

VILNIAUS UNIVERSITETAS
BIOCHEMIJOS INSTITUTAS

Daiva Baltriukienė

SIGNALINIŲ MOLEKULIŲ IR KELIŲ, APSPONDŽIANČIŲ
MIOGENINIŲ LĄSTELIŲ IŠGYVENIMĄ PO KARDIOTOKSINIŲ
POVEIKIŲ, IDENTIFIKAVIMAS

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, biochemija (04 P)

Vilnius, 2009

Disertacija rengta 2004 – 2009 metais Biochemijos institute

Mokslinė vadovė:

dr. Audronė Valerija Kalvelytė (Biochemijos institutas, fiziniai mokslai,
biochemija – 04P)

Turinys

Santrumpų sąrašas.....	5
Įvadas.....	6
Darbo uždaviniai.....	8
Mokslinis naujumas.....	8
Ginamieji teiginiai.....	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	11
1.1. Raumens kamieninės ląstelės, pagrindinės jų savybės.....	11
1.1.1. Satelitinių ląstelių charakterizavimas.....	13
1.1.2. Satelitinių ląstelių aktyvinimo ir diferenciacijos reguliacija.....	16
1.2. Ląstelės ciklas.....	17
1.3. Ląstelių žūtis.....	18
1.3.1. Morfologiniai ir biocheminiai apoptozės požymiai.....	19
1.3.2. Apoptozės aktyvinimas ir reguliacija.....	20
1.3.3. Apoptozė ir miogeninės ląstelės.....	23
1.4. Viduląsteliniai signaliniai keliai, nulemiantys ląstelių išgyvenimą ir žūtį.....	24
1.4.1. Mitogenų aktyvinamų proteinkinazių (MAPK) signaliniai keliai.....	24
1.4.1.1. Ekstaląstelinio signalo reguliuojama kinazė.....	26
1.4.1.2. p-38 MAP kinazė.....	28
1.4.1.3. c-Jun N-galo kinazė.....	29
1.4.1.4. Transkripcijos veiksnys c-Jun.....	30
1.4.1.5. MAPK bei c-Jun vaidmuo širdyje.....	33
1.4.2. PI3K/Akt signalinis kelias ir jo vaidmuo ląstelių išgyvenimo/žūties reguliacijoje.....	35
1.5. Patofiziologiniai veiksniai, veikiantys ląstelių gyvybingumą.....	37
1.5.1. Navikų nekrozės faktorius- α	38
1.5.2. Interleukinas -6.....	39
1.5.3. NO vaidmuo.....	41
1.5.4. Reaktyvūs deguonies dariniai.....	43
1.6. Chemoterapinės/kardiotoksinės medžiagos.....	45
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	50
2.1. Naudotos medžiagos.....	50
2.2. Miogeninių ląstelių išskyrimas iš skeleto skersaruožio raumeninio audinio ir pirminių ląstelių linijų gavimas.....	51
2.3. Palyginamajai analizei naudotų ląstelių linijų auginimas.....	51
2.4. Ląstelių skaičiaus ir jų gyvybingumo įvertinimas tripano mėliu.....	52
2.5. Ląstelių proliferacinio aktyvumo vertinimas.....	52
2.6. Augimo intensyvumo vertinimas.....	53
2.7. Imunocitochemija naudojant antikūnus, konjuguotus su šarmine fosfataze.....	53
2.8. Imunofluorocitocheminis metodas.....	54
2.9. Miogeninės diferenciacijos iniciacija.....	54
2.10. Transplantuojamų ląstelių žymėjimas.....	55
2.11. Histologinė audinio analizė.....	55
2.12. Ląstelių ciklo tyrimas tėkmės citometru.....	55
2.13. Ląstelių žūties analizė.....	56
2.14. Apoptozinių ląstelių DNR fragmentacijos tyrimas.....	57
2.15. Ląstelių linijų su įvestu c-Jun ar baltymų kinazės Akt/PKB genais gavimas....	57
2.16. Elektroporacija.....	58
2.17. Priešsprasminės c-jun sekos įvedimas.....	58

2.18. Imunoblotingas.....	59
2.19. Statistinė duomenų analizė.....	59
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	61
3.1. Kamieninių miogeninių ląstelių charakterizavimas.....	61
3.2. Miogeninių ląstelių žūtis tyrimai <i>in vitro</i>	65
3.2.1. Citokinų TNF- α ir IL-6 poveikio miogeninių ląstelių gyvybingumui tyrimas.....	67
3.2.2. Genotoksinų/kardiotoksinų medžiagų sukeltos apoptozinės žūtis įvertinimas.....	69
3.3. Signalinių molekulių, dalyvaujančių raumeninės kilmės kamieninių ląstelių išgyvenimo/žūtis procesuose, nustatymas.....	74
3.3.1. MAPK bei Akt kinazės vaidmuo miogeninių ląstelių proliferacijoje.....	75
3.3.2. MAP kinazės ERK vaidmuo miogeninių ląstelių apoptozės reguliacijoje.....	77
3.3.3. p38 MAP kinazės vaidmuo miogeninių ląstelių apoptozės reguliacijoje.....	80
3.3.4. JNK signalinio kelio vaidmuo miogeninių ląstelių apoptozės reguliacijoje.....	82
3.3.4.1. c-Jun N-galo kinazės vaidmuo.....	82
3.3.4.2. JNK kinazės aktyvinimo trukmės vaidmens tyrimas miogeninių ir vėžinių ląstelių apoptozės indukcijoje.....	85
3.3.4.3. Transkripcijos veiksnio c-Jun vaidmens miogeninių ląstelių apoptozėje tyrimas.....	88
3.3.4.4. Apoptozės iniciacijos kelių tyrimas chemoterapinių medžiagų sukultoje miogeninių ląstelių apoptozėje.....	93
3.3.5. PI3 kinazės/Akt signalinis kelias ir jo vaidmuo miogeninių ląstelių apoptozėje.....	95
3.4. Rezultatų apibendrinimas.....	103
IŠVADOS.....	111
Literatūros sąrašas.....	112
Publikacijų sąrašas.....	131

Santrumpos

AIF	apoptozę skatinantis faktorius (<i>angl.</i> apoptosis-inducing factor)
AO/EB	akridino oranžinis/etidžio bromidas (<i>angl.</i> acridine orange/ethidium bromide)
ASK1	apoptozės signalą reguliuojanti kinazė 1 (<i>angl.</i> apoptosis signal-regulating kinase 1)
CisPt	cisplatina (<i>angl.</i> cisplatin)
Cit c	citochromas c (<i>angl.</i> cytochrome c)
ERK	ekstraląstelinio signalo reguliuojama kinazė (<i>angl.</i> extracellular signal-regulated kinases)
DOX	doksorubicinas (<i>angl.</i> doxorubicin)
FasL	Fas ligandas (<i>angl.</i> Fas ligand)
HGF	hepatocitų augimo faktorius (<i>angl.</i> hepatocyte growth factor)
JNK	c-Jun N-galo kinazė (<i>angl.</i> c-Jun N-terminal kinase)
LIF	leukemiją slopinantis faktorius (<i>angl.</i> leukemia inhibitory factor)
MAPK	mitogenų aktyvinamos proteinkinazės (<i>angl.</i> mitogen-activated protein kinase)
MEF-2	miocitus stiprinantis faktorius 2 (<i>angl.</i> myocyte enhancer factor 2)
MNF	miocitų branduolio veiksnys (<i>angl.</i> myocyte nuclear factor)
MRF	miogeniniai reguliaciniai faktoriai (<i>angl.</i> myogenic regulatory factors)
NCAM	nervų ląstelių adhezijos molekulė (<i>angl.</i> neural cell adhesion molecule)
NO	azoto oksidas (<i>angl.</i> nitric oxide)
NOC-18	azoto oksido donoras (<i>angl.</i> diethylenetriamine/nitric oxide adduct, DETA/NO)
PDGF	plokštelių (trombocitų) kilmės augimo faktorius (<i>angl.</i> platelet-derived growth factor)
PDK1	nuo fosfoinozitudų priklausoma kinazė 1 (<i>angl.</i> phosphoinositide-dependent kinase-1)
PI3K	fosfotidilinozitol-3 kinazė (<i>angl.</i> phosphoinositide-3 kinase)
RDD	reaktyvūs deguonies dariniai (<i>angl.</i> reactive oxygen species)
TGF- β	transformuojantis augimo faktorius- β (<i>angl.</i> transforming growth factor- β)
TNF- α	navikų nekrozės faktorius- α (<i>angl.</i> tumor necrosis factor- α)
VCAM-1	kraujagyslių adhezijos molekulė-1 (<i>angl.</i> vascular adhesion molecule-1)

ĮVADAS

Viena iš aktualiausių sveikatos apsaugos problemų – didelis sergamumas įvairių formų kardiomiopatinėmis ligomis, kurios dažnai lemia išeminės širdies ligos vystymąsi. Kai kurias širdies funkcijas įmanoma pagerinti chirurginiu būdu, tačiau beveik nieko negalima padaryti tose organo vietose, kur yra žuvę kardiomiocitai, pavyzdžiui, miokardo infarkto atveju. Ląstelinė kardiomioplastija arba miogeninių ląstelių įsodinimas į pažeistą širdies raumenį – perspektyvi širdies ligų gydymo strategija. Nepaisant didelės pažangos šioje srityje, vis dar yra neatsakytų klausimų. Viena iš svarbiausių ląstelių transplantacijos problemų - įsodinamų miogeninių ląstelių nepakankamas išgyvenimas bei integracija pažeistame miokardo audinyje. Nustatyta, kad didžioji į širdies raumenį įsodintų ląstelių dalis žūva jau pirmosiomis dienomis po transplantacijos. Tai susiję su patofiziologiniais miokardo funkcijos pakitimais, atsirandančiais įvairių pažeidimų (pvz., išemijos-reperfuzijos, miokardo infarkto) metu. Nustatyta, kad, įvykus infarktui, pirmiausia apoptozės ir nekrozės būdu žūva kardiomiocitai. Pastarieji turi daugiau mitochondrijų, kurios gali būti laisvųjų radikalų šaltinis. Tai paveikia ir kaimyninius kardiomiocitus, ir transplantuotas ląsteles. Prasideda uždegiminis procesas, kurio metu išsiskiria įvairūs citokinai - TNF- α , IL- β ir IL-6. Visa tai turi įtakos transplantuotoms ląstelėms, kurios turi išgyventi širdyje ilgus metus, todėl gali tapti dar ir daugelio kardiotoksinių medikamentų taikiniai. Tokiu būdu, svarbiausia transplantuotų miogeninių ląstelių išgyvenimo sąlyga - atsparumas ląstelių žūtį (apoptozę ar nekrozę) indukuojantiems faktoriams.

Apoptozės vaidmuo, jos mechanizmai tiek širdies išemijos patologiniame židinyje, tiek ir miogeninių ląstelių bei širdies miocitų kultūroje yra vis dar neaiškūs. Nedaug žinių literatūroje ir apie suaugusio organizmo kamieninių ląstelių žūties/išgyvenimo reguliavimo mechanizmus. Organizme esančių kamieninių ląstelių gyvybingumo išsaugojimas yra svarbi ir aktuali problema įvairių terapijų, tarp jų ir chemoterapijos, metu.

Apoptozės reguliavime svarbų vaidmenį atlieka įvairios signalinės molekulės, iš kurių geriausiai ištirti yra mitogenų aktyvinamų proteino kinazių (MAPK) šeimos bei fosfatidilinozitol-3-kinazės/Akt (PI3K/Akt) keliai. MAPK šeimai priklausančių kinazių (ekstraląstelinio signalo reguliuojamos kinazės 1/2 (ERK1/2), c-Jun N-galo kinazės 1/2 (JNK 1/2) ir p38 MAP kinazės) aktyvinimas yra svarbus įvairių procesų, vykstančių širdyje, patogenezėje. MAPK signalinis kelias ir jo moduliacija gali skirtingai veikti širdies miogenines ląsteles įvairių terapijų metu. Žinoma, kad ERK signalinio kelio aktyvinimas pasižymi kardiomiocitus apsaugančiu veikimu, bet galimas ir neutralus jo vaidmuo. JNK pasižymi proapoptoziniu veikimu daugelyje ląstelių rūšių, tačiau yra duomenų apie kardiomiocitus nuo apoptozės apsaugantį JNK veikimą. p38 MAP kinazės, kaip ir JNK, vaidmuo priklauso nuo jos aktyvacijos intensyvumo bei trukmės ir gali būti tiek pro-, tiek ir antiapoptozinis. Tai priklauso tiek nuo ląstelių tipo, tiek nuo poveikio stiprumo.

PI3K/Akt signalinis kelias žinomas kaip sąlygojantis ląstelių išgyvenimą. Akt aktyvinimas po išemijos apsaugo kardiomiocitus nuo žūties, bet atsiranda duomenų ir apie tai, kad šis kelias gali ir nedalyvauti mioblastų išgyvenime, o kai kuriais atvejais net skatinti apoptozinę ląstelių žūtį.

Plačiai žinomas mitogenų aktyvinamų baltymų kinazių (MAPK) kaskadų bei Akt dalyvavimas, perduodant žuvimo/išgyvenimo signalus leidžia atskiras kinazes naudoti kaip taikinius terapijoje onkologinių, širdies, neurologinių ir kitų susirgimų atvejais (Dhillon ir kt., 2007). ERK, JNK ir Akt kinazių signalinių kelių modulatoriai laikomi ateities vaistais gydant vėžį, diabetą, širdies ir kraujagyslių sistemos ligas (Weston ir Davis, 2007). Taigi, suaugusio organizmo kamieninių ląstelių signalinių kelių, reguliuojančių apoptozės programas, identifikavimas yra svarbus etapas gerinant ląstelių regeneracinį potencialą ir tobulinant citoterapijos metodus.

Atsižveigiant į tai, šio **darbo tikslas** yra nustatyti signalines molekules ir kelius, atsakingus už raumeninės kilmės suaugusio organizmo kamieninių ląstelių išgyvenimą po kardiotoksinių poveikių.

Darbo uždaviniai:

- Gauti iš suaugusio organizmo raumens kamieninių ląstelių linijas.
- Įvertinti raumeninės kilmės kamieninių linijų ląstelių apoptozinį atsaką į genotoksinių/kardiotoksinių medžiagų poveikį.
- Nustatyti MAPK ir PI3K/Akt signalinių molekulių aktyvinimo charakteristikas po apoptozę indukuojančių kardiotoksinių medžiagų poveikio.
- Ištirti MAPK ir PI3K/Akt signalinių kelių vaidmenį raumeninės kilmės kamieninių ląstelių išgyvenimo/žūties procesuose.

Mokslinis naujumas

Šio darbo metu gavome pirmąsias triušio suaugusio organizmo raumeninės kilmės pirmines ląstelių linijas. Tirdami šių linijų ląstelių savybes, parodėme jų neribotą proliferacinį potencialą kultūroje *in vitro*, taip patvirtindami šių ląstelių kamieninę prigimtį. Ilgalaikis miogeninių ląstelių auginimas *in vitro* nekeitė ir jų gebėjimo diferencijuotis miogenine linkme. Ilgas auginimas *in vitro* leidžia atlikti genetines šių ląstelių modifikacijas, siekiant padidinti jų atsparumą toksiniams poveikiams, ir tokiu būdu išplečia jų terapinio panaudojimo galimybes. Ikiklinikiniai miokardo regeneracijos kamieninėmis ląstelėmis tyrimai patvirtino šių ląstelių prigijimą išeminiame židinyje.

Pirmą kartą buvo įvertintas miogeninių linijų ląstelių jautrumas galimiems toksiniams poveikiams pažeistame širdies raumenyje bei nustatytas miogeninių ląstelių žūties pobūdis po įvairaus spektro ir įvairių koncentracijų toksinių medžiagų poveikio. Nustatyta, kad ilgalaikis ląstelių auginimas *in vitro* nekeičia jų atsako į šias medžiagas.

Ištirtas mitogenų aktyvinamų baltymų kinazių (MAPK) bei Akt kinazės signalinių kelių vaidmuo miogeninių ląstelių apoptozės reguliavime. Nustatyta, kad šios signalinės molekulės dalyvauja apsaugant miogenines ląsteles nuo toksinio patofiziologinį kardiotoksiškumą imituojančių medžiagų – NO ir H₂O₂, poveikio. Parodyta, kad streso aktyvinama baltymų kinazė JNK dalyvauja miogeninių ląstelių apoptozės indukcijoje po genotoksinių medžiagų poveikio, o MAP kinazių ERK ir p38 MAPK vaidmuo apoptozės indukcijoje, šiuo atveju, yra antiapoptozinis. Iš kitos pusės, visos šios MAP kinazės yra reikalingos ląstelių proliferacijai. Nustatyta, kad pagrindinis JNK taikiny – transkripcijos veiksnys c-Jun, yra svarbus kardiotoksinių medžiagų sąlygojamai apoptozės indukcijai miogeninėse ląstelėse. Panašius rezultatus kitose ląstelių linijose yra gavę ir kiti mokslininkai (Bossy-Wetzel, ir kt., 1997; Wang ir kt., 1999).

Parodyta, kad PI3K/Akt didina miogeninių ląstelių atsparumą fiziologinėms kardiotoksinėms medžiagoms. Tyrimo metu gauti nauji, tirtų kamieninių linijų ląstelėms būdingi, duomenys apie proapoptozinį PI3K/Akt kelio veikimą. Iki tol buvo buvo manyta, kad šis signalinis kelias yra išimtinai atsakingas už ląstelių išgyvenimą, ir tik pastaraisiais metais pasirodo vis daugiau duomenų, paneigiančių šią dogmą (Fedier ir kt., 2006; van Gorp ir kt., 2006).

Mūsų gauti rezultatai apie MAPK ir Akt signalinio kelio molekulių galimą vaidmenį apsaugant kamieninių miogeninių linijų ląsteles nuo kardiotoksinių medžiagų poveikio galėtų būti panaudoti tobulinant kardiomioplastijos metodą bei pasirenkant naujas gydymo strategijas. Šių signalinių molekulių aktyvinimas transplantuojamose ląstelėse galėtų pagerinti jų regeneracinį potencialą

Ginamieji teiginiai

- Iš suaugusio triušio raumens gautų linijų ląstelės pasižymi kamieninių ląstelių savybėmis ir yra tinkamas modelis kardiomioplastijos bei kamieninių ląstelių žūties molekulinį mechanizmų tyrimams.
- Kardiotoksiniu veikimu pasižyminčios medžiagos - vandenilio peroksidas, NO donoras NOC-18 bei chemoterapiniai agentai - cisplatina ir doksorubicinas, indukuoja apoptozinę miogeninių linijų ląstelių žūtį.
- Signalinės molekulės - MAP kinazės ERK, p38 ir JNK bei Akt kinazė, yra skirtingai aktyvinamos/fosforilinamos po apoptozės induktorių poveikio; individualių signalinių molekulių aktyvinimo pobūdis skiriasi priklausomai nuo indukuojančios medžiagos.
- MAP kinazių vaidmuo miogeninių linijų ląstelių apoptozės reguliacijoje skiriasi: ERK bei p38 pasižymi apsauginiu veikimu kardiotoksinių medžiagų indukuotoje miogeninių ląstelių apoptozėje, o JNK MAP kinazės vaidmuo šių ląstelių žūties iniciacijoje priklauso nuo apoptozės induktoriaus ir gali būti tiek apoptozę stimuliuojantis, tiek ir ją slopinantis.
- PI3K/Akt signalinio kelio molekulės pasižymi apsauginiu veikimu miogeninių linijų ląstelėse po įvairių apoptozės induktorių poveikio, tačiau galimas ir proapoptozinis šio signalinio kelio veikimas.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Raumens kamieninės ląstelės, pagrindinės jų savybės

Kamieninėmis ląstelėmis yra laikomos nediferencijuotos ląstelės, gebančios atsinaujinti, proliferuoti bei diferencijuotis įvairiomis kryptimis ir tapti specializuotomis audinių ląstelėmis. Tai sąlygoja audinių atsinaujinimo ir regeneracijos procesus. Išskiriamos embrioninės kamieninės ląstelės bei suaugusio organizmo audinių kamieninės ląstelės. Pastarosioms ir yra priskiriamos raumens audinio kamieninės ląstelės, kurių dėka vyksta griaučių raumenų regeneracija. Įvykus raumens pažeidimui, šios ląstelės aktyvinasi, pradeda daugintis ir diferencijuotis į naujas subrendusias raumenines ląsteles – daugiabranduolius miovamzdelius (Grounds ir kt., 2002). Šiuo metu nustatyta, kad raumens kamieninių ląstelių populiacija nėra vienalytė. Šiai populiacijai gali būti priskiriama raumens kilmės kamieninės ląstelės, šoninė populiacija (*angl.* side population) bei satelitinės ląstelės, kurios laikomos mioblastų pirmtakais (Seidel ir kt., 2006). Raumenų satelitinės ląstelės – smulkios vienbranduolės ląstelės, esančios griaučių raumenų audinyje šalia raumeninių skaidulų. Satelitinės ląstelės išsidėsčiusios išilgai šių skaidulų tarp pamatinės laminos ir raumeninės skaidulos plazminės membranos. Tokia jų buvimo vieta raumenyje ir nulėmė jų pavadinimą. Pirmasis satelitines ląsteles aptiko A. Mauro dar 1961 m., elektroniniu mikroskopu tirdamas varlės raumens miofibriles (Mauro, 1961). Vėliau tokios ląstelės buvo atrastos ir paukščių bei žinduolių raumenyse. Nuo kaimyninių miofibrilių satelitinių ląstelių populiaciją galima atskirti ir pagal morfologinius bruožus. Šioms ląstelėms yra būdingas sąlyginai didelis branduolio/citoplazmos santykis, nedidelis branduolys ir mažai organelių. Didėjant mitoziniam aktyvumui, mažėja heterochromatino, didėja citoplazmos/branduolio santykis, daugėja viduląstelinių organelių kiekis (Hawke ir Garry, 2001; Schultz ir McCormick, 1994).

