gland differentiation, growth, and tumorigenesis., *Genes Dev.* 28 (2014) 432–7. <https://doi.org/10.1101/gad.233676.113>.
- [381] J. Cai, N. Zhang, Y. Zheng, R.F. de Wilde, A. Maitra, D. Pan, The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program., *Genes Dev.* 24 (2010) 2383–8. <https://doi.org/10.1101/gad.1978810>.
- [382] X. Qin, X. Lv, P. Li, R. Yang, Q. Xia, Y. Chen, Y. Peng, L. Li, S. Li, T. Li, Y. Jiang, H. Yang, C. Wu, C. Zheng, J. Zhu, F. You, H. Wang, J. Chen, Y. Liu, Matrix stiffness modulates ILK-mediated YAP activation to control the drug resistance of breast cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1866 (2020) 165625. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165625>.
- [383] T.A. Theodossiou, M. Ali, M. Grigalavicius, B. Grallert, P. Dillard, K.O. Schink, C.E. Olsen, S. Wälchli, E.M. Inderberg, A. Kubin, Q. Peng, K. Berg, Simultaneous defeat of MCF7 and MDA-MB-231 resistances by a hypericin PDT–tamoxifen hybrid therapy, *Npj Breast Cancer.* 5 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41523-019-0108-8>.
- [384] N.A. Razak, N. Abu, W.Y. Ho, N.R. Zamberi, S.W. Tan, N.B. Alitheen, K. Long, S.K. Yeap, Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-

- MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37796-w>.
- [385] S.M. Shafie, L.A. Liotta, Formation of metastasis by human breast carcinoma cells (MCF-7) in nude mice, *Cancer Lett.* 11 (1980) 81–87. [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(80\)90097-X](https://doi.org/10.1016/0304-3835(80)90097-X).
- [386] M.H. Joyce, C. Lu, E.R. James, R. Hegab, S.C. Allen, L.J. Suggs, A. Brock, M. Hunter Joyce, C. Lu, E.R. James, R. Hegab, S.C. Allen, L.J. Suggs, A. Brock, Phenotypic Basis for Matrix Stiffness-Dependent Chemoresistance of Breast Cancer Cells to Doxorubicin, *Front. Oncol.* 8 (2018) 1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00337>.

PRIEDAI



P1 pav. Fosfo-c-Fos baltymo Western blot analizė DMKL su teigiama kontrole – pelės širdies lizatu. **A** – fosfo-c-Fos baltymo kiekis DMKL ir pelės širdies lizate. **B** – GAPDH baltymo lygis. GAPDH naudotas kaip užnešimo kontrolė.

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p.: info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Tiražas 12 egz.