Satelitinės ląstelės lemia raumens augimą postnataliniame periode (Schultz, 1996). Tiriant pelių raumenis, nustatyta, kad satelitinių ląstelių kiekis

mažėja nuo 32 % naujagimių raumenyse iki 1-5 % - suaugusių pelių raumenyse (Hawke ir Garry, 2001). Šis mažėjimas paaiškinamas satelitinių ląstelių susiliejimu tarpusavyje ar su jau susiformavusiomis miofibrilėmis raumens vystymosi metu (Bischoff, 1994; Cooper ir kt., 2006; Seale ir Rudnicki, 2000).

Suaugusiame griaučių raumenyje fiziologinėmis sąlygomis satelitinės ląstelės yra ramybės būsenoje, nesidaugina, tačiau jų proliferacija gali būti aktyvinama streso, raumens pažeidimo ar raumens vystymosi metu (Asakura, 2003; Jankowski ir kt., 2002; Morgan ir Partridge, 2003; Seale ir Rudnicki, 2000). Aktyvintos satelitinės ląstelės įeina į ląstelės ciklą ir pradeda daugintis, o atsiradusios dukterinės ląstelės, mioblastai, toliau dauginasi ir vystosi iki galutinės diferenciacijos stadijos - daugiabranduolių raumens ląstelių (Pavlati ir Horsley, 2003). Satelitinės ląstelės skiriasi nuo dukterinių ląstelių pagal biologinius, biocheminius bei genetinius kriterijus (Charge ir Rudnicki, 2004). Suaugusiame organizme satelitinių ląstelių skaičius išlieka gana pastovus per daugybę raumenų degeneracijos ir regeneracijos ciklų dėl šių ląstelių sugebėjimo save atgaminti, kai dalis dukterinių ląstelių grįžta į ramybės būseną ir papildo satelitinių ląstelių populiaciją (Asakura 2003; Holterman ir Rudnicki, 2005). Savęs atgaminimas yra kamieninių ląstelių savybė. Yra pasiūlyti du raumens satelitinių ląstelių savęs atgaminimo modeliai: (1) asimetrinis dalijimasis, kurio metu viena dukterinė ląstelė tampa miogeniniu pirmtaku, o kita - neaktyvia satelitine ląstele; (2) miogeninių pirmtakų dediferenciacija (Hashimoto, 2007; Molofsky ir kt., 2004; Seale ir Rudnicki, 2000; Zammit ir Beauchamp, 2001). Tačiau nėra žinoma, ar visos satelitinės ląstelės, ar tik jų dalis pasižymi gebėjimu save atgaminti. Taip pat nėra ligi galo išaiškinti ramybės būsenos reguliavimo, aktyvinimo bei savęs atgaminimo molekuliniai mechanizmai. Nustatyta, kad satelitinių ląstelių kiekis mažėja organizmui senstant (Brack ir kt., 2005). Taigi, šių satelitinių ląstelių savęs atgaminimas neužtikrina jų populiacijos dydžio (Collins, 2006).

Ilgą laiką buvo manoma, kad širdies raumuo regeneruotis negali, o širdies raumens pažeidimai, pvz., miokardo infarkto atveju, gyja dėl

besidauginančių jungiamojo audinio ląstelių – tai pakeičia širdies darbą. Neseniai buvo pastebėtas tam tikras miokardo regeneracinis potencialas *in vivo*, o 2003 m. kelios nepriklausomos grupės atrado ląsteles, dalyvaujančias šiame regeneracijos procese (Grounds ir kt., 2002). Iš suaugusios žiurkės širdies buvo išskirtos Lin⁻ c-Kit⁺ ląstelės, kurias transplantavus į miokardo infarkto sritį stebėta miokardo regeneracija - infarkto sritis sumažėjo 29 %, pagerėjo širdies funkcija (Beltrami ir kt., 2003).

Beveik tuo pat metu kita grupė iš suaugusios pelės širdies išskyrė Sca-1⁺ ląsteles, kurios taip pat pasižymėjo gebėjimu regeneruoti pažeistą miokardą (Oh ir kt., 2003). Šiuo metu žinomos ir kitos tokiomis pat savybėmis pasižyminčios populiacijos (Abcg2⁺ bei isl1⁺). Kaip matome, visos jos ekspresuoja skirtingus žymenis, skirtingas yra ir jų diferenciacinis potencialas (Christoforou ir Gearhart, 2007).

1.1.1. Satelitinių ląstelių charakterizavimas

Įvairiuose audiniuose kamieninės ląstelės yra aptinkamos dėl joms būdingų žymenų. Satelitinėms ląstelėms būdingus molekulinis žymenis sąlyginai galima suskirstyti į dvi grupes – ląstelės paviršiaus baltymus ir transkripcijos faktorius.

Pirmajai grupei priskiriamas *m-cadherinas* – nuo kalcio jonų priklausoma adhezijos molekulė, lokalizuota ląstelės išorėje ir būdinga tiek ramybės būsenoje esančioms, tiek ir aktyvintoms satelitinėms ląstelėms, tačiau neaptinkama diferencijuotose miofibrilėse (Hollnagel ir kt, 2002; Irintchev ir kt., 1994; Wernig ir kt., 2004). Manoma, kad *m-cadherinas* dalyvauja palaikant satelitines ląsteles jų nišoje, o taip pat palengvina jų migraciją į raumens pažeidimo vietą (Shi ir Garry, 2006). Satelitines ląsteles jų nišoje palaiko ir kitos dvi adhezijos molekulės – nervų ląstelių adhezijos molekulė-1 (NCAM-1, dar žinoma kaip CD56) ir kraujagyslių adhezijos molekulė-1 (VCAM-1). Šios molekulės taip pat yra ramybės būsenoje esančių kamieninių miogeninių ląstelių galimi žymenis. NCAM raiška būdinga ir proliferuojantiems

mioblastams bei miofibrilėms (Hawke ir Garry, 2001; Holterman ir Rudnicki, 2005).

Ląstelėse, kurios ekspresuoja m-cadheriną, paprastai yra aptinkama ir hematopoetinių kamieninių ląstelių žymens – CD34 - raiška, tačiau ji gali būti susijusi su specifine satelitinių ląstelių stadija ar būkle, todėl kaip žymuo šių ląstelių charakterizavimui CD34 turėtų būti vartojamas atsargiai (Beauchamp ir kt, 2000; Lee ir kt., 2000; Shi ir Garry, 2006).

Literatūros duomenimis transmembraniniai heparino sulfato proteoglikanai syndecan-3 ir syndecan-4, prie kurių jungiasi įvairūs augimo faktoriai, taip pat galėtų tarnauti kaip žymenys satelitinių ląstelių aptikimui. Abu šie baltymai yra svarbūs šių ląstelių aktyvinimui, proliferacijai ir diferenciacijai griaučių raumens regeneracijos metu. Nustatyta, kad šių abiejų baltymų raiška griaučių raumenyse visiškai sutampa su hepatocitų augimo faktoriaus (HGF) receptoriaus c-met, lokalizuoto tarp bazinės membranos bei raumens miofibrilės membranos ir reikalingo aktyvintų satelitinių ląstelių migracijai, raiška. Tiek syndecan-3 ir -4, tiek c-met raiška yra būdinga ir ramybės būsenoje esančioms, ir proliferuojančioms satelitinėms ląstelėms (Cornelison ir kt., 2001; 2004). Palyginamoji analizė parodė, kad m-cadherino raiška yra būdinga mažiau nei 20% satelitinių ląstelių, tuo tarpu c-met raiška buvo registruota visose tirtose ląstelėse. Manoma, kad m-cadheriną ekspresuoja tik raumens regeneracijai pasiruošusios satelitinės ląstelės (Cornelison ir Wold, 1997; O'Brien ir kt., 2002).

Antrajai molekulinų žymenų grupei priskiriami transkripcijos veiksniai, reguliuojantys kamieninių ląstelių populiacijos likimą. Miocitų branduolio veiksnys MNF (*angl.* myocyte nuclear factor) randamas ramybės būsenoje esančiose bei aktyvintose satelitinėse ląstelėse ir, manoma, yra reikalingas jų funkcijai palaikyti. Foxk1 yra *forkhead* transkripcijos veiksnių šeimos narys, ekspresuojamas ramybės būsenoje esančių bei proliferuojančių satelitinių ląstelių. Šios šeimos nariai reguliuoja kamieninių ląstelių bei ląstelių pirmtakų likimą, o taip pat ir jų ląstelės ciklo kinetiką. Nustatyta, kad trūkstant Foxk1 sutrinka pelių raumenų augimas ir regeneracija (Hawke ir kt., 2003).

Transkripcijos veiksnių Pax3 ir Pax7 raiška yra būdinga ramybės būsenoje esančioms bei aktyvintoms satelitinėms ląstelėms. Šiuos abu transkripcijos veiksnius ekspresuojančiose griaučių raumens kamieninėse ląstelėse gali būti aktyvinami genai, reguliuojantys miogenezę, dėl to ląstelės gali diferencijuotis į miofibriles arba išlikti kaip rezervinė populiacija, nulemianti griaučių raumens regeneraciją (Buckingham ir Relaix, 2007; Relaix ir kt., 2005; 2006). Suaugusiame organizme Pax7 yra ekspresuojamas daugelio raumenų satelitinėse ląstelėse, tuo tarpu kai Pax3 – tik kai kurių raumenų satelitinėse ląstelėse, nors trumpalaikis Pax3 raiškos padidėjimas buvo parodytas šių ląstelių aktyvinimo metu. Pax7 transkripcijos veiksnio raiška išlieka satelitinių ląstelių aktyvinimo ir proliferacijos metu, tačiau mažėja miogeninės diferenciacijos metu (Zammit ir kt., 2006b). Be to, Pax7 gali pasižymėti ir antiapoptoziniu veikimu (Relaix ir kt., 2006).

Desminas yra ankstyvas miogeninių ląstelių žymuo. Jo raiška registruojama besidauginančiuose mioblastuose, jis taip pat yra svarbus subrendusių miofibrilių stabilumui. Parodyta, kad desmin^{-/-} pelių raumenys vystosi normaliai, tačiau yra sutrikęs raumenų regeneracijos procesas (O'Brien ir kt., 2002).

Apoptozę slopinančio baltymo Bcl-2 raiška aptinkama tose raumens ląstelėse, kurioms yra būdinga ir Myf5 ir/arba MyoD (raumenims specifinių transkripcijos veiksnių MRF šeimos nariai). Bcl-2 žymi ląstelių miogeninės diferenciacijos pradžią ir yra reikalingas ląstelių proliferacijai (Dominov ir kt., 1998; O'Brein ir kt., 2002).

Be to, buvo nustatyta keletas molekulinų žymenų, kuriuos ekspresuoja satelitinės ląstelės *in vivo*, tačiau jie neaptinkami pirminiuose mioblastuose. Tai IgSF4, neuritinas, Hoxc10, TcR-β, Klra18, Itm2α, G0S2 ir MEGF10 (Seale ir kt., 2004)

Literatūros duomenimis satelitinių ląstelių populiacija nėra vienalytė, o greičiau iš atskirų populiacijų, besiskiriančių savo biologinėmis ir biocheminėmis savybėmis, sudaryta visuma. Pavyzdžiui, šalia ląstelių,

pasižymintį CD34 bei Myf5 raiška, raumenyje egzistuoja ląstelės, neturinčios šių žymenų (Seale ir kt., 2001).

1.1.2. Satelitinių ląstelių aktyvinimo ir diferenciacijos reguliacija

Griaučių raumens regeneracija yra svarbiausia satelitinių ląstelių funkcija. Įvykus raumens pažeidimui, satelitinės ląstelės palieka ramybės būseną ir įsijungia į ląstelės ciklą. Pažeidimo sritis satelitinių ląstelių aktyvinimo neapriboja, jos yra aktyvinamos išilgai visos raumeninės skaidulos ir skatinama jų migracija į pažeidimo vietą. Tačiau satelitinių ląstelių migracija iš gretimų audinių yra stebima retai. Tam reikia pažeisti jungiamąjį audinį, skiriantį atskirus raumenis (Charge ir Rudnicki, 2004; Wozniak ir kt., 2005). Aktyvintos, įsijungusios į ląstelės ciklą satelitinės ląstelės jau vadinamos miogeniniais pirmtakais arba mioblastais. Yra nustatyta, kad satelitinių ląstelių aktyvinimas prasideda nuo *c-met* kolokalizacijos su ligandu – HGF bei nuo ankstyvojo atsako genų *c-jun* bei *c-fos* raiškos aktyvinimo (Holterman ir Rudnicki, 2005; Kami ir kt., 1995; Wozniak ir kt., 2005). Vėliau yra aktyvinami raumenims specifiniai transkripcijos veiksniai MRF (miogeniniai reguliaciniai faktoriai), kuriems yra priskiriama Myf5, MyoD, Mrf4 bei miogeninas. Buvo manyta, kad satelitinės ląstelės neekspresuoja nei vieno iš MRF, tačiau vėliau buvo nustatyta Myf5 geno aktyvinimas satelitinėse ląstelėse (Beauchamp ir kt., 2000; Zammit ir kt., 2006). Myf5 reguliuoja šių ląstelių proliferaciją ir homeostazę. MyoD, kurio raiška taip pat yra registruojama satelitinių ląstelių proliferacijos metu, apsprendžia diferenciacinį griaučių mioblastų potencialą (LeGrand ir Rudnicki, 2007). Mioblastų diferenciacijos pradžią žymi kitas MRF - miogeninas (Yablonka-Reuveni ir kt., 1999). Diferenciacijos pradžioje, kai tik prasideda miogenino ekspresija, mioblastai dar gali proliferuoti, o vėlesnė diferenciacijos stadija jau reikalauja visiško išėjimo iš ląstelės ciklo (Kitzmann ir Fernandez, 2001). Šiame procese dalyvauja ląstelės ciklą reguliuojantys baltymai – nuo ciklinų priklausoma kinazė, ciklinas D3, nuo ciklinų priklausomos kinazės inhibitorius p21 bei retinoblastomos baltymas pRb. Visi jie kontroliuoja galutinę miogenezės

stadiją, stabdydami ląstelės ciklą (De Falco ir kt., 2006). Vėlyvoje miogenezės stadijose kartu su MRF veikia ir MEF2 (miocitus stiprinantis faktorius) šeimos transkripcijos veiksniai, skatinantys raumens specifinių, struktūrinių baltymų raišką. Vienas jų yra MHC (miozino sunkiosios grandinės) (Charge ir Rudnicki, 2004; Yablonka-Reuveni ir kt., 2008).

Pastebėta, kad satelitinių ląstelių proliferacijai ir diferenciacijai didelę įtaką turi jas supanti aplinka (Cornelison ir kt., 2004).

1.2. Ląstelės ciklas

Ląstelės ciklas yra sudėtingas procesas, kurio metu ląstelė padvigubina savo genomą, auga ir pasidalija į dvi dukterines ląsteles. Šis procesas yra skirstomas į keturias fazes. Tuojau po pasidalijimo atsiradusios dukterinės ląstelės yra G1 augimo fazėje. Šios fazės metu ląstelės auga, vyksta normali medžiagų apykaita, sintetinama dauguma ląstelės baltymų, RNR, apvalkalėlio komponentai ir kitos molekulės. Šioje stadijoje vyksta ir pagrindinė ląstelių proliferacijos reguliacija, dalyvaujant mitogenams arba augimo veiksniams, bei inicijuojama jų diferenciacija. Mitogeniniai signalai stimuliuoja ląstelės perėjimą per G1 stadiją. *In vivo*, kaip ir *in vitro* didžiausia dalis ląstelių yra G1 stadijoje. Po jos seka fazė S. Šios fazės metu sintetinama DNR, padvigubėja genetinės medžiagos kiekis. Toliau seka ląstelės augimo bei pasiruošimo mitozei periodas, vadinamas G2 faze. Pastarajai pasibaigus, prasideda mitozė. Ląstelės ciklo dalis iki mitozės vadinama interfaze. Ląstelės ciklas baigiasi citokineze – ląstelių pasidalijimu į dvi dukterines ląsteles. Ląstelės gali laikinai palikti ciklą ir įsijungti į ramybės fazę (G0), bet po mitogeninio stimulo jos vėl sugrįžta į ciklą.

Vėlyvoje G1 fazėje yra nustatytas taškas, kurį praėjusios ląstelės tampa nepriklausomos nuo išorinių augimo faktorių. Šis taškas buvo pavadintas restrikcijos tašku (R). Tai yra ląstelių nulėmimo taškas. Jei ląstelė nėra gavusi reikiamo stimulo, ji pereina į ramybės fazę, o įveikusi R tašką yra pasiruošusi pradėti DNR replikaciją (Berndt, 1999; Garret, 2001).

Judėjimas ląstelės ciklo fazėmis ir perėjimai iš vienos fazės į kitą yra reguliuojami tam tikrose ciklo vietose, vadinamose kontrolės taškais. Šių kontrolės taškų paskirtis – tikrinti genomo vientisumą. Kiekvieną kontrolės tašką sudaro trys komponentai: sensorinis mechanizmas, aptinkantis DNR pažeidimus, signalinis kelias ir efektorius, stabdantis ląstelės ciklą. Pagrindinės ląstelės ciklo vietos, kuriose yra vykdoma DNR pažeidimų kontrolė, yra perėjimai iš G1 į S fazę ir G2 į M fazę, taip pat kontrolės taškai S ir M fazėse (Fussenegger ir Bailey, 1998; Garrett, 2001).

Ląstelės ciklo procesus kontroliuoja proteinkinazių kompleksai, kurių reguliaciniai subvienetai vadinami ciklinais (D, E, A, B), o katalitiniai – nuo ciklinų priklausomomis kinazėmis (Cdk). Cdk yra serino/treonino kinazės, kurių aktyvinimui yra būtina asociacija su ciklinais bei kinazės aktyvių domenų fosforilinimas. Buvo rastos dvi baltymų šeimos, kurios, besijungdamos su Cdk, jas inhibuoja, tokiu būdu taip pat yra vykdoma ląstelės ciklo reguliacija (Garrett, 2001).

1.3. Ląstelių žūtis

Apoptozė (*gr.* lapų kritimas) - genetiškai kontroliuojamas, fiziologinis ir evoliucijos eigoje nedaug tepakitęs procesas, svarbus embriogenezėje, ontogenezėje, bręstant imuninės sistemos ląstelėms ir kt. Tai ląstelių žūtis forma, kurios paskirtis – pažeistų ar nepageidaujamų ląstelių pašalinimas iš organizmo, suaktyvinant iš anksto užprogramuotus ląstelinius mechanizmus, kurių veikimą lemia tam tikrų genų produktai. Apoptozės metu ląstelė praranda ryšį su gretimomis ląstelėmis (prilipusios prie substrato ląstelės suapvalėja), vyksta eilė morfologinių ir biocheminių citoplazmos, branduolio ir plazminės membranos pakitimų. Branduolio pokyčiai turi vykti santykinai ankstyvoje apoptozės stadijoje, kol yra pakankami energijos, kad galėtų vykti chromatino kondensacija. Branduolys skyla į atskirus, branduolio membrana apgaubtus, fragmentus, kurių viduje yra kondensavęsis chromatinas. *In vivo* šie apoptoziniai kūneliai greit atpažįstami ir fagocituojami. Po fagocitozės jie

degraduojami lizosomose. *In vitro* apoptoziniai kūneliai išbrinksta ir yra lizuojami. Tokia galinė ląstelių žūtis *in vitro* fazė vadinama “antrine nekroze”. Įvairiose ląstelėse laikas nuo apoptozės pradžios iki apoptozinių kūnelių fagocitozės labai skiriasi, gali užtrukti nuo kelių valandų iki kelių dienų. Šio proceso metu organelės pakinta nedaug, plazminė membrana išlieka vientisa iki proceso pabaigos, todėl uždegiminė reakcija nekyla (Makin, 2002; Lawen, 2003).

Nekrozė – tai patologinė mirties forma, apimanti dideles ląstelių grupes ir sukianti uždegiminį atsaką audiniuose. Tai pasyvus procesas, kurio metu ląstelė praranda galimybę kontroliuoti jonų transportą, padidėja membranos laidumas, prasideda vandens ir ekstraląstelinų jonų difuzija į ląstelės vidų, sukianti ląstelės, ir ypač mitochondrijų, brinkimą, dėl kurio įvyksta ląstelės lizė. Žūstančios ląstelės citoplazmos turinys patenka į ekstraląstelinį skystį ir sukelia uždegiminį procesą (Franklin ir McCubrey, 2000). Branduolyje vyksta nežymūs pokyčiai, chromatinas išlieka nepakitęs, vyksta atsitiktinė DNR degradacija (Al Rubeai ir kt., 1998). Energija šiuo atveju nereikalinga. Nekrozinė ląstelių žūtis gali pasireikšti ir ląstelių kultūrose dėl spartėjančios apoptozės, kur nėra fagocituojančių ląstelių (Lawen, 2003).

1.3.1. Morfologiniai ir biocheminiai apoptozės požymiai

Apoptozė - genų reguliuojamas, energijos reikalaujantis procesas, sukiantis intraląstelinį komponentų degradaciją ir pokyčius plazminėje membranoje. Ankstyvoje šio proceso stadijoje fosfatidilserinas, normaliai esantis vidinėje plazminės membranos pusėje, yra translokuojamas į ląstelės išorę. Dėl to vėliau susiformavusius apoptozinius kūnelius atpažįsta fagocitai. Būdingas apoptuojančios ląstelės požymis yra branduolio bei pačios ląstelės tūrio sumažėjimas, nes yra slopinama Na^+ , K^+ , Cl^- transporto sistema, skysčiai išteka į išorę. Vyksta ląstelės membranos raukšlėjimasis ir tolygi chromatino kondensacija (Ortiz ir kt., 1996).

Apoptozinems ląstelėms yra būdinga padidėjusi viduląstelinio Ca^{2+} koncentracija. Ca^{2+} patenka į ląstelę iš tarpląstelinės erdvės bei yra išlaisvinamas iš endoplazminio tinklo ir mitochondrijų. Ca^{2+} kiekio padidėjimas aktyvina endonukleazes, audinių transgliutaminazes bei proteazes, dalyvaujančias apoptozės iniciacijoje (Szabadkai ir Rizzuto, 2004). Be to, Ca^{2+} jonai yra atsakingi už citoskeleto komponentų pokyčius ir ląstelės formos bei dydžio pasikeitimus.

Būdingas apoptozės bruožas – endonukleazių sąlygojama internukleosominė DNR fragmentacija į maždaug 180 bp kartotinius fragmentus. Elektroforezės metodu analizuojant, gaunamas tipiškas “DNR kopėčių” vaizdas. Šalia nuo $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ priklausomų endonukleazių DNR fragmentacijos procese dalyvauja nukleazės, aktyvios rūgštiniame pH, nes, veikiant kaspazėms, kai kurių ląstelių vidus apoptozės metu rūgštėja dėl pakitusio Na^+/H^+ santykio (Widlak, 2000; Barišic ir kt., 2003). Apoptozei būdingi morfologiniai pokyčiai gali vykti ir be intensyvaus DNR skaldymo. Tokie pokyčiai vyksta netgi neturinčiose branduolio ląstelėse. Tai rodo, kad pagrindinis vaidmuo tenka citozolio veiksniams, o DNR fragmentacija yra vėlesnis įvykis. Apoptozės pabaigoje proteazės katalizuoja citoskeleto komponentų bei branduolio laminos degradaciją (Tohrnberry ir Lezebnik, 1998).

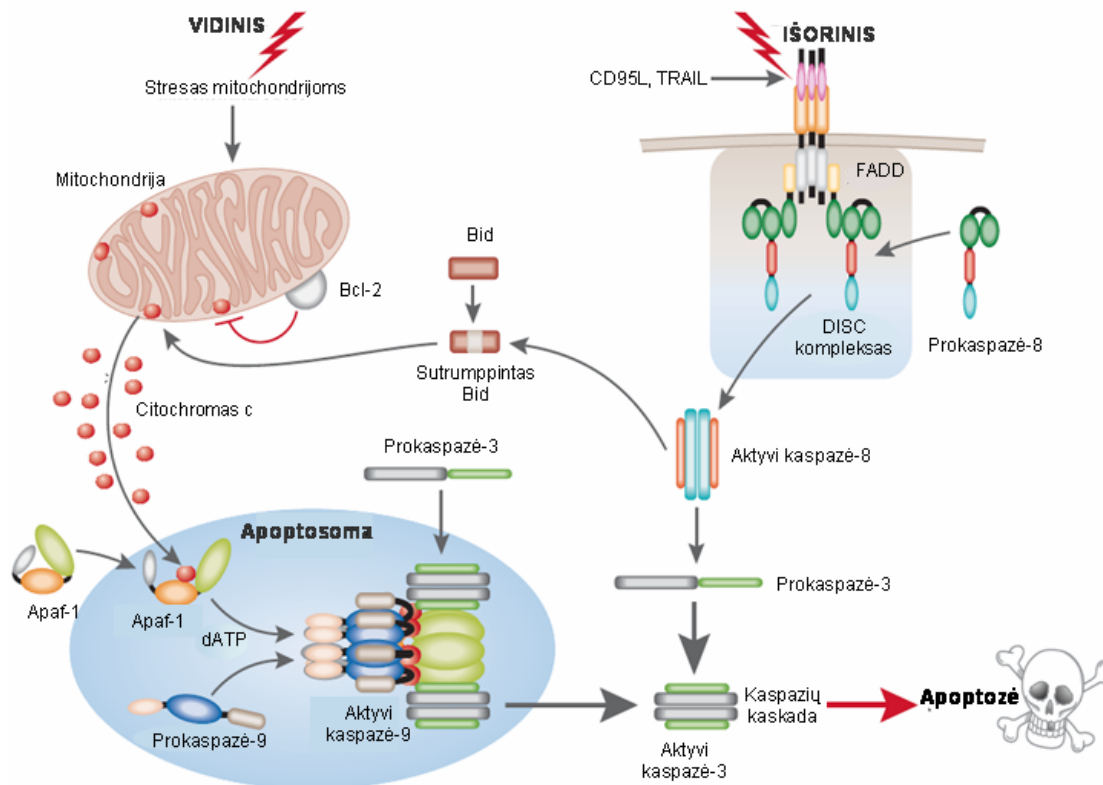
1.3.2. Apoptozės aktyvinimas ir reguliacija

Apoptozę inicijuoja išoriniai poveikiai, pažeidžiantys ląstelės membraną bei sąlygojantys DNR pažeidimus (UV, jonizuojanti spinduliuotė, alkilinančios bei oksiduojančios medžiagos, aukštesnė temperatūra), o taip pat veiksniai, aktyvinantys mirties receptorius (gliukokortikoidai, $\text{TNF-}\alpha$, augimo faktorių netekimas ir kt.).

Egzistuoja bent du apoptozės iniciacijos keliai: receptorinis (išorinis) ir mitochondrinis (vidinis) (1.1 pav.) (Adams, 2003; Danial ir Korsmeyer, 2004).

Išorinis apoptozės iniciacijos kelias. Šiuo atveju yra aktyvinami mirties receptoriai Fas ir TNF. Fas, dar žinomas kaip CD95 arba APO-1 yra transmembraninis glikoproteinas, kurį aktyvina Fas ligandas (FasL). Fas citoplazminis domenas, vadinamas “mirties domenu”, yra svarbus apoptozės indukcijai. Fas susijungus su FasL, vyksta receptoriaus trimerizacija, ir per adaptorinę molekulę - Fas asocijuotą baltymą su mirties domenu (FADD) - aktyvinama cisteino proteazė – kaspazė-8. Aktyvi kaspazė-8 skelia ir aktyvina Bcl-2 šeimos baltymą Bid, pasižymintį proapoptoziniu veikimu, kuris toliau sukelia citochromo c (cit c) išlaisvinimą iš mitochondrijų ir po to sekantį kaspazės 9 aktyvinimą (Laken ir Leonard, 2001). Kaspazės-8 aktyvinimą blokuoja kaspazės homologas c-FLIP (Hengartner, 2000). Fas susijungus su FasL gali būti aktyvinama ir kita kaspazė (kaspazė-2). Šiuo atveju dalyvauja ir kita adaptorinė molekulė - RAIDD baltymas. Kitą receptorių – TNF –aktyvina su TNF susijęs apoptozę indukuojantis ligandas (TRAIL) (Kam ir Ferch, 2000).

Vidinis apoptozės kelias gali būti inicijuojamas išorinių bei vidinių veiksnių, lemiančių proapoptozinių Bcl-2 šeimos baltymų aktyvinimą. Šie baltymai žinomi kaip apoptozės reguliatoriai. Viena pagrindinių Bcl-2 šeimos baltymų funkcijų yra reguliuoti mitochondrijų membranos vientisumą ir cit c išlaisvinimą. Šie baltymai gali reguliuoti kalcio kanalus (Kam ir Ferch, 2000). Šios šeimos baltymai pasižymi dvejopu veikimu: jie gali apoptozę skatinti (Bcl-x_S, Bax, Bad, Bid ir Bak) arba slopinti (Bcl-2, Bcl-x_L). Jie tarpusavyje sudaro homo- ar heterodimerinius kompleksus. Ląstelės likimas įvairių stresų metu priklauso nuo pro- ir antiapoptozinių baltymų santykio šiuose kompleksuose. Nustatyta, kad Bax homodimerai padidina mitochondrijų membranų laidumą, mitochondrijos brinksta, suardomos, ir tokiu būdu išlaisvinamas cit c bei kai kurios kaspazės. Iš mitochondrijų išlaisvintas cit c jungiasi su apoptozę aktyvinančiu faktoriumi-1 (Apaf-1) ir aktyvina kaspazę-9. Apaf-1, cit c ir kaspazė-9 sudaro kompleksą – apoptosomą, aktyvinančią kaspazę-3 (Hengartner, 2000; Franklin ir McCubrey, 2000).



1.1. pav. Apoptozės iniciacijos keliai: išorinis receptorių kelias, prasidedantis nuo Fas/CD95 receptoriaus (dešinėje) ir vidinis, nuo mitochondrijų priklausantis, apoptozės kelias (kairėje) (adaptuota pagal MacFarlane ir Williams, 2004).

Abu paminėti iniciatorinių kaspazių (-8 arba -9) aktyvinimo keliai susitinka efektorinės kaspazės-3 aktyvinimo taške. Ši kaspazė būtina daugelio charakteringų branduolio pokyčių atsiradimui: chromatino kondensacijai, DNR fragmentacijai, taip pat lemia kitų apoptozės požymių atsiradimą. Kaspazės skaldo ir inaktyvina baltymus, svarbius ląstelės citoskeleto palaikymui, DNR reparacijai, signalo perdavimui ir ląstelės ciklo kontrolei (Laken ir Leonard, 2001).

Apoptozė – genetiškai reguliuojama ląstelės žūties forma, kuriai reikalinga tam tikrų genų raiška arba jos slopinimas. Kai kuriais atvejais apoptozė gali vykti nedalyvaujant branduoliui, jeigu genetinis mechanizmas ekspresuojamas pastoviai. Be *Bcl-2* genų, koduojančių regulatorinius apoptozės baltymus, kurių funkcijas jau aptarėme, apoptozei yra svarbūs *p53* genai, koduojantys vėžio supresorių ir transkripcijos veiksnį p53. p53 padidina

ląstelės oksidacijos-redukcijos potencialą kontroliuojančių genų transkripciją. Dėl to gaminasi reaktyvūs deguonies dariniai, sutrikdantys mitochondrijų reguliaciją, pakinta elektronų transportas, oksidacinis fosforilinimas, ATP sintezė, išlaisvinami baltymai, aktyvinantys kaspazes (Green ir Reed, 1998). Be to, p53 aktyvina proapoptozinio *Bax*, o slopina antiapoptozinio *Bcl-2* transkripciją, keičia jų santykį ir aktyvina mitochondrinį apoptozės kelią. p53 taip pat gali reguliuoti ir receptorinį apoptozės kelią, aktyvindamas Fas receptoriaus transkripciją (Blatt ir Glick, 2001). Apoptozės indukcijoje gali dalyvauti ir protoonkogenų *c-myc* ir *c-jun* koduojami transkripcijos veiksniai (Kam ir Ferch, 2000). Detaliau vieno jų, c-Jun baltymo vaidmenį apoptozės aktyvinime aptarsime vėliau.

1.3.3. Apoptozė ir miogeninės ląstelės

Nors apoptozė, kaip reguliuojama ląstelių žūtis forma, žinoma nuo 1972 m., tačiau jos vaidmuo širdies ligų vystymesi pirmą kartą buvo paminėtas tik 1994 m. (Gottlieb ir kt., 1994). Iki tol manyta, kad miokardo infarkto bei kitų ūmių širdies ligų metu kardiomiocitai žūsta išimtinai nekrozės būdu (Kang, 2001). Šiuo metu nustatyta, kad miokardo infarkto metu apoptozė yra pagrindinė ląstelių žūtis forma. Yra daug veiksnių, lemiančių apoptozės iniciaciją širdies ląstelėse. Tai reaktyvūs deguonies dariniai (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot}), citokinai (TNF- α , IL-6 ir kt.), azoto oksidas, neurohumoraliniai veiksniai (angiotenzinas II), mechaninis stresas, kardiotoksiniai medikamentai (Feuerstein, 1999).

Ypač akivaizdžiai apoptozė pasireiškia išemijos, kuri aktyvina tiek išorinį, tiek ir vidinį apoptozės iniciacijos kelius, metu. Nustatyta, kad Fas receptoriaus mutacija daugiau nei 60% sumažina kardiomiocitų apoptozę bei infarkto zonos sritį (Lee ir kt., 2003a). Panašiai infarkto sritį mažina ir antiapoptozinio baltymo *Bcl-2* raiškos padidėjimas (Chen ir kt., 2001). Kardiomiopatijos metu, lyginant su išemija, registruojamas apoptozės dažnis yra labai neaukštas (0.08% - 0.25%), tačiau ir tai lemia žymius pakitimus

širdyje. Palyginimui, sveikoje širdyje apoptozės dažnis yra tik 0.001–0.002% (Foo ir kt., 2005).

Ląstelių žūtis yra ląstelių transplantacijos efektyvumą mažinantis faktorius. Nustatyta, kad didžioji dalis į širdies raumenį įsodintų ląstelių žūna per pirmas dvi dienas po operacijos. Jų gyvybingumui didelės įtakos turi uždegiminis procesas. Be to, kardiomiocitai turi daugiau mitochondrijų, kurios gali būti reaktyvių deguonies darinių (RDD) šaltinis. Išsiskyre RDD veikia ne tik transplantuotas ląsteles, bet ir kaimyninius kardiomiocitus (Suzuki ir kt., 2004). Manoma, kad transplantuotų miocitų žūtis širdyje gali būti inicijuojama aktyvinant perforino/granzimo bei Fas/FasL signalinius kelius (Kageyama ir kt., 1998), tačiau kitais duomenimis išorinis apoptozės indukcijos kelias nėra svarbus kardiomiocitų apoptozės iniciacijai (Bishopric ir kt., 2001; Gustafsson ir Gottlieb, 2003).

Kaspazė 3 yra viena svarbiausių efektorinių kaspazių, kurios aktyvinimo taške susikerta išorinis ir vidinis apoptozės iniciacijos keliai. Fernando su kolegomis nustatė, kad kaspazė 3 taip pat gali dalyvauti ir griaučių mioblastų diferenciacijos procese. Tai labai netikėtas šios kinazės vaidmuo (Fernando ir kt., 2002).

1.4. Viduląsteliniai signaliniai keliai, nulemiantys ląstelių išgyvenimą ir žūtį

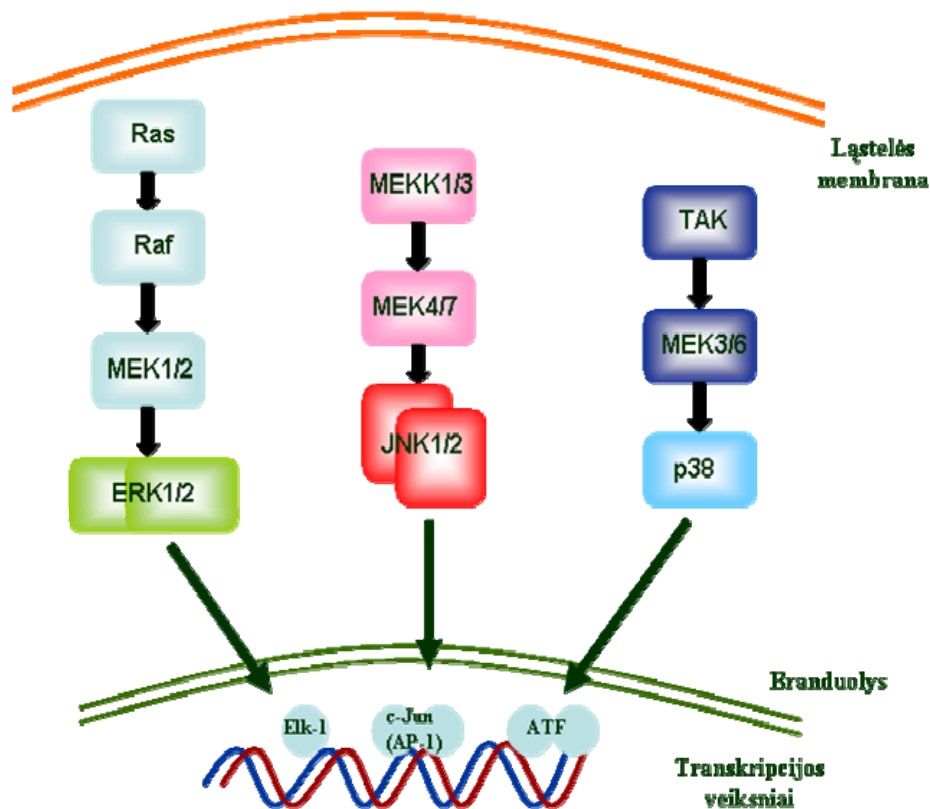
1.4.1 Mitogenų aktyvinamų proteinkinazių (MAPK) signaliniai keliai

Eukariotinės ląstelės, reaguodamos į įvairius išorės poveikius, aktyvina signalo perdavimo mechanizmus, iš kurių vienas svarbiausių - mitogenų aktyvuojamų proteinkinazių (MAPK) šeimos reguliuojamas signalinis kelias. MAP kinazės yra labai konservatyvios signalinės molekulės, sutinkamos įvairiuose organizmuose nuo mielių iki žinduolių ir jungiančios ląstelės paviršiaus receptorius su esminiais regulatoriniais taikiniais ląstelėje. Jos reguliuoja svarbius ląstelei procesus - proliferaciją, diferenciaciją, vystymąsi, ląstelės ciklą, žūtį ir išgyvenimą. Tačiau širdies ląstelės yra visiškai

diferencijuotos, ir jų dalijimasis yra negalimas, todėl čia MAPK daugiausia dalyvauja kardiomiocitų, o taip pat ir transplantuotų ląstelių atsake į stresą, ir reguliuoja ląstelių žūtį ir/arba išgyvenimą.

MAPK signalo perdavimo kelią sudaro trijų kinazių kaskada - MAPK kinazės kinazė (MAPKKK), fosforilanti ir aktyvinanti dvigubo specifiškumo MAPK kinazę (MKK arba MEK), o pastaroji jau fosforilina ir aktyvina MAPK (1.2 pav.). Svarbiausi MAPK kinazių taikiniai – transkripcijos veiksniai, reguliuojantys genų ekspresiją (Pearson ir kt., 2001). Tačiau tik dalis aktyvintų MAPK patenka į branduolį, kitos lieka citoplazmoje subląsteliniuose kompartmentuose. Dėl to, MAPK gali reguliuoti genų ekspresiją potranskripciniame lygmenyje, kuris apima taikinius citoplazmoje (Davis, 1993; Chen ir kt., 2000). MAP kinazės taip pat gali dalyvauti ir transliacijos kontrolėje, tik šiuo atveju jos veikia dalyvaujant efektorinėms kinazėms: MAPKAPK2 ir MNK1 (Chang ir Karin, 2001). Žinduolių ląstelėse randamos mažiausiai keturios MAPK grupės: ekstraląstelinio signalo reguliuojama proteino kinazė (ERK1/2), c-Jun N-galinė kinazė (JNK1/2/3), p38 (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) ir ERK5/big MAPK1 (BMK1). Visoms MAPK būdinga tai, kad jos aktyvinamos fosforilinant Thr-X-Tyr motyvą (X yra Glu ERK kinazės atveju, Pro – JNK ir Gly – p38-MAPK) (Cowan ir Storey, 2003; Widmann ir kt., 1999). Atskiras MAP kinazės aktyvina skirtingi veiksniai. Visuotinai priimta, kad ERK signalo perdavimo kelias, aktyvinamas augimo veiksnių, yra atsakingas už ląstelės ciklo bei jos proliferacijos reguliaciją, o JNK bei p38 MAP kinazės reaguoja į stresinius poveikius. Dėl šios priežasties pastarosios dvi MAPK kinazės dar vadinamos streso aktyvinamomis proteinkinazėmis (SAPK) (Feuerstein ir Young, 2000).

MAPK vaidmuo ląstelių atsake labai priklauso nuo pačių ląstelių kilmės. Kai kuriais atvejais jos gali veikti kooperatyviai, kai kuriais – antagonistiskai (Robinson ir Cobb, 1997).



1.2 pav. MAP kinazių signalo perdavimo keliai.

1.4.1.1. Ekstraląstelinio signalo reguliuojamos kinazės

Tai pirmasis atrastas MAPK signalo perdavimo kelias, apie kurį šiuo metu yra sukaupta ypatingai daug žinių. Šis kelias paprastai prasideda augimo faktorių aktyvinamais Ras baltymais, kurie toliau perduoda signalą Raf-MEK1/2-ERK1/2. ERK1/2 kinazės yra svarbios ląstelės proliferacijai, diferenciacijai, ląstelės ciklo reguliacijai bei išgyvenimui. ERK signalinį kelią aktyvina labai įvairūs faktoriai: citokinai, augimo faktoriai, virusinės infekcijos, kancerogenai ir kt. (Johnson ir Lapadat, 2002; Krauss, 2008). Aktyvintos ERK patenka į branduolį, kur reguliuoja ankstyvo atsako genus. ERK1/2 veikimas pasireiškia jų gebėjimu stimuliuoti DNR sintezę, skatinti baltymų transliaciją, fosforilinti ir aktyvinti transkripcijos veiksnius, dalyvaujančius ląstelių proliferacijos reguliacijoje (Graves ir kt., 2000; Zhang and Liu, 2002).

Nustatytas svarbus ryšys tarp MEK1/2-ERK1/2 signalo perdavimo kelio ir ląstelės ciklo. Tiriant Ras/Raf signalinį kelią PC12 ląstelėse, pastebėta, kad trumpalaikis ERK aktyvinimas skatina ląstelių proliferaciją, o ilgalaikis – nulemia jų išėjimą iš ląstelės ciklo ir diferenciacijos iniciaciją (Buchkovich ir Ziff, 1994; Marshall, 1995). Taigi, ERK signalinė kaskada atlieka esminį vaidmenį ląstelės ciklo reguliacijoje. Literatūros duomenimis ERK1/2 reguliuoja ląstelės ciklą, skatindamos ciklino D1 geno transkripciją bei palengvindamos ciklino D1 ir nuo ciklino priklausomos kinazės (CDK) 4 komplekso formavimąsi. Šis kompleksas fosforilina augimą slopinantį baltymą pRb, svarbų G1 stadijoje. Šios stadijos pradžioje pRb yra hipofosforilintas, stipriai susirišęs su transkripcijos veiksmu E2F ir jį inaktyvina. E2F yra reikalingas ekspresijai genų, būtinų S fazėje. Nustatyta, kad būtent ilgalaikis ERK1/2 aktyvinimas yra reikalingas ląstelių perėjimui iš G1 į S ciklo fazę (Meloche ir Pouyssegur, 2007). Žinoma, kad įėjimui į S fazę reikalinga baltymo p27^{Kip1} proteolitinė degradacija. Šis procesas vėlgi iš dalies priklauso nuo ERK aktyvumo, kuris gali fosforilinti p27^{Kip1} *in vitro* (Schramek, 2002).

Nežiūrint to, kad MEK1/2-ERK1/2 kelias teigiamai reguliuoja ląstelės ciklą, šio kelio aktyvinimas gali stabdyti ląstelės ciklą fibroblastuose. Tai yra susiję su CDK1 inhibitoriaus p21^{WAF1/Cip1} indukcija. p21^{WAF1/Cip1} gali būti indukuojamas dviem būdais: transkripciniu, nuo p53 priklausomu ir nuo p53 nepriklausomu mechanizmu per ERK aktyvinimą (Roovers ir Assoian, 2000). Tai priklauso nuo ERK1/2 signalo stiprumo bei trukmės - stiprus ir ilgalaikis MEK1/2-ERK1/2 aktyvinimas stabdo ląstelių augimą indukuodamas p21^{WAF1/Cip1}, tuo tarpu silpnesnis ERK signalas pirmiausia skatina ląstelių proliferaciją ir augimą (Schramek, 2002).

Pastaruoju metu kilus susidomėjimui kamieninėmis ląstelėmis, nustatyta, kad, skirtingai nei daugumai kultivuojamų linijų ląstelių, ERK signalinis kelias nėra būtinas nediferencijuotų embrioninių ląstelių proliferacijai bei atsinaujinimui (Binétruy ir kt., 2007). Šiuo atveju ERK signalinės molekulės gali dalyvauti diferenciacijos ir hipertrofijos procesuose.

Bet yra duomenų, kad ERK kelio slopinimas neigiamai veikia pelės embrioninių ląstelių diferenciaciją adipogenine linkme (Bost ir kt., 2002).

1.4.1.2. p38 MAPK

Ši MAP kinazė dalyvauja uždegimo, ląstelių proliferacijos, diferenciacijos ir žūties reguliacijoje. Pirmą kartą jos buvo identifikuotos kaip lipopolisacharidų aktyvuojamos kinazės (Minden ir Karin, 1997). Šiuo metu žinomos keturios p38 kinazės izoformos (α , β , γ ir δ), iš kurių dvi (α ir β) aptinkamos visų audinių ląstelėse (Pandya ir kt., 2005; Zarubin ir Han, 2005). p38 kinazę gali aktyvinti uždegiminiai citokinai bei aplinkos stresas. Dėl šių poveikių p38 kinazę fosforilina ir aktyvina MKK3/6, kuri yra aktyvinama MAPKKK. MKK3/6 tiesiogiai aktyvinti gali proapoptozinių poveikių stimuliuota ASK1 (ji taip pat gali aktyvinti ir JNK signalo perdavimo kelią). Tarp p38 kinazės taikinių yra MNK1 ir MAPKAP2, kuris savo ruožtu fosforilina ir aktyvina Hsp25 ir Hsp27, keletą transkripcijos veiksnių: ATF2, STAT1, Max/Myc kompleksą, MEF-2, ELK-1. p38 MAP kinazė taip pat aktyvina MNK1, kuri gali būti aktyvinama ir ERK signalinio kelio (Knauf ir kt., 2001).

p38 MAP kinazės reikšmė uždegiminiam procesui yra gerai ištyrinėta. Žinoma, kad p38 yra svarbi citokininų produkcijai (IL-1 β , TNF- α ir IL-6), ji aktyvina baltymus (COX-2), dalyvaujančius audinio remodeliavime pataloginėmis sąlygomis, skatina imuninės sistemos ląstelių poliferaciją ir diferenciaciją (Guan ir kt., 1998; Zarubin ir Han, 2005). Be to, p38 gali skatinti arba slopinti apoptozę priklausomai nuo ląstelių rūšies ir poveikio stiprumo (Zarubin ir Han, 2005). PC12 ląstelėse p38 aktyvinimas sukelia apoptozę, o pirminėse miokardo ląstelėse, atvirkščiai, lemia išgyvenimą (Schenk ir Snaar-Jagalska, 1999; Kimura ir kt., 2000). Nors yra nustatyta, kad ši kinazė įvairiose sistemose dalyvauja apoptozės reguliacijoje, tačiau mechanizmas, kuriuo p38 reguliuoja apoptozę, nėra aiškus. Hsu ir kt. (1999) nustatė, kad p38 aktyvina Fas-L ekspresiją ir tokiu būdu reguliuoja apoptozę. Naujesniais duomenimis

singletinio deguonies ir TGF- β indukuotos apoptozės metu p38 skelia ir aktyvuoja Bid nepriklausomai nuo kaspazės-8. Tai sukelia mitochondrijų transmembraninio potencialo netekimą, cit c išlaisvinimą, efektorinės kaspazės-3 aktyvinimą ir apoptozę (Zhuang ir kt., 2000). O taip pat buvo parodyta, kad proapoptozinis p38 MAPK efektas gali pasireikšti šiai kinazei dalyvaujant MEK1/2 defosforiliniame. Dėl to yra slopinamas antiapoptozinės MAP kinazės – ERK veikimas (Li ir kt., 2003a).

1.4.1.3. c-Jun N-galo kinazė

Šią MAP kinazę aktyvina uždegiminiai citokinai, įvairūs stresiniai poveikiai - UV, osmotinis ar karščio šokas, o taip pat baltymų sintezės inhibitoriai, aplinkos faktoriai, dėl to ji dar yra žinoma kaip streso aktyvinama baltymų kinazė - SAPK (Ravingerová ir kt., 2003). Ją silpnai gali aktyvinti ir augimo faktoriai, tačiau JNK aktyvinantis signalo perdavimo kelias skiriasi nuo MEK1/2-ERK1/2 kelio (Minden ir Karin, 1997; Widmann ir kt., 1999). JNK aktyvina mitogenų aktyvinamos proteinų kinazės 7 ir 4 (MKK7/4), kurias, savo ruožtu, aktyvina mitogenų aktyvinama/ekstraląstelinio atsako kinazė 1 (MEKK 1) (Bost ir kt. 1999; Chen ir kt., 2000). MKK4, be JNK, taip pat fosforilina ir aktyvina p38 MAPK. Toks MKK4 specifiskumas aktyvinti šias dvi MAP kinazes apsprendžia jų suderintą veikimą atsakant į aplinkos ar citokinių poveikį, tačiau ne visais atvejais. Pavyzdžiui, JNK aktyvinimas kepenyse koreliuoja su sumažėjusiu p38 MAP kinazės aktyvumu (Tournier ir kt., 1997).

Žmogaus ląstelėse rastos trys JNK izoformos - JNK1/2/3. JNK1 ir JNK2 plačiai ekspresuojamos daugelyje audinių, tuo tarpu JNK3 – daugiausia širdyje, smegenyse ir sėklidėse (Wang, 2007). Pagrindinis JNK taikinyje branduolyje yra transkripcijos veiksnys c-Jun. Be jo, JNK gali fosforilinti bei aktyvinti ir kitus taikinius ląstelėje - ATF-2, ATFa, Elk-1 ir Sap-1a, pro- ir antiapoptozinius Bcl-2 šeimos baltymus (Ravingerová ir kt., 2003). Buvo nustatyta, kad skirtingos JNK formos pasižymi nevienodu giminingumu šiems

substratams. Pavyzdžiui, JNK2 giminingumas substratams ATF-2 ir c-Jun *in vitro* yra didesnis nei JNK 1 (Bost ir kt., 1999). Nepaisant to, kad JNK vienas pagrindinių substratų yra c-Jun, neseniai buvo nustatyta, kad JNK gali būti aktyvinama, bet nefosforilinti c-Jun (Brantley-Finley ir kt., 2003).

Aktyvinta JNK paprastai dalyvauja apoptozės proceso iniciacijoje (Ravingerová ir kt., 2003). Nustatyta, kad jai nesant sutrinka apoptozės iniciacija mitochondriniais keliais, susilpnėja cit c išlaisvinimas. Be to, JNK indukcija ir po to sekantis c-Jun aktyvinimas padidina FasL ekspresiją. JNK taip pat fosforilina ir aktyvina vėžio supresorių p53. Fosforilinimas apsaugo p53 nuo degradacijos. Neseniai nustatytas ir grįžtamas p53 vaidmuo, t.y., šis baltymas gali aktyvinti MAPK signalo perdavimo kelią, reguliuodamas dvigubo specifiškumo fosfatazių transkripcinį aktyvumą (Wu, 2004).

Literatūros duomenimis JNK, aktyvinama TNF- α , dalyvauja apoptozės indukcijoje. Tačiau šis veiksnys gali aktyvinti NF- κ B, kuris slopina JNK. Taigi, ląstelės atsakas yra sudėtingas įvairių signalinių kelių veikimo rezultatas. Šiuo metu žinoma, kad JNK vaidmuo gali būti ne tik proapoptozinis, bet ir antiapoptozinis arba neutralus priklausomai nuo ląstelių tipo ir poveikio stiprumo. Mechanizmas, kuriuo JNK skatina ląstelių išgyvenimą, nėra visiškai aiškus. Nustatyta, kad JNK reikalinga IL-3 tarpininkaujama ląstelių išgyvenimui. Šiuo atveju JNK fosforilina ir inaktyvina proapoptozinės Bcl-2 šeimos baltymą BAD (Liu ir Lin, 2005; Yu ir kt., 2004).

1.4.1.4. Transkripcijos veiksnys c-Jun

Protoonkogeno *c-jun* koduojamas baltymas yra vienas iš pagrindinių MAP kinazės JNK taikinių branduolyje. c-Jun yra pagrindinis transkripcijos komplekso AP-1 (*angl.* activating protein-1) komponentas. c-Jun gali formuoti homodimerus bei heterodimerus su kitais AP-1 komponentais: Jun (JunB, JunD), Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) arba aktyvinančio transkripcijos veiksnio ATF (ATF2, ATF3/LRF1, B-ATF) šeimų baltymais. Visi šie baltymai

turi būdingą struktūrą – “leucino užtrauktuką”, dėl kurios jie dimerizuojasi ir rišasi su DNR (Vogt, 2001). Įvairūs c-Jun formuojami dimerai gali lemti skirtingas transkripcines savybes ir jų padarinius (Steinmüller ir kt., 2001; Wang ir kt., 1999).

c-Jun transkripcinės veiklos reguliavimui labai svarbus yra delta domenai (amino rūgštys nuo 34 iki 60), esantis N-gale. Virusinis v-Jun skiriasi nuo savo ląstelinio homologo šio domeno delecija. Kadangi v-Jun neturi delta domeno, todėl jis yra pastoviai aktyvus (Karin ir kt., 1997; Vogt, 2001).

c-Jun yra ankstyvojo atsako genų produktas, reguliuojamas transkripcijos lygmenyje. Daugelyje ląstelių *c-jun* raiška nedidelė. Ji padidėja atsakant į įvairius veiksnius, t.y., augimo faktorius, citokinus, UV spinduliavimą. Kaip ir kitų ankstyvųjų genų, *c-jun* transkripcija inicijuojama greitai, nepriklausomai nuo *de novo* baltymų sintezės, produkuojama daugiau *c-jun* mRNR. Dėl to padidėja baltymo kiekis. Be to, pat c-Jun aktyvumas gali būti moduluojamas baltymo lygmenyje, fosforilinant N-gale - transkripcijos aktyvinimo domene - esančius Ser 73 ir Ser 63 (mažesniu laipsniu) bei Thr 91 ir/arba Thr 93. Tai stabilizuoja c-Jun, padidina jo gebėjimą susirišti su DNR ir aktyvinti transkripciją. Pagrindinis c-Jun aktyvintojas yra JNK, kuri sąveikauja su c-Jun baltymo delta domene esančiais JNK surišančiais sritimi. Ši sritis funkcionuoja nepriklausomai nuo fosfoakceptorinių sričių, iš kurių svarbiausia - Ser73 (Minden ir Karin, 1997).

Šio baltymo raišką taip pat gali reguliuoti ir kita MAP kinazė – p38 (Kayahara ir kt., 2005). Manoma, kad p38 netiesiogiai reguliuoja c-Jun transkripcinį aktyvumą, aktyvindamas transkripcijos veiksnius, kurie jungiasi prie AP-1 srities *c-jun* promotoriuje (Minden ir Karin, 1997). Tačiau neseniai nustatyta, kad p38 tiesiogiai fosforilina c-Jun. p38 šiuo atveju yra aktyvinama ASK1 (Kolbus ir kt., 2000; Yamagishi ir kt., 2001).

c-Jun aktyvumą reguliuoja ir ERK MAPK. ERK1/2 taip pat fosforilina c-Jun, tik, šiuo atveju, vieną iš inhibitorinių sričių, lokalizuotų šalia C-gale esančio DNR surišančio domeno. Be to, ERK kinazė c-Jun raišką gali

reguluoti ir netiesiogiai, fosforilindama ir aktyvindama transkripcijos veiksnį MEF, kuris jungiasi prie *c-jun* promotoriaus, bei TCF, kuris indukuoja c-Jun kitą partnerį – *c-fos* (Karin ir kt., 1997; Shaulian ir Karin, 2001).

c-Jun vaidmuo ląstelėje nevienareikšmis. Priklausomai nuo ląstelių tipo ir poveikio stiprumo, c-Jun gali reguliuoti ląstelių proliferaciją, išgyvenimą, transformaciją, taip pat ir apoptozę. Tiriant ląsteles, kuriose trūksta tam tikrų AP-1 baltymų, buvo identifikuoti svarbūs genai-taikiniai, kurių reguliacija labai priklauso nuo transkripcijos komplekso AP-1 sudėties. Vienas tokių genų - ciklinas *D1* (Shaulian ir Karin, 2001). Nustatyta, kad ląstelių, kuriose trūksta funkcionuojančios *c-jun* alelės, augimas vėluoja tiek *in vitro*, tiek *in vivo* (Bossy-Wetzel ir kt., 1997). c-Jun ląstelės ciklo kontrolė yra susijusi ir su p53. Priešingai ciklinui *D1*, p53 yra negiamas ląstelių augimo reguliatorius. Padidėjus *c-jun* ekspresijai, slopinama šio vėžio supresoriaus *p53* raiška, dėl to sumažėja Cdk inhibitoriaus *p21* ekspresija. Be to, c-Jun reguliuoja p53 aktyvumą ir potranskripciniame lygmenyje. Visa tai skatina ląstelės proliferaciją (Shaulian ir Karin, 2001).

Literatūroje yra duomenų, kad c-Jun gali apsaugoti ląsteles nuo UV spinduliavimo bei TNF α indukuotos ląstelių žūties. Pirmu atveju reikalingas c-Jun Ser63 ir Ser73 fosforilinimas, o antru – c-Jun veikia kartu su NF- κ B. Taigi, skirtingi biocheminiai mechanizmai lemia skirtingas c-Jun funkcijas (Wisdom ir kt., 1999). Pelės organizme nustatyta, kad *c-jun* būtinas normaliam individų vystymuisi, bet yra nuomonių, kad c-Jun nėra būtinas normalios individų raidos metu. Nustatyta, kad hepatocituose inaktyvius c-Jun postnataliniame periode, jie išlieka gyvi, ir nėra stebima akivaizdžių biocheminių ar histologinių kepenų pakitimų (Behrens ir kt., 2002; Jochum ir kt., 2001).

Tiriant AP-1 vaidmenį, buvo nustatyta padidėjusi *c-jun* ekspresija ląstelėse, kurios, atsakydamos į įvairius poveikius, patiria apoptozę. Pavyzdžiui, c-Jun reikalingas apoptozei, vykstančiai simpatiniuose neuronuose po nervų augimo faktoriaus (NGF) pašalinimo, taip pat ceramido indukuotai apoptozei mieloidinių ir limfoidinių navikų ląstelių linijose, pelės fibroblastų ląstelėse, Sirijos žiurkėno embrioninėse ląstelėse. Buvo nustatytas

proapoptozinis *c-jun* veikimas ir žmogaus endotelio ląstelėse, kuris susijęs su jo gebėjimu transkripciškai reguliuoti ir aktyvinti kaspazes. Be to, c-Jun/AP-1 aktyvinimas šiose ląstelėse yra svarbus apoptozei, indukuojamai oksidacinio streso (Wang ir kt., 1999).

Proapoptozinis c-Jun/AP-1 veikimas gali pasireikšti keliais mechanizmais. Vienas jų – c-Jun tiesiogiai aktyvina transkripciją genų, kurių produktai indukuoja ląstelių žūtį. Buvo nustatyta, kad c-Jun aktyvina FasL ekspresiją, tačiau neaišku, kodėl vieni AP-1 aktyvintojai indukuoja FasL, o kiti ne (Kolbus ir kt., 2000). Gali būti, kad AP-1 būdingas homeostatinis veikimas, dėl kurio šis transkripcijos veiksnys reaguoja ir prisitaiko prie pakitusių aplinkos sąlygų (Shaulian ir Karin, 2001).

Yra žinomas ir antiapoptozinis bei neutralus c-Jun vaidmuo. Neseniai parodyta, kad c-Jun slopina apoptozę ir veikia antagonistiskai p53 (Eferl ir kt., 2003). Literatūros duomenimis c-Jun sukelia apoptozę pelių NIH 3T3 fibroblastų ląstelėse, tačiau BALB/c 3T3 ląstelių linijoje, nors *c-jun* yra ekspresuojamas aukštu lygiu, apoptozės neindukuoja (Bossy-Wetzel ir kt., 1997). Todėl, vertinant c-Jun vaidmenį, būtina atsižvelgti į genetinį foną, ląstelių rūšį bei jų aplinką. Gali būti, kad AP-1 būtinas tik tose apoptozės formose, kur reikalinga baltymų sintezė *de novo* (Karin et al., 1997).

1.4.1.5. MAPK bei c-Jun vaidmuo širdyje

Mitogenų aktyvinamos proteinkinazės yra svarbios kardiomiocitų hipertrofijos ir apoptozės reguliacijai (Sudgen ir Clerk, 1998). Žmogaus kardiomiocituose yra registruojama visų trijų MAPK (JNK, p38-MAPK ir ERK) raiška, tačiau tikrai JNK ir p38 baltymo lygis padidėja išeminės širdies ligos metu. Tai rodo, jog šios dvi kinazės yra svarbios širdies patologijos vystymuisi (Cook ir kt., 1999). Nustatyta, kad oksidacinio streso aktyvinta JNK tiesiogiai skatina cit c bei AIF išlaisvinimą iš mitochondrijų ir apoptozės indukciją (Gustafsson ir Gottlieb, 2003). Tuo tarpu Dougherty ir kt. (2002) nurodo, kad JNK aktyvinimas hipoksijos/reoksigenacijos modelyje koreliuoja

su kardiomiocitų išgyvenimu. Pirmuoju atveju tyrimuose buvo naudoti suaugusio organizmo, antruoju – naujagimio kardiomiocitai. Tai galėtų paaiškinti tokį prieštarinę šios kinazės veikimą.

p38 MAPK dažnai siejama su proapoptoziniu jos veikimu, tačiau širdyje jos vaidmuo yra prieštaringas. Buvo nustatyta, kad oksidacinio streso inicijuojama apoptozinė kardiomiocitų žūtis yra vykdoma dalyvaujant p38 α MAP kinazei. Kita šios kinazės izoforma p38 β yra svarbi kardiomiocitų hipertrofijai (Kang, 2001). Tai galėtų būti paaiškinama tuo, kad p38 α ir p38 β aktyvina skirtingus taikinius, kurių vaidmuo apoptozės procese skiriasi. Apsauginis p38 vaidmuo gali būti siejamas su NF- κ B aktyvinimu (Ravingerová ir kt., 2003). Nustatyta, kad fibroblastų augimo faktoriaus (FGF) aktyvinta p38 MAPK reikalinga satelitinių ląstelių proliferacijos aktyvinimui, taip pat ji gali reguliuoti šių ląstelių ramybės būseną (Jones ir kt., 2005). p38 MAP kinazei yra būdingas dalyvavimas miogeninių ląstelių diferenciacijos procese. Nustatyta, kad p38 aktyvina transkripcijos veiksnius MEF2, kurie, savo ruožtu, aktyvina MyoD transkripciją (Cuenda ir Cohen, 1999; Gonzalez ir kt., 2004)

Apsauginiu, išgyvenimą nulemiančiu veikimu pasižymi ir ankstyvo atsako genai – *c-myc*, *c-jun* bei *c-fos*. Jie aktyvina širdies apsauginių baltymų genų, pvz. Hsp70, raišką (Ravingerová ir kt., 2003). Be to, protoonkogenų *c-jun* ir *c-fos* raiška yra reikalinga satelitinių ląstelių aktyvinimo pradžiai.

MAP kinazių vaidmuo gali būti moduluojamas įvairiomis farmakologinėmis medžiagomis. ERK kinazės aktyvumas gali būti slopinamas potencialiais šios kinazės inhibitoriais - PD98059 bei UO126, *in vivo* bei *in vitro*. Buvo gauta, kad ERK nuslopinimas naudojant PD98059 padidina išemijos sąlygojamus širdies pažeidimus žiurkių miokarde bei padidina kardiomiocitų apoptozę (Yue ir kt., 2000). Kitos MAP kinazės – p38, aktyvumo moduliavimui yra surasta keletas pirimido imidazolo darinių – SB203580, SB202190 ir SB242719. Tiriant šios kinazės vaidmenį ilgalaikės širdies išemijos metu buvo parodyta, kad p38 nuslopinimas lemia silpnesnę apoptozės pasireiškimą miokarde (Ravingerová ir kt., 2003). Šiuo metu jau

žinomas ir JNK kinazės specifinis slopiklis – SP600125, kurio veikimas aprašytas 2001 m. Nustatyta, kad jo panaudojimas sumažina infarkto zonos dydį, taigi, slopina JNK sąlygojamą kardiomiocitų žūtį (Zhang ir kt., 2009).

1.4.2. PI3K/Akt signalinis kelias ir jo vaidmuo ląstelių išgyvenimo/žūties reguliacijoje

Akt protoonkogeno koduojama serino treonino kinazė, atrasta kaip ląstelinis virusinio onkogeno homologas 1977 m. Akt kinazė, šiuo metu dar žinoma kaip proteinkinazė B (PKB), N-gale turi plekstrino homologijos (PH) domeną, o C-gale esanti sritis yra reikalinga jos kinazinam aktyvumui. Žinduoliuose randamos trys Akt/PKB izoformos, pasižyminčios didele homologija. Tai PKB α /Akt1, PKB β /Akt2 and PKB γ /Akt3. Akt1 yra paplitusi visuose audiniuose, išskyrus inkstus, kepenis bei blužnį; Akt2 raiška įvairiuose audiniuose varijuoja, tačiau daugiausia aptinkama raumenyse, žarnyne ir reprodukcinuose organuose; Akt3 aptinkama smegenyse, sėklidėse, o raumenyse jos raiška nedidelė. Visos Akt izoformos yra panašiai aktyvinamos ir žemiau esančius taikinius fosforilina vienodu giminingumu (Franke, 2007).

Akt aktyvinimas. Pagrindinis Akt aktyvintojas yra PI3 kinazė. Dėl jos veikimo susidarę produktai – fosfatidilinozitol 3,4,5-trifosfatas (PIP₃) bei fosfatidilinozitol 4,5-trifosfatas (PIP₂) - kaupiasi membranoje ir rišasi prie Akt ir PDK1 (nuo fosfoinozitudų piklausoma kinazė 1) PH domenų. Dėl to Akt ir PDK1 yra pritraukiamos prie membranos, kur vyksta Akt aktyvinimas (Matsui ir kt., 2003). Akt yra visiškai aktyvinama ją fosforilinus dviejose srityse: netoli katalitinės srities esančioje judrioje kilpoje, kuri dar vadinama T kilpa, fosforilinamas Thr 308, o C-gale esančiame hidrofobiniame motyve (MH) – Ser 473. MH sritis yra svarbi PKD1, kuri fosforilina Thr 308, taigi, veikia kaip alosterinis Akt kinazės aktyvumo reguliatorius (Franke ir kt., 2003).

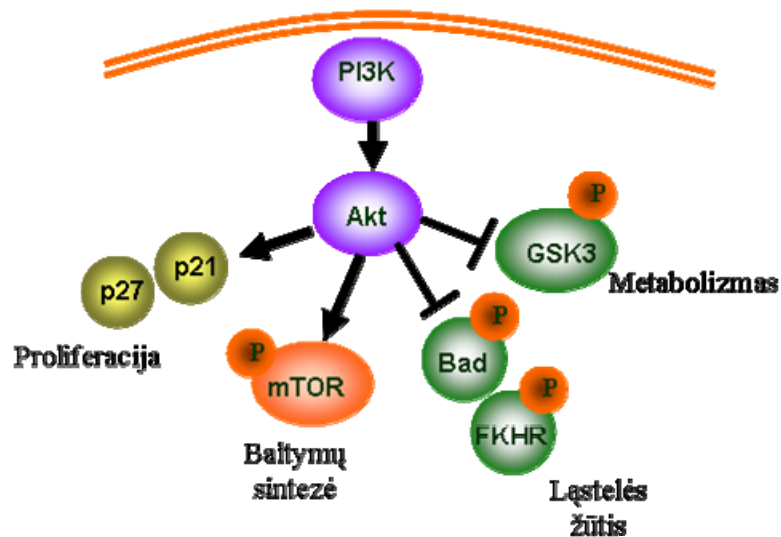
Nors Akt dažniausiai aktyvinamas nuo PI3K priklausomu keliu, šiuo metu jau žinomi ir kiti, nuo PI3K nepriklausomi, mechanizmai. Yra nustatyta, kad nuo Ca²⁺/kalmodulino priklausoma kinazė fosforilina Akt Thr 308 nedalyvaujant PI3K (Yano ir kt., 1998). Akt gali aktyvinti ir proteinkinazė A

(PKA), kuri pati yra priklausoma nuo PKD1 fosforilinimo, bet, šiuo atveju, nėra fosforilinamas Ser 473 (Fillipa ir kt., 1999). Kitais duomenimis, Akt gali aktyvinti MAPKAPK-2, kuri fosforilina Ser 473 *in vitro* (Clifton ir kt., 1996). Akt gali aktyvinti įvairūs išoriniai ir viduląsteliniai veiksniai: temperatūrinis šokas, UV spinduliuotė, hipoksija, hipoglikemija, oksidacinis stresas, proteinkinazės A agonistai, β -adrenerginiai receptoriai, viduląstelinio kalcio koncentracijos pokyčiai (Song ir kt., 2005).

Neigiami PI3K/Akt kelio reguliatoriai. Akt aktyvumas slopinamas jį defosforilinant. Tą gali atlikti endogeninė fosfatazė. Nustatyta, kad nespecifinis šios fosfatazės slopinimas veiksmingai aktyvina Akt (Andjelkovic ir kt., 1996). Akt defosforilinimas yra stebimas ir padidėjus ceramido kiekiui, tačiau pagrindinis Akt išaktyvintojas yra lipidų-baltymų fosfatazė PTEN, kuri veikia priešingai nei PI3K ir defosforilina PIP₂ ir PIP₃ (Van de Sande ir kt., 2002; Zhou ir kt., 1998).

Akt taikiniai. Aktyvi Akt, fosforilindama įvairius substratus, reguliuoja tokius svarbius ląstelei procesus, kaip (1) ląstelės išgyvenimą, fosforilindama ir nuslopindama Bad bei kaspazę 9; (2) ląstelės ciklą, fosforilindama nuo ciklinų priklausomų kinazių inhibitorius - p21, p27; (3) metabolizmą per glikogeno sintazės (GSK) aktyvumo reguliavimą; (4) genų transkripciją, fosforilindama Forkhedo šeimos narius; (5) baltymų sintezę, fosforilindama mTOR (1.3 pav.).

Akt vaidmuo ląstelės išgyvenime. Priimta manyti, kad Akt signalinis kelias yra atsakingas už ląstelių išgyvenimą po įvairių stresinių poveikių. Vienas iš apsauginių mechanizmų, sąlygojančių ląstelių išgyvenimą, yra Akt gebėjimas fosforilinti ir nuslopinti proapoptozinių baltymų – Bad, kaspazės 9 ir Apaf-1 veikimą (Datta ir kt., 1997). Be to, Akt neleidžia vykti konformaciniams Bax pokyčiams, dėl to jis negali patekti į mitochondrijas, kuriose nulemia cit c išlaisvinimą bei sąlygoja negrįžtamus pakitimus - ląstelės žūtį (Yamaguchi ir Wang, 2001). Kitu atveju Akt gali tiesiogiai fosforilinti ir išaktyvinti Forkhead transkripcijos veiksnį šeimos narį FKHR1. Dėl to sumažėja Fas ligando, svarbaus apoptozinio signalo perdavimui, transkripcija



1.3 pav. PI3K/Akt signalinis kelias ir pagrindiniai taikiniai.

(Brunet ir kt., 1999). Akt gali fosforilinti ir aktyvinti I κ B kinazę, dėl to pastaroji yra degraduojama, o NF- κ B gali aktyvinti antiapoptozinių genų raišką (Ozes ir kt., 1999). Akt taip pat fosforilina Mdm2, tuomet šis baltymas keliauja į branduolį ir rišasi su p53. p53, savo ruožtu, slopina genų, svarbių ląstelės ciklo sustabdymui ir apoptozei, raišką (Oren, 2003).

Nustatyta, kad Akt ne tik pasižymi kardiomiocitų išgyvenimą bei augimą skatinančiu veikimu, bet ir gali dalyvauti miogenezės reguliavime. Parodyta, kad ląstelių išėjimas iš ciklo miogenezės metu palengvina Akt aktyvinimą, dėl to pagerėja ir Akt sąlygojamas ląstelių išgyvenimas (Matsui ir kt., 2003).

1.5. Patofiziologiniai veiksniai, veikiantys ląstelių gyvybingumą

Įvykus miokardo infarktui, pirmiausia apoptozės ir nekrozės būdu žūva kardiomiocitai. Pastarieji turi daugiau mitochondrijų, kurios gali būti laisvųjų radikalų šaltinis. Tai veikia kaimyninius kardiomiocitus, o taip pat ir transplantuotas ląsteles, prasideda uždegiminis procesas, kurio metu išsiskiria citokinai - IL-1 β , IL-2, IL-6 bei TNF- α (Craig ir kt., 2000; Gwechenberger ir kt., 1999; Kang, 2001; Pasic ir kt., 2003; Tidball, 2005).

1.5.1. Navikų nekrozės faktorius- α

Navikų nekrozės faktoriui- α (TNF- α) širdies ligų patogenezėje priskiriamas ypatingai svarbus vaidmuo. Klinikiniai duomenys rodo, kad TNF- α patologiniame židinyje atsiranda ūmioje miokardo infarkto stadijoje, ilgesnis jo buvimas siejamas su miokardo pažeidimu ir jo funkcijos sutrikimu (Li ir kt., 1999; Maury ir Teppo, 1989; Schulz ir kt., 2004). Yra nustatyta koreliacija tarp TNF- α koncentracijos ir infarkto dydžio (Halawa ir kt., 1999). Eksperimentuose su žiurkėmis parodyta, kad TNF- α kiekis kraujyje padidėja pirmą dieną po infarkto, aukštas jo lygis išsilaiko 35-ias dienas, tačiau atskirose infarkto zonose TNF- α kiekis skiriasi (Irwin ir kt., 1999; Jacobs ir kt., 1999). Be širdies ląstelių ir makrofagų ši citokiną taip pat gali produkuoti lygiųjų raumenų, endotelio ląstelės bei griaučių raumenų miocitai (Collins ir Grounds, 2001; Sack, 2002). Pastaruosiuose šis citokinas yra sintetinamas pastoviai (Li, 2003b).

TNF- α pasižymi daugybiniu veikimu. Jis ne tik dalyvauja uždegiminiame procese, yra svarbus citotoksiniam/apoptoziniam atsakui, kataboliniams procesams raumenyse, bet ir reguliuoja įvairių ląstelių rūšių augimą ir diferenciaciją (Li, 2003b; El Naggar ir kt., 2004). Toks nevienareikšmis TNF- α vaidmuo gali būti siejamas su šio uždegiminio citokino koncentracija. Literatūros duomenimis, fiziologinės TNF- α koncentracijos gali sukelti kardiomiocitų hipertrofiją, lydimą Akt/PKB signalinio kelio aktyvinimo, o didesnės – apoptozę (Bajaj ir Sharma, 2006). Patologinių būklių metu širdyje besikaupiantis TNF- α tiesiogiai slopina širdies susitraukimus ir sukelia miocitų apoptozę (Jacobs ir kt., 1999; Meldrum, 1998). Tačiau yra duomenų ir apie tai, kad, atvirkščiai, didelės TNF- α koncentracijos skatina mioblastų proliferaciją, o mažos stimuliuoja jų diferenciaciją (Alter ir kt., 2008). Koks bus TNF- α veikimas, labai priklauso ir nuo jo poveikio trukmės. Tiriant griaučių mioblastus C2 nustatyta, kad ilgalaikis šio citokino veikimas slopina diferenciaciją ir sukelia apoptozę, o trumpalaikis - stimuliuoja proliferaciją bei išgyvenimą (Langen ir kt., 2001). Nustatyta, kad TNF- α

poveikio rezultatas taip pat priklauso ir nuo tam tikros pusiausvyros tarp MAP kinazių šeimai priklausančios kinazės JNK, NF- κ B bei gadd45 β . Bent vienos iš šių signalinių molekulių nuslopinimas gali lemti apoptozinę mioblastų žūtį (Langen ir kt., 2001; Stewart ir kt., 2003). Gali būti, kad pats savaime TNF- α nėra pakankamas veiksnys, galintis sukelti kardiomiocitų apoptozinę žūtį *in vivo* (Kubota ir kt., 2001). Buvo parodyta, kad apsauginis TNF- α veikimas kardiomiocituose gali priklausyti nuo IL-6 – citokino, kurio sekrecija taip pat padidėja įvairių širdies patologinių būklių metu. IL-6 gali veikti kaip autokriniškas mediatorius, aktyvindamas IL-6 receptorių ir tokiu būdu apsaugodamas nuo žūties. Šiuo atveju yra aktyvinamas nuo gp130 priklausomas antiapoptozinis signalo perdavimo kelias (Craig ir kt., 2000). Yra duomenų, kad TNF- α ir IL-6 pasižymi sinergistiniu veikimu, kurio vaidmuo kol kas nėra aiškus. Nustatyta, kad pelės griaučių fibroblastus C2 paveikus abiem šiais citokiniais, 330% padidėja bendras baltymo kiekis, 55% išauga ERK fosforilinimas bei 2,5 karto padaugėja ląstelių, esančių S ciklo fazėje. Visa tai rodo teigimą TNF- α /IL-6 poveikį tirtų mioblastų augimui (Al-Ashanti ir kt., 2008). Taigi, TNF- α poveikis priklauso nuo įvairių faktorių, tarp kurių, be jau aptartų, dar gali būti ląstelės kilmė, jos diferenciacijos laipsnis ir kt.

TNF- α ir pats savaime yra labai svarbus faktorius miogeninių ląstelių diferenciacijai ir raumens regeneracijai, tačiau jo trūkumas *in vivo* yra kompensuojamas kitų citokinų (TGF- β , LIF ir IL-6) poveikiu ir dėl to raumens regeneracijos sutrikimai nestebimi (Chen ir kt., 2007; Collins ir Grounds, 2001; Langen ir kt., 2001). Raumens regeneracinis efektas gali būti pasiekiamas ir TNF- α gebėjimu padidinti įvairių ląstelių, tarp jų ir embrioninių kamienių, galinčių regeneruoti pažeistą miokardą, migraciją (Chen ir kt., 2003, 2005).

1.5.2. Interleukinas -6

Interleukinų-6 šeimai priklausančios citokinai (IL-6, IL-11, leukemiją slopinantis faktorius (LIF), OSM (osmostatinas M), CT-1 (kardiotropinas-1) ir kt.) aktyvina genus, svarbius diferenciacijai, išgyvenimui, apoptozei ir proliferacijai. Šios šeimos citokinai pasižymi tiek pro-, tiek ir antiapoptoziniu

veikimu, dalyvauja uždegiminiame atsake (Heinrich ir kt., 2003). Nustatyta, kad IL-6 koncentracija ženkliai padidėja pirmosiomis valandomis po ūmaus širdies infarkto (Guillen ir kt., 1995). TNF- α kiekio padidėjimas, įvykus infarktui, taip pat gali stimuliuoti IL-6 gamybą (Gwechenberger ir kt., 1999). Nustatyta, kad NF-kB bei p38 MAPK signalinių kelių aktyvinimas skatina IL-6 sintezę (Craig ir kt., 2000). Yra atlikta daug tyrimų siekiant išsiaiškinti IL-6 vaidmenį pataloginių širdies būklių metu, tačiau detalus šio citokino vaidmuo vis dar lieka neaiškus. Šiuo metu IL-6 kiekio padidėjimas siejamas su antiapoptoziniu ir net proliferaciją skatinančiu jo veikimu (Craig ir kt., 2000; Coles ir kt., 2005). Wollert ir Drexler gavo įtikinamus duomenis apie IL-6 dalyvavimą kardiomiocitų hipertrofijos reguliacijoje ir apoptozės slopinime (Wollert ir Drexler, 2001).

Kokie molekuliniai mechanizmai lemia apsauginį IL-6 veikimą, kol kas nėra aišku. Žinoma, kad IL-6 šeimos citokinai, kuriai priklauso ir IL-6, aktyvina tokias išgyvenimą sąlygojančias signalines molekules kaip ERK, STAT3, Akt. Miokardo infarkto atveju miocitų apoptozę slopina susidaręs IL-6 bei tirpaus jo receptoriaus (sIL-6R) kompleksas. Nustatyta, kad pavieniui šie faktoriai jokios įtakos kardiomiocitų gyvybingumui neturi (Matsushita ir kt., 2005). IL-6/sIL-6R išgyvenimą sąlygojantis veikimas gali pasireikšti stimuliuojant antiapoptozinį baltymą Bcl-2 (Gwechenberger ir kt., 1999).

IL-6 sekretuoja ir išeminę sritį supantys kardiomiocitai. Jie autokrininiu būdu veikia pažeidimo zonoje esančius miocitus ir skatina jų išgyvenimą (Craig ir kt., 2000). Griaučių raumenų ląstelės taip pat yra IL-6 šaltinis. Ypač ženkliai šio citokino kiekis padidėja fizinio krūvio metu (Pedersen ir Febbraio, 2008). Nustatyta, kad įvykus raumens pažeidimui, IL-6 skatina nekrozinio audinio degradaciją, sinchronizuoja satelitinių ląstelių ciklą, bet nedidina jų proliferacijos greičio, o stimuliuoja makrofagų apoptozę (Hawke ir Garry, 2001). Kiti autoriai nurodo IL-6 dalyvavimą širdies patologijos vystymesi bei apoptozės indukcijoje (Affor ir kt., 1992; Blum ir Miller, 2001; Sanchez-Cordon ir kt., 2005).

1.5.3. NO vaidmuo

NO yra hidrofobinė, lengvai difunduojanti signalinė molekulė, dalyvaujanti daugelio fiziologinių bei patologinių procesų reguliacijoje (Christopherson ir Bredt, 1997; Li ir Wogan, 2005). Širdyje, įvykus miokardo infarktui, prasideda uždegiminis procesas, kurio metu išsiskiria citokinai, skatinantys indukuojamos azoto oksido sintazės raišką (iNOS) (Pulkki, 1997). Ši, savo ruožtu, didina NO kiekį. NO perteklius yra susijęs su superoksido aniono sinteze, apoptozės indukcija ar net nekroze (Arstall ir kt., 1999; Lee ir kt., 2005; Pinsky ir kt., 1999). Azoto oksidas nulemia ląstelių žūtį sukeldamas oksidacinį stresą, DNR pažaidas, baltymų modifikacijas, sutrikdydamas metabolizmą, mitochondrijų funkcijas. Pažaidos dydis lemia, kuri ląstelių žūtis forma – apoptozė ar nekrozė – bus indukuojama (Li ir Wogan, 2005). Iš kitos pusės, esant mažoms koncentracijoms, NO veikia kaip signalinė molekulė, reguliuojanti įvairius fiziologinius procesus – gali atpalaiduojančiai veikti kraujagysles, stimuliuoti širdies susitraukimus ir kt. Literatūros duomenimis, NO gebėjimas sukelti apoptozę priklauso nuo ląstelių rūšies (Andreka ir kt., 2001). NO gali sukelti makrofagų, chondrocitų, vėžinių ir kraujagyslių lygiųjų raumenų ląstelių apoptozę, tačiau slopina eozinofilų, pelės ir žmogaus B limfocitų, kraujagyslių endotelio ląstelių žūtį (Blanco ir kt., 1995; Cui ir kt., 1994; Genaro ir kt., 1995; Lee ir kt., 2005; Mannick ir kt., 1994; Nishio ir kt., 1996; Pinsky ir kt., 1999; Shimaoka ir kt., 1995). Koks bus pro- ar antiapoptozinis NO vaidmuo priklauso ir nuo redokso aplinkos (Stefanelli ir kt., 1999). Molekuliniai mechanizmai, nulemiantys apoptozę po NO poveikio, taip pat priklauso ir nuo ląstelių tipo. Nustatyta, kad NO inicijuoja DNR pažaidas, aktyvina proapoptozinius baltymus - p53 bei bax, o ląstelių žūtis vyksta nuo kaspazių priklausomu keliu (Lee ir kt., 2005; Uchiyama ir kt., 2002; Zhou ir kt., 2004). Paprastai dėl NO poveikio yra išlaisvinamas cit c t.y., apoptozė vyksta dalyvaujant mitochondrijoms. Tačiau kai kuriose ląstelėse (neuroblastomos ir HL60) NO aktyvina kaspazes 2 ir 8. Taigi, šiuo atveju, mitochondrinis kelias nedalyvauja (Li ir Wogan, 2005). NO kaip apoptozės induktoriaus veikimas greičiausiai pasireiškia reaguojant su

mitochondriniais superoksido radikalais, dėl to atsiranda vidinių ląstelės komponentų pažaidos, sąlygojančios apoptozės iniciaciją.

Azoto oksidas kai kuriose ląstelėse gali slopinti TNF- α , CD95/Fas ligando, oksidacinio streso, serumo bei augimo faktorių trūkumo sukeltą programotą ląstelių žūtį (DeeMeester ir kt., 1998; Kim ir kt., 1997; Sciorati ir kt., 1997). Biocheminiai mechanizmai, reguliuojantys šį apsauginį NO vaidmenį, yra labai įvairūs, priklausantys nuo ląstelių rūšies, poveikio trukmės, kitų faktorių (Ho ir kt., 1999; Li ir Billar, 1999; Li ir Wogan, 2005; Stefanelli ir kt., 1999). NO gali aktyvinti „apsauginių“ baltymų – ciklooksigenazės-2, hemeoksigenazės-1, metalotioneino, Hsp70, NF- κ B raišką, o slopinti apoptozinių baltymų, pvz., kaspazių 3, 8 ir 9, transkripcijos komplekso AP-1 aktyvumą. Be to, NO gali funkcionuoti kaip reaktyvių deguonies darinių gaudyklė. NO reaguodamas su alkoksilo ir peroksido radikalais, slopina lipidų peroksidaciją, sumažina superoksido ir vandenilio peroksido citotoksiinį poveikį (Li ir Wogan, 2005; Maejima ir kt., 2005; Shen ir Liu, 2006).

MAP kinazių vaidmuo programotos ląstelių žūties reguliacijoje yra gerai žinomas, tačiau kaip šios kinazės reguliuoja NO indukuojamą apoptozę miocituose, nėra daug duomenų. Nustatyta, kad ERK1/2 aktyvinimas padidėjus NO koncentracijai širdies miocituose gali būti apsauginis arba neutralus, priklausomai nuo ląstelių rūšies ir stresą sukeliančio faktoriaus (Li ir kt., 2006). JNK ir p38 MAPK aktyvinimas oksidacinio streso metu gali ir apsaugoti, ir paskatinti miocitų žuvimą (Andreka ir kt., 2004; Choukroun ir kt., 1999). Buvo parodyta, kad JNK apsaugo makrofagus nuo NO inicijuojamos apoptozės tik tuo atveju, kai yra aktyvi p38 MAP kinazė, tačiau kardiomiocituose toks ryšys nebuvo pastebėtas (Callsen ir Brune, 1999; Andreka ir kt., 2001).

NO vaidmeniui tirti yra naudojami įvairūs NO donorai. Vienas jų yra NOC-18 (dietilentriamino/azoto oksido aduktas, DETA/NO). Tai ilgainiui veikiantis NO donoras. Nustatyta, kad NO išlaisvinantis poveikis trunka iki 20 val. esant 37°C temperatūrai (Niebdala ir kt., 2000). Tiriant žiurkių aortos lygiųjų raumenų ląsteles, parodyta, kad 500 μ M NOC-18 efektyviai stabdo šių ląstelių proliferaciją, bet neįtakoja jų gyvybingumo (Mooradian ir kt., 1995).

1.5.4. Reaktyvūs deguonies dariniai

Oksidacinis stresas yra pusiausvyros tarp padidėjusio reaktyvių deguonies darinių (RDD) kiekio ir apsauginės antioksidacinės sistemos sutrikimas (Matés ir kt., 2008; Sies, 1997). RDD priskiriamos molekulės: superoksido anijonas ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilo radikalas ($\cdot OH$) ir vandenilio peroksidas. Fiziologinėmis sąlygomis RDD gali susidaryti širdyje ir kituose organuose veikiant ksantino oksidazei, NAD(P)H oksidazėms, citochromui p450, oksiduojantis katecholaminams. Superoksido anijonas gali reaguoti su azoto oksidu generuodamas ypatingai stiprų oksidantą – peroksinitritą ($ONOO^{\cdot-}$). RDD susidarymą gali inicijuoti ir citokinai bei augimo faktoriai. Pavyzdžiui, PDGF bei TNF- α gali aktyvinti NAD(P)H oksidazes ir tokiu būdu stimuliuoti H_2O_2 ir $O_2^{\cdot-}$ susidarymą (Giordano, 2005; Thannickal ir Fanburg, 2000). Pagrindinis RDD šaltinis ląstelėje yra mitochondrijos. Nustatyta, kad apie 2% viso jų sunaudojamo deguonies yra paverčiama į dalinai redukuotus laisvojo deguonies radikalus (Ames ir kt., 1993).

Pagrindiniai RDD taikiniai yra DNR, baltymai, lipidai, kurių pažaidos lemia apoptozinę arba nekrozinę ląstelių žūtį. Tačiau RDD poveikis labai priklauso nuo koncentracijos. Nustatyta, kad mažos RDD koncentracijos, veikdamos kaip signalinės molekulės, aktyvina signalo perdavimo kelius, kurių aktyvinime, savo ruožtu, dalyvauja įvairūs augimo faktoriai, citokinai, hormonai. Dėl šio veikimo yra aktyvinama genų, transkripcijos veiksnių raiška, DNR sintezė, ląstelių proliferacija, diferenciacija bei programuota žūtis (Giordano, 2005; Hoidal, 2001; Sauer and Wartenberg, 2005). RDD vaidmuo priklauso nuo oksidacinio streso dydžio ir trukmės, ląstelių tipo, viduląstelinės antioksidacinės sistemos aktyvumo, aktyvinamų signalinių kelių (Bironaitė ir kt., 2004; Caporosi ir kt., 2003; D'Autréaux ir Toledano, 2007; Gardner ir kt., 1997).

Vienas silpniausių oksidantų, ypač svarbus signalo perdavimui yra H_2O_2 . Jo gyvavimo puslaikis biologinėse sistemose yra santykinai ilgas. Be to, jis yra tirpus tiek lipiduose, tiek ir vandeninėje aplinkoje, todėl gali pasiekti taikinius tiek ląstelės viduje, tiek ir jos išorėje. Pagrindinis jo šaltinis ląstelėje

yra peroksisomos (Hoidal, 2001; Thannickal ir Fanburg, 2000; Shen ir Liu, 2006).

H₂O₂ gali sukelti įvairių ląstelių rūšių apoptozę, tačiau tik iki tam tikros koncentracijos. Peržengus šią ribinę dozę, ląstelės žūsta nekrozės būdu (Hampton ir Orrenius, 1997). H₂O₂ inicijuoja programuotą ląstelių žūtį, moduluodamas įvairius signalinius kelius. Yra nustatyta, kad aukštos H₂O₂ koncentracijos aktyvina ERK bei JNK pelės fibroblastuose L929, tačiau tik ERK signalinis kelias yra atsakingas už apoptozės proceso iniciaciją (Asada ir kt., 2001; Lee ir kt., 2003b). Šiuo atveju ERK gali aktyvinti apoptozės iniciacijoje dalyvaujančią kaspazę 3 bei slopinti Akt kinazę (Zhang ir kt., 2007). Kitais duomenimis, ERK aktyvinimas nėra susijęs su apoptozės procesu (Colston ir kt., 2004). Tokie patys prieštaringi duomenys yra gauti ir apie kitos MAP kinazės – JNK, dalyvavimą H₂O₂ inicijuojamame apoptozės procese. Nustatyta, kad oksidacinis stresas aktyvina streso kinazę JNK, tačiau žiurkės kardiomicituose šis aktyvinimas yra siejama su apsauginiu JNK vaidmeniu (Dougherty ir kt., 2002). Kiti autoriai nurodo proapoptozinį šios kinazės veikimą (Chae ir kt., 2001). Įvairių šaltinių duomenimis, p38 MAP kinazės vaidmuo oksidacinio streso metu yra proapoptozinis (Colston ir kt., 2004; Minamino ir kt., 1999).

Tiriant žiurkių širdies miocitus, nustatyta, kad po H₂O₂ poveikio yra aktyvinamas išorinis-receptorinis Fas/FasL apoptozės iniciacijos kelias. Kartu buvo gauti duomenys apie padidėjusią antiapoptozinių baltymų – xIAP ir bcl-2 - raišką. Šie baltymai slopina mitochondrijų membranų pralaidumą bei cit c išlaisvinimą. Taigi, šiuo atveju, vidinis mitochondrinis apoptozės iniciacijos kelias nedalyvauja (Yaniv ir kt., 2005). Kitais duomenimis, Fas/FasL nereikalingas H₂O₂ indukuotai apoptozei vykti. Šiuo atveju yra aktyvinama kaspazė 3 bei NF-κB, kuris, savo ruožtu, didina p53 baltymo raišką (Dumont ir kt., 1999).

1.6. Chemoterapinės/ kardiotoksinės medžiagos

Doksorubicinas (DOX) – plataus veikimo spektro antibiotikas, naudojamas įvairių vėžio formų gydymui. Klinikinį jo panaudojimą riboja nuo dozės bei paciento amžiaus priklausantis kardiotoksiškumas (Koller ir kt., 2005; Konorev ir kt., 2008). Yra pasiūlyta keletas DOX veikimo mechanizmų, tačiau vienas pagrindinių – DOX gebėjimas inhibuoti topoizomerazę II, dalyvaujančią DNR išvyniojime ir karpyme transkripcijos bei replikacijos metu. DOX sudaro stabilų trinarį DOX-DNR-topoizomerazės II kompleksą ir, tokiu būdu, nuslopina topoizomerazės II veikimą, stabdo ląstelės ciklą G1 ir G2 stadijose, skatina ląstelių žūtį (Cutts ir kt., 1996; Minotti ir kt., 2004; Swift ir kt., 2006; Wallace, 2003). Yra nustatyta, kad DOX slopina ir topoizomerazės I, DNR lipazių, helikazių ir kitų DNR sintezėje dalyvaujančių baltymų veikimą (Cutts ir kt., 2003; Gerwitz, 1999; Guano ir kt., 1999). DOX, veikiant ląstelės formaldehidui, sudaro DNR sąryšas ir gali dalyvauti DNR alkilinime (Cutts ir kt., 2003; Minotti ir kt., 2004). Doksorubicinas yra linkęs kauptis kardiomiocitų mitochondrijose, kurių fermentai (pvz., NADH dehidrogenazė) aktyvina doksorubiciną susidarant semichinono tarpininkui ($\text{DOX}^{\cdot-}$), kuris, savo ruožtu, generuoja superoksido radikalą ($\text{O}_2^{\cdot-}$) bei vandenilio peroksidą (deGraff ir kt., 1994; Kotamraju ir kt., 2000).

Apoptozė yra neatsiejama ūmių širdies ligų, pvz., miokardo infarkto dalis. Tyrimai parodė, kad miokardo funkcijos susilpnėjimą apsprendžia doksorubicino sukeliama apoptozė. Autoriai ląstelių žūtį sieja su p53 baltymo aktyvinimu bei laisvųjų radikalų susidarymu (Kalyanaraman ir kt., 2002; Kotamraju ir kt., 2000; Wang ir kt., 2004). Susidarę reaktyvūs deguonies dariniai sutrikdo mitochondrijų kvėpavimo grandinę, o, didindami jų membranos pralaidumą, skatina cit c išlaisvinimą. Tokiu būdu aktyvinamas mitochondrinis apoptozės iniciacijos kelias. Šis DOX poveikis kardiomiocituose daug ryškesnis nei kitose ląstelėse, nes čia yra mažai katalazių (Minotti ir kt., 2004).

Išorinis receptoriaus Fas/FasL signalinis kelias taip pat yra svarbus DOX sąlygojamai apoptozės iniciacijai kardiomiocituose (Yamaoka ir kt., 2000).

Nustatyta, kad DOX aktyvina p38 MAPK kinazę, dėl to vystosi apoptozė. Šios kinazės aktyvinimas gali būti susijęs su RDD dariniais, kurie formuojasi veikiant DOX (Kang ir kt., 2000). p38 MAP kinazės svarbą apoptozės indukcijai yra parodę ir kiti autoriai. Be to nustatyta, kad DOX žiurkės kardiomiocituose bei kai kuriose vėžinėse ląstelių linijose aktyvina ir kitą MAPK šeimai priklausančią proteinkinazę – JNK bei transkripcijos veiksnį c-Jun. Aktyvi JNK moduliuoja proapoptozinių baltymų - Bak ir Bax, raišką (Norobi ir kt., 2002; Panaretakis ir kt., 2002, 2005; Poizat ir kt., 2005). Neseniai buvo nustatyta, kad DOX taip pat gali sukelti apoptozę slopindamas transkripcijos veiksnio GATA-4 bei antiapoptozinio baltymo Bcl-X_L raišką (Kim ir kt., 2003). Nepaisant to, žinių apie JNK bei p38 MAPK vaidmenį DOX indukuoto žūties proceso metu nėra daug.

Literatūros duomenimis, DOX indukuoja NF-κB ir p53 signalinius kelius (Konorev ir kt., 2008; Wang ir kt., 2002, 2004). Nobori su kolegomis parodė, kad transkripcijos veiksnys ATF3 slopina p53 raišką ir apsaugo kardiomiocitus nuo apoptozinės žūties (Nobori ir kt., 2002). Nustatyta, kad PI3k/Akt signalinis kelias apsaugo ląsteles nuo DOX sukeltos jų žūties. Šį kelią gali aktyvinti IGF-1, LIF. Dėl to nuslopinamas kaspazių (3 ir 9), Bad veikimas, padidinama antiapoptozinio Bcl-X_L baltymo raiška ir stabdoma apoptozės iniciacija (Gagnon ir kt., 2008; Negoro ir kt., 2001). Tačiau kaspazės 3 slopinimas gali lemti kardiomiocitų žūtį nekrozės būdu (Kang, 2001). Neseniai aptarėme DOX indukuotą proapoptozinį JNK MAP kinazės vaidmenį, tačiau literatūroje yra minimas ir apsauginis šios kinazės vaidmuo. Žinoma, kad JNK fosforilina ir aktyvina c-Jun, kuris, savo ruožtu, gali aktyvinti transkripcijos veiksnį ATF, nulemiantį apsauginį veikimą po DOX poveikio (Minotti ir kt., 2004).

DOX gebėjimas sukelti apoptozinę kardiomiocitų žūtį priklauso nuo koncentracijos. Nustatyta, kad tik mažos jo dozės ($\leq 5 \mu\text{M}$) indukuoja apoptozę, o didesnės ($> 10 \mu\text{M}$) – nekrozę. Įdomu tai, kad ląstelės viduje DOX koncentracija būna apie 2 kartus didesnė nei išorėje - terpėje (Kotaramju ir kt., 2000).

Žinomas ir miogenezę slopinantis DOX veikimas. Šiuo atveju, DOX inhibuoja genų (MyoD ir miogenino), svarbių miogeninei diferenciacijai, raišką (Kurabayashi ir kt., 1993).

Cisplatina (CisPt) – alkiliantis agentas, veiksmingai stabdantis ląstelių proliferaciją ir/arba indukuojantis apoptozę daugelyje ląstelių rūšių. Kaip chemoterapinė medžiaga, CisPt naudojama vėžio gydymui nuo 1978 m., tačiau biocheminis šio vaisto veikimo mechanizmas dar nėra iki galo išaiškintas (Siddik, 2003). Žinoma, kad tik 1 % viduląstelinio CisPt kiekio sąveikauja su DNR. Ši sąveika ir nulemia CisPt citotoksiškumą, kuris pasireiškia jai jungiantis prie DNR bei trikdamas transkripcijos ir/arba DNR replikacijos procesus. Panašiai kaip ir kitos bifunkcinės alkilinančios medžiagos, CisPt sudaro vidugrandines, tarpgrandines, monofunkcines sąryšas su DNR bei tarpininkauja baltymo-DNR sąryšoje (Ciesielska ir kt., 2000; Gonzalez ir kt., 2001). Buvo nustatyta, kad ląsteles paveikus 25 μM CisPt, vienoje ląstelėje susidaro 5×10^4 DNR ir $>10^6$ baltymų sąryšų. Šie pažeidimai lemia apoptozinę ląstelių žūtį (Berndtsson ir kt., 2006). Taip pat CisPt sąveikauja su RNR, mikrofilamentais bei sierą turinčiais baltymais: metalotioneinu, glutationu. Manoma, kad tai nulemia ląstelių atsparumą CisPt, tačiau šis mechanizmas nėra aiškus (Colvin, 2000; Pill ir Lippard, 1997). Atsparumą CisPt taip pat gali lemti padidėjęs DNR reparacijoje dalyvaujančių baltymų bei antiapoptozinių Bcl-2 šeimos genų raiškos lygis, slopinami apoptozę inicijuojantys signalo perdavimo keliai (Gonzalez ir kt., 2001; Perez, 1998). Chemoterapinio preparato poveikį gali mažinti CisPt aktyvinamas PI3K/Akt signalinis kelias (Gagnon ir kt., 2008).

Kokiu būdu CisPt patenka į ląstelę, taip pat nėra visiškai aišku. Manoma, kad pagrindinis mechanizmas yra pasyvi difuzija, nors aktyvi pernaša taip pat įmanoma. Yra duomenų, kad čia svarbų vaidmenį atlieka ląstelės membranoje esantis fosfatidilserinas, o neseniai buvo gauti įrodymai, kad cisplatinos patekimui į ląstelę tarpininkauja vario transporto baltymas Ctr1 (Nitiss, 2002; Reedijk, 2003).

CisPt aktyvina daugybinius signalo perdavimo kelius, dalyvaujančius ląstelei atsakant į stresą. Vienas jų - MAP kinazių šeimos kelias. CisPt reguliuoja ERK1/2 bei JNK1 aktyvumą. ERK aktyvinimas gali būti svarbus kaip ląstelės išgyvenimo signalas. Nustatyta, kad sumažėjęs ERK aktyvumas ir padidėjęs JNK aktyvumas yra susiję su apoptozės indukcija P12 ląstelėse. Taigi, ERK apsaugo ląsteles, o JNK, atvirkščiai, skatina programuotą jų žūtį po CisPt poveikio. Tačiau, naujesniais duomenimis, JNK aktyvinimas gali būti reikalingas DNR reparacijai ir ląstelės išgyvenimui po CisPt poveikio, o ERK dalyvauja vystantis atsparumui šiai medžiagai (Persons ir kt., 1999; Siddik, 2003; Wang ir kt., 2000). Be to, aktyvi JNK fosforilina ir aktyvina c-Jun, atsakingą už keletą genų, tarp jų ir metalotioneino, raišką. Metalotioneinas yra streso indukuojamas baltymas, pasižymintis antioksidaciniu, antiapoptoziniu veikimu ir yra susijęs su priešvėžinių vaistų atsparumu (Lazo ir kt., 1998).

CisPt, priklausomai nuo koncentracijos bei metabolinių ląstelės sąlygų, gali indukuoti skirtingus ląstelės žūties tipus – apoptozę arba nekrozę (Fuertesa ir kt., 2003; Gonzalez ir kt., 2001). CisPt poveikio sąlygojama apoptozė ląstelėje gali būti inicijuojama keliais būdais. Nustatyta, kad CisPt sukeltos DNR pažeidimai gali indukuoti p53 raišką. Nuo jos taip pat priklauso p21WAF aktyvumas ir ląstelės ciklo stabdymas G1 fazėje, kuris nulemia pirmalaikį fibroblastų senėjimą, susijusį su apoptozės dažniu, bei plyšinių jungčių tarp ląstelių praradimu (Zhao ir kt., 2004). Kai DNR pažeidimas neištaisomas, p53 sukelia apoptozę. p53 taip pat gali reguliuoti ląstelės jautrumą CisPt, indukuodamas proapoptozinio Bax arba slopindamas antiapoptozinio Bcl-2 raišką (Gonzalez ir kt., 2001). Be to, šio priešvėžinio junginio sukeltos DNR pažeidimai per jas aptinkančių molekulių kaskadą keičia mitochondrijų membranų pralaidumą, paleidžiamas cit c, citoplazmoje formuojasi apoptosomos bei vyksta kaspazių aktyvinimas (Kojima ir kt., 1998). Dar vienas galimas apoptozės indukcijos būdas – Fas receptoriaus aktyvinimas, taip pat nulemiantis apoptosomos komplekso formavimąsi bei kaspazių aktyvinimą (Huang ir kt., 2003). Kiti autoriai teigia, kad CisPt indukuoja apoptozinį signalą, inicijuodama nuo kaspazės-8 priklausomą cit c

išlaisvinimą, o JNK, slopindama kaspazės-3 aktyvumą, iš dalies apsaugo ląsteles nuo šios medžiagos inicijuojamos apoptozės (Koo ir kt., 2002). Galimu CisPt toksinio veikimo mediatoriumi dažnai laikomas oksidacinis stresas (Berndtsson ir kt., 2006; Bragado ir kt., 2007). Darbų, kuriuose buvo tirta miogeninių ląstelių žūtis po CisPt poveikio, nėra daug. Žinoma, kad ši medžiaga stabdo miogeninių ląstelių diferenciaciją, o taip pat sąlygoja kardiotoksiškumo pasireiškimą (Tassinari ir kt., 1997).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Naudotos medžiagos

Ląstelių auginimui buvo naudotos terpės iš *Sigma-Aldrich*: Iscove's modifikuota Dulbecco terpė (IMDM), Dulbecco's modifikuota Eagle's terpė (DMEM), RPMI 1640 terpė. Jų priedai - fetalinis veršelio serumas (FVS), penicilino-streptomicino (atitinkamai 100 vnt./ml ir 100 µg/ml) mišinys bei adhezinių ląstelių monosluoksniu suardymui naudotas 0.25 % tripsino-EDTA tirpalas gauti iš *Biological Industries*, Israel.

Apoptozės tyrimuose buvo naudotos priešvėžinės genotoksinės/chemoterapinės medžiagos pirktos iš *Sigma-Aldrich*: cisplatina (10 mg/ml, vandeniniame druskų tirpale), doksorubicinas (1 mM, vandenyje) bei kardiotoksinį citotoksiškumą imituojančios medžiagos - NOC-18 (dietilentriaminas/azoto oksidas, DETA/NO) (1M, vandenyje), 30 % H₂O₂ tirpalas, IL-6 (1000 vv/ml, fosfatiniame buferyje, turinčiame 10 % serumo) ir TNF-alfa (0,1 mg/ml, vandenyje).

Signalinių molekulių aktyvumo tyrimuose naudoti antikūnai prieš: ERK, fosfo-ERK (pelės, toliau (p)), JNK (p), HA (p) (*Santa Cruz*), c-Jun (p), FasL (p) (*BD Biosciences*); fosfo-JNK (p), fosfo-p38 (triušio, toliau (tr)), p38 (tr), Akt (tr), fosfo-c-Jun (tr), caspase-3 (p) (*Cell signaling Technologies*); fosfo-Akt (tr), m-cadherinas (p), (*BIOSOURCE, Invitrogen*); mioziną (MHC) (p), desminą (p) miogeniną (p) (*Sigma*); MyoD (p) (*Abcam*). Prieš triušį ir pelę naudoti antikūnai, konjuguoti su krienų peroksidaze iš *Cell Signaling Technologies*. Visi antikūnai skiesti pagal gamintojų rekomendacijas.

Signalinių molekulių inhibitoriai - UO126, SP600125, AKT inhibitorius VIII, Ly294002, vortmaninas, SB203580 gauti iš *Promega* arba *Calbiochem*.

2.2. Miogeninių ląstelių išskyrimas iš skeleto skersaruožio raumeninio audinio ir pirminių ląstelių linijų gavimas

Miogeninės ląstelės buvo skiriamos iš triušio griaučių skersaruožio raumens (LR Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimas naudoti laboratorinius gyvūnus mokslo tiriamajam projektui Nr. 0121, 2004-07-09 bei Nr. 0171, 2007-10-31). Atlikus pilną gyvūno anesteziją ketaminu (30-50 µg/kg) ir diazepamu (5 µg/kg) iš kairės kojos šlaunies buvo paimamas 0,5 cm³ raumeninio audinio gabalėlis, kuris transportuojamas pernešimo terpėje (DMEM su 3x antibiotikų mišiniu: penicilinas 300 vnt./ml ir streptomicinas 300µg/ml). Toliau audinys buvo smulkinamas mechaniniu būdu sukarbant, veikiamas fermentų - kologenazės (1 mg/ml) ir hialuronidazės (0,3 mg/ml) mišiniu, paruoštu 0,125 % tripsino bei 0,1 % EDTA tirpale, ir inkubuojama 10-15 min. purtant 37°C temperatūroje. Gauta suspensija praskiesta auginimo terpe su serumu ir centrifuguota 1-2 min., 100 x g. Suspensija surinkta ir, 2 kartus praskiedus auginimo terpe, centrifuguota 10 min., 200 x g. Nuosėdos dar kartą praplautos centrifuguojant. Ląstelės surinktos ir išsėtos į kultivavimo indus IMDM terpėje, praturtintoje 10 % FVS ir antibiotikais - penicilinu (100 vnt./ml) bei streptomicinu (100 µg/ml). Po 1-2 parų pašalintos neprilipusios ląstelės, pakeista terpė, ląstelės pradėjo daugintis.

Maždaug po 1-2 savaičių susiformavo kamieninių ląstelių monosluoksnis, gauta pirminė ląstelių kultūra, kuri buvo persėjama 1 – 2 kartus per savaitę ir tokiu būdu gaunama pirminė ląstelių linija. Augimo terpė – IMDM, turinti 10 % FVS, penicilino (100 vnt./ml) ir streptomicino (100 µg/ml).

2.3. Palyginamajai analizei naudotų linijų ląstelių auginimas

Palyginamajai analizei naudotos T-leukemijos Jurkat, B-leukemijos REH limfoidinės ląstelės, promielocitinės leukemijos HL-60 bei NB4, chroninės mieloidinės leukemijos K562 ląstelės (gautos iš ATCC – *angl.* American tissue culture collection) buvo auginamos RPMI 1640 terpėje, turinčioje 10 % FVS, penicilino (100 vnt./ml) ir streptomicino (100 µg/ml), 37⁰C temperatūroje, esant 5% CO₂. Ląstelės persėjamos kas 2-3 dienas.

Epidermoidinės karcinomos A431 bei plaučių karcinomos A549 linijų ląstelės (gautos iš ATCC) buvo auginamos IMDM terpėje su 10 % FVS, penicilino (100 vnt./ml) ir streptomicino (100 µg/ml). Persėjamos kas 2-3 dienas ląstelių monosluoksnį suardant iki individualių ląstelių 0,25 % tripsino-EDTA tirpalu.

2.4. Ląstelių skaičiaus ir jų gyvybingumo įvertinimas tripano mėliu

Ląstelių gyvybingumas buvo nustatomas, remiantis negyvų ląstelių membranos pralaidumu. Tam naudotas tripano mėlio tirpalas (0,4% tripano mėlio tirpalas, paruoštas fosfatiname buferyje (80 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl) (FB). Ląstelių monosluoksnis buvo suardomas 0,25 % tripsino-EDTA tirpalu, ląstelės praskiedžiamos auginimo terpe ir gauta ląstelių suspensija lygiomis dalimis sumaišoma su paruoštu tripano mėlio tirpalu. Skaičiuota Gorajjevo kameroje, naudojant šviesinį mikroskopą. Negyvos ląstelės dažosi mėlyna spalva.

Gautas gyvų ląstelių skaičius išreiškiamas ląstelių skaičiumi viename mililitre ląstelių suspensijos (ląstelių sk./ml) arba santykinu gyvybingumu:

$$\text{Santykinis gyvybingumas} = \frac{(\text{Gyvų ląstelių skaičius, nustatytas po tam tikros trukmės tiriamų medžiagų poveikio})}{(\text{Gyvų ląstelių skaičius, nustatytas tiriamų medžiagų poveikio metu})}$$

2.5. Ląstelių proliferacinio aktyvumo įvertinimas

Tiriamų ląstelių proliferacija buvo vertinama naudojant MTT reagentą. Metodas paremtas gyvų ląstelių mitochondrijų fermentų gebėjimu tirpų geltonos spalvos MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromidą] redukuoti iki violetinės spalvos netirpius kristalus formuojančio formazano. Gyvų ląstelių skaičius yra tiesiogiai proporcingas susidariusio produkto – formazano, kiekiui, kuris įvertinamas spektrofotometriškai 570 nm bangos ilgyje, gautus netirpius kristalus ištirpinus etanolyje. Proliferacijos

įvertinimui naudojamas 0,2 mg/ml MTT tirpalas FB, kurio 100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ pilama ant ląstelių monosluoksnio prieš tai pašalinus auginimo terpę. Inkubuojama 0,5 – 2 val., susidariusios nuosėdos tirpinamos etanoliu, kurio pilama 500 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$. Optinis tankis matuojamas spektrofotometriškai, 570 nm bangos ilgyje.

Gauti rezultatai išreiškiami santykiniu gyvybingumu t.y., santykiu optinio tankio, išmatuoto po tam tikro poveikio su optiniu tankiu išmatuotu prieš ląstelių poveikį. Abiem atvejais optinis tankis yra proporcingas gyvų ląstelių skaičiui (taip pat žr. 2.4 skyrių).

2.6. Augimo intensyvumo vertinimas

Analizuojamos ląstelės yra fiksuojamos. Prieš fiksavimą pašalinama auginimo terpė. Fiksuojama ir dažoma 0,1% kristalvioletu, kurio tirpalas paruošiamas 20% etilo spirite. Į duobutes pilama po 120 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$, laikoma 30 minučių. Po to plokštelės buvo plaunamos 3 kartus vandeniu, džiovinamos. Prieš matavimą ląstelės lizuojamos 0,1% acto rūgšties tirpale, kuris paruoštas 50% etilo spirite. Į kiekvieną duobutę buvo pilama po 1ml/ cm^2 . Užaugusių ląstelių kiekis vertinamas matuojant optinį tankį spektrofotometru 570 nm bangos ilgyje (Kueng ir kt., 1989). Gauti rezultatai išreiškiami santykiniu gyvybingumu (žr. 2.4 ir 2.5 skyrius).

2.7. Imunocitochemija naudojant antikūnus, konjuguotus su šarmine fosfataze

Kontrolinės ir diferencijuotos ląstelės parą auginamos 30 mm skersmens Petri lėkštelėse su dugne esančiais dengiamaisiais stikliukais, fiksuojamos acetono:metanolio (1:1) tirpalu 10 min., plaunamos TBST tirpalu (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,2 % Tween-20, pH 8.0), blokuojamos 1 % jaučio serumo albuminu (JSA) (*Sigma-Aldrich*), paruoštu FB 1 val., vėl plaunamos TBST tirpalu ir inkubuojamos su antikūnais prieš mioziną, konjuguotais su šarmine fosfataze (1:100, 0,05 M Tris buferyje, pH 8.0, su 1 % JSA, 1 mM MgCl_2 , 50 % glicerolio ir 0,1 % NaN_3) 2 val. kambario temperatūroje. Po

inkubacijos stikliukai plaunami TBST tirpalu, inkubuojami su chromoforo tirpalu (1 % BCIP DMF-e, 1,5 % NBT DMF-e, 50 mM levamizolio vandenyje) 30 –60 min. kambario temperatūroje ir analizuojami šviesiniu mikroskopu.

2.8. Imunofluorocitocheminis metodas

Analizei *konfokaliniu* mikroskopu 30 tūkst. ląstelių/cm² išsėjama į 24 duobučių plokštelę (*Orange Scientific*, Belgija) su dengiamaisiais stikliukais dugne. Auginimo terpė – IMDM su 10 % FVS, 100 U/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino. Po paros nupilama auginimo terpė, ląstelės kartą plaunamos kambario temperatūros FB, fiksuojamos 4% paraformaldehidu 15 min. Po to tris kartus plaunama FB. Ląstelės permeabilizuojamos 15 min. 0,2 % Triton X-100/FB ir blokuojamos 1 % JSA/FB, 1 val. Tada inkubuojama su antikūnais prieš desminą arba MyoD 60 min., 37 °C temperatūroje. Plaunama 1 % JSA/FB tirpalu ir inkubuojama su antikūnais prieš pelės Fab fragmentą, konjuguotais su Alexa Fluor 594 (*Molecular Probes*) (1:250) 30 min., 37 °C temperatūroje. Dar kartą plaunama FB. Dengiamieji stikliukai dedami ant objektinių stikliukų, ir pavyzdžiai analizuojami.

Analizei *tėkmės citometru* tiriamų ląstelių monosluoksnis buvo suardomas tripsino-EDTA (santykis 1:1) mišiniu, ląstelės plaunamos šaltu FB, pH 7.4, fiksuojamos šaltu metanolio 5 min. ir blokuojamos 2 % JVS, paruoštu FB, 1 val. Tada inkubuojama su antikūnais prieš desminą arba mioziną +4 °C temperatūroje. Ląstelės plaunamos FB ir inkubuojamos su Alexa 488-ožkos prieš pelės Fab fragmentą antikūnais (*Molecular Probes*, 10 µg/ml 1 % JSA/FB/ožkos serumo tirpale) 30 min., +4 °C. Analizuojama BD FACSCanto™ II tėkmės citometru.

2.9. Miogeninės diferenciacijos iniciacija

Diferenciacijai ląstelės išsėjamos į auginimo plokštelių duobutes auginimo terpėje (IMDM, 10 % FVS, 100 vnt./ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino) tokiu tankiu, kad po paros monosluoksnis sudarytų apie 70-80

% . Kitą dieną po ląstelių išsėjimo auginimo terpė pakeičiama į diferenciacijos (DMEM terpė, praturtinta 2 % arklio serumo (*Sigma-Aldrich*)) terpę. Daugiabrunduolių ląstelių susidarymas vertinamas po 3 parų.

2.10. Transplantuojamų ląstelių žymėjimas

Ląstelės išsėjamos ir inkubuojamos 37° C termostate, esant aplinkoje 5 % CO₂. Praėjus 24 val. po išsėjimo, ant ląstelių monoslouksnio užpilama 6-diamino-2 fenilindolo (DAPI) iki galutinės koncentracijos 10µg/ml. Po 2 val. terpė su DAPI nupilama, o ląstelių monoslouksnis suardomas EDTA-tripsino mišiniu. Surinktos ląstelės tris kartus plaunamos FB. Po paskutinio plovimo 5 mln. ląstelių suspenduojama 500 µl terpės be serumo ir naudojama tansplantacijai į triušio širdį, kurioje dirbtinai sukeliamas miokardo infarktas.

2.11. Histologinė audinio analizė

Praėjus tam tikram laikui po transplantacijos, triušiu atliekama eutanazija, išimta širdis laikoma šaltai, lede. Nepraėjus 3 val., atliekama histologinė analizė. Tuo tikslu, 1x1,5 cm širdies audinio gabaliukas, užšaldytas iki -80° C, pjaustomas mikrotomu 4-5 mikronų storio pjūviais, ir mėginiai klijuojami ant objektinio stikliuko. Mėginiai gali būti analizuojami fluorescentiniu mikroskopu arba, nudažius hematoksilinu/eozinu, šviesiniu mikroskopu.

2.12. Ląstelių ciklo tyrimas tēkmės citometru

Ląstelių monoslouksnis buvo suardomas tripsino-EDTA tirpalu, praskiedžiama terpe su serumu ir suskaičiuojamos ląstelės. Paruošiama 1 ml suspensijos, kurios tankis 1x10⁶ ląstelių/ml ir nucentrifuguojama (10 min., 200 x g). Supernatantas pašalinamas, o ląstelės plaunamos FB ir dar kartą centrifuguojama. Pašalinus supernatantą, ląstelės fiksuojamos šaltu 70% etanoliu. Kad ląstelės nesuliptų, fiksažas lašinamas atsargiai, mėgintuvėlį intensyviai purtant. Taip paruošti pavyzdžiai -20°C temperatūroje gali būti saugomi keletą savaičių. Prieš analizę, pavyzdžiai centrifuguojami,

supernatantas nupilamas. Ląstelės suspenduojamos 50 µg/ml propidžio jodido (PI) tirpale, paruošto FB. Kadangi PI ne tik interkalijuojasi į DNR grandinę, bet ir jungiasi su RNR, todėl ribonukleazės turi ją pašalinti. Tuo tikslu į PI tirpalą pridedama 100 µg/ml RNazės A (Ormerod, 1992). Tyrimo duomenys gauti BD FACSCanto™ II tēkmės citometru. Analizuota po 5 tūkst. ląstelių iš kiekvieno mėginio.

2.13. Ląstelių žūties analizė

Ląstelių gyvybingumas vertintas fluorescentine mikroskopija, naudojant su DNR besijungiančių dažų mišinį: akridino oranžą (AO) – 100 µg/ml ir etidžio bromidą (EB) - 100 µg/ml. Abu paruošti FB.

Prieš dieną išsėtos ląstelės paveikiamos tiriamomis medžiagomis. Po 24 val. poveikio visos ląstelės surenkamos ir suskaičiuojamas gyvų ląstelių skaičius. Tuomet centrifuguojama 5 min., 200 x g, supernatantas nupilamas, o ląstelės suspenduojamos terpės laše. 30 µl ląstelių suspensijos sumaišoma su 4 µl dažų mišinio (AO/EB). Ląstelių pasiskirstymas populiacijoje įvertinamas pagal dažymąsi AO/EB. AO dažas patenka į gyvas ir negyvas ląstelės, interkalijuoja į dvigrandę DNR ir nudažo branduolį žaliai. Taip pat jungiasi su RNR ar viengrande DNR ir nudažo rusvai oranžine spalva. EB įjungia tik negyvos ląstelės, nes gyvų ląstelių membrana nepraleidžia šio dažo. EB sąveikauja su DNR ir nudažo branduolį oranžine, o RNR – silpnai oranžine spalva. Šiuo būdu nudažytos ląstelės analizuojamos fluorescentiniu mikroskopu ir skirstomos į penkias grupes: 1) gyvos neapoptozinės (G - ryškiai žalias chromatinas); 2) gyvos apoptozinės (GA - kondensuotas ar fragmentuotas ryškiai žalias chromatinas); 3) negyvos apotozinės (NA - kondensuotas ar fragmentuotas ryškiai oranžinis chromatinas); 4) nekrozinės (N - ryškus oranžinis chromatinas); 5) be chromatino (BCH - ląstelės, netekusios DNR, dažosi silpnai oranžine spalva) (Mercille ir Massie, 1994).

Kiekviename pavyzdyje 2 kartus skaičiuojama po 100 ląstelių. Ląstelių pasiskirstymas populiacijoje išreiškiamas procentais.

2.14. Apoptozinių ląstelių DNR fragmentacijos tyrimas

10^6 ląstelių lizuojama 50 μ l lizės buferio (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% NP-40, 20 mM EDTA). Centrifuguojama 5 min., 1600 x g, supernatantas nusiurbiamas, vėl vykdoma ekstrakcija tuo pačiu lizės buferio kiekiu. Supernatantas veikiamas RNRaze (galutinė koncentracija 5 mg/ml), inkubuojama 2 val., 56°C. Pridedama proteinazės K iki galutinės koncentracijos 2.5 mg/ml, inkubuojama 37°C 2 val. Pridedama pusė tūrio 10 M amonio acetato ir DNR išsodinama su 2.5 tūrio etanolio. Elektroforezė vykdoma 3-4 val. 2% agarozės gelyje, TAE buferyje, įtampa - 7 V/cm. Tuomet gelis dažomas 1 μ g/ml etidžio bromido tirpalu ir analizuojamas UV šviesoje (Hermann ir kt., 1994).

2.15. Ląstelių linijų su įvestu c-Jun ar baltymų kinazės Akt/PKB genais gavimas

Dieną prieš transfekciją miogeninės ląstelės išsėjamos į 24 šulinėlių plokštelę po 5×10^4 ląstelių/šulinėlyje IMDM terpėje su 10 % serumo, be antibiotikų. Kiekvienai transfekcijai 0,5 μ g DNR praskiedžiama 25 μ l OPTI-MEM (Invitrogen) terpės be serumo. Atskirai 25 μ l terpės be serumo praskiedžiama 2 μ l lipofektamino reagento (LIPOFECTAMINE™ 2000) (Life technologies) ir inkubuojama 5 min. kambario temperatūroje. Praskiesti DNR ir lipofektamino reagentas sumaišomi, inkubuojami 40 min. kambario temperatūroje, kad susiformuotų DNR-lipofektamino kompleksai. Į mišinį įpilama 150 μ l OPTI-MEM terpės be serumo. Iš šulinėlių su ląstelėmis išsiurbiamas auginimo terpė, įpilama 200 μ l IMDM terpės be serumo ir užpilamas transfekcijos mišinys. Inkubuojama 6 val., 37°C. Tada užpilama 400 μ l IMDM terpės su dvigubu serumo kiekiu. Praėjus trims paroms po transfekcijos, ląstelės persėjamos IMDM terpėje su 10 % FVS ir 0,3 mg/ml genocicino (Gibco). Auginamos genocicininui atsparių ląstelių kolonijos.

c-Jun kiekio moduliavimui buvo naudojama plazmidė pcDNR-HA-Jun, sukurta pcDNA3 vektoriaus pagrindu, į kurią buvo įklonuota su HA (hemagliutininas) sulieta *c-jun* geno seka. Akt raiškos moduliavimui naudota

plazmidė pBabe-puro-Akt (kontrolėi naudota pBabe-puro-Vekt.), turinti atsparumą puromicinui bei pSG5 vektoriaus pagrindu sukurti Akt konstruktai - padidintos *Akt* raiškos vektorius (HA-Akt, *akt* genas, sulietas su HA epitopo seka ir dominantinis negatyvus *Akt* (Akt-CAAX, *akt*, sulietas su CAAX seka (Burgering & Coffey, 1995; von Gise et al., 2001).

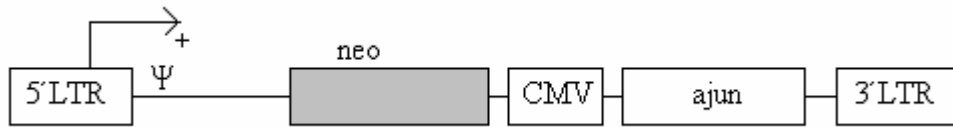
2.16. Elektroporacija

Ląstelės tripsinizuojamos, suspenduojamos terpėje ir suskaičiuojamos. 5×10^5 ląstelių centrifuguojama ir vieną kartą plaunama Opti-MEM terpe. Nucentrifugavus, ląstelės suspenduojamos 200 μ l Opti-MEM terpės. Tada pridedama siRNA iki 600 nM ir inkubuojama 10 min. kambario temperatūroje. Po inkubacijos ląstelės elektroporuojamos naudojant Gene Pulser XCell (Biorad), parinkus sąlygas: 950 μ F, 200 V, 0.2-mm kiuvetėse. Po elektroporacijos ląstelės 20 min. inkubuojamos kambario temperatūroje, tada praskiedžiamos IMDM terpe, praturtinta 20 % FVS, ir išsėjamos 5×10^4 ląstelių/cm² tankiu į polistirolines 24 duobučių plokšteles.

2.17. Priešprasminės c-jun sekos įvedimas

Išsėjamos miogeninės bei virusą produkuojančios PA 317 ląstelės taip, kad po paros jos sudarytų 50-80 % monosluoksnio. PA 317 ląstelių auginimui naudojama DMEM terpė, o miogeninių – IMDM, su 10% FVS ir antibiotikais. Kitą dieną PA 317 ląstelių terpė pakeičiama į DMEM su 3% FVS ir inkubuojama 8-12 val. 37⁰C temperatūroje. Po to terpė surenkama nuo ląstelių monosluoksnio, pridedama polibreno (Sigma) iki 4 μ g/ml ir filtruojama per 0,45 μ M filtrą. 2 ml paruoštos terpės užpilama ant miogeninių ląstelių ir inkubuojama 1 val. 1-2 kartus pajudinant plokštelę, kad ląstelės būtų drėgnos. Po to dar pridedama 2-3 ml DMEM terpės su 10%FVS ir polibreno iki 4 μ g/ml, inkubuojama per naktį. Tada infekuotų miogeninių ląstelių flakonėlyje pakeičiama terpė. Naudojama IMDM terpė su 10% FVS ir 0,3 mg/ml geniticino. Auga infekuotos, geniticinui atsparios kolonijos.

Darbui buvo naudojamas retrovirusinis vektorius pLNCX su įvestomis protoonkogeno *c-jun* sekomis atvirkštinėje orientacijoje citomegalus viruso enhancerio promotoriaus atžvilgiu, kuris buvo paruoštas Vystymosi biologijos skyriuje (Biochemijos institutas).



2.1 pav. Eukariotinio ekspresijos vektoriaus pLNCajun su protoonkogeno *c-jun* sekomis atvirkštinėje orientacijoje konstruktas.

2.18. Imunoblotingas

Ląstelės lizuojamos lizės buferyje (10 mM Tris pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 0.1% BSA, 1% Triton X-100, 1 mM PMSF, 2 mM Na₃VO₄, 20 µg/ml aprotinino, pH 7,2) (1 mln. ląstelių imama 500 µl lizės buferio) 20 min. Centrifuguojama 15 min., 14000 x g, 4°C temperatūroje. Supernatantas sumaišomas su 2 x SDS pavyzdžio buferiu. Lygūs baltymų kiekiai išskirstomi elektroforetiškai 10-12 % poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis. Baltymai pernešami ant PVDF membranos ir nespecifinio susirišimo vietos blokuojamos Bloto tirpale (5% neriebaus pieno miltelių, 10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) 1 val. kambario temperatūroje. Membranos su antikūnais prieš tiriamus baltymus inkubuojamos per naktį 4°C temperatūroje, plaunamos TBS-Tween-20 tirpalu (10 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) ir inkubuojamos su atitinkamais antriniais antikūnais 1 val. Analizuojama chemiliuminescencijos metodu (ECL, *Amersham International*).

Baltymų koncentracijos matuotos Bredfordo reagentu (*Fermentas*).

2.19. Statistinė duomenų analizė

Duomenys pateikti kaip vid. ± SN, apskaičiuotas iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų. Duomenų kitimo patikimumas įvertintas lyginant

nesuporuotų, dviejų nuokrypių Student t-testą. Duomenys laikomi patikimais, kai P yra mažesnis nei 0,05.

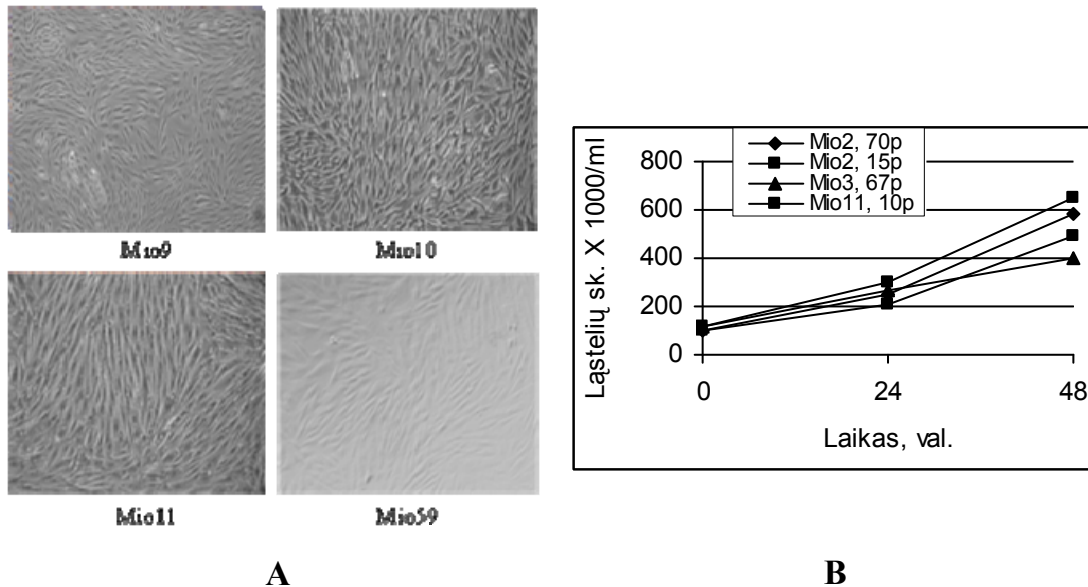
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Viena iš svarbiausių ląstelių transplantacijos problemų - transplantuojamų miogeninių ląstelių nepakankamas išgyvenimas bei integracija pažeistame širdies audinyje. Įvairūs širdies pažeidimai, pavyzdžiui išemija-reperfuzija, miokardo infarktas, yra susiję su patofiziologiniais miokardo funkcijos pakitimais, dėl kurių yra aktyvinamos ir išlaisvinamos tokios reaktyvios molekulės kaip RDD (reaktyvūs deguonies dariniai) ir citokinai, vystosi uždegiminis procesas. Visa tai neigiamai veikia ne tik transplantuotas miogeninės ląsteles, bet ir širdies miocitus. Yra nustatyta, kad didelė dalis persodintų ląstelių (iki 90 proc.) žūva jau pirmosiomis valandomis po transplantacijos (Beauchamp ir kt., 1999; Irintchev ir kt., 1995; Pouzet ir kt., 2000). Likusios gyvos transplantuotos ląstelės turi išgyventi širdyje ilgus metus, todėl jos gali tapti ir daugelio kardiotoksinių medikamentų taikiniais. Taigi, svarbiausia transplantuotų miogeninių ląstelių išgyvenimo sąlyga - atsparumas ląstelių žūtį (apoptozę ar nekrozę) indukuojantiems faktoriams. Apoptozės vaidmuo, jos mechanizmai tiek širdies išemijos patologiniame židinyje, tiek ir mioblastų kultūroje bei širdies miocitų kultūroje yra vis dar neaiškūs.

Šiame darbe buvo tiriami suaugusio organizmo kamieninių miogeninių ląstelių išgyvenimo ir žūties mechanizmai, ieškoma signalinių molekulių, apsprendžiančių šių ląstelių išgyvenimą patologiniame židinyje.

3.1. Kamieninių miogeninių ląstelių charakterizavimas

Griaučių raumenys yra potencialus autologinių ląstelių šaltinis terapijai. Mes gavome keliolika pirminių miogeninių ląstelių linijų iš skirtingų triušių skersaruožių raumenų. Keturių iš jų monosluoksniu nuotraukos pateikiamos 3.1 paveiksle, A. Kadangi viena iš kamieninėms ląstelėms būdingų savybių yra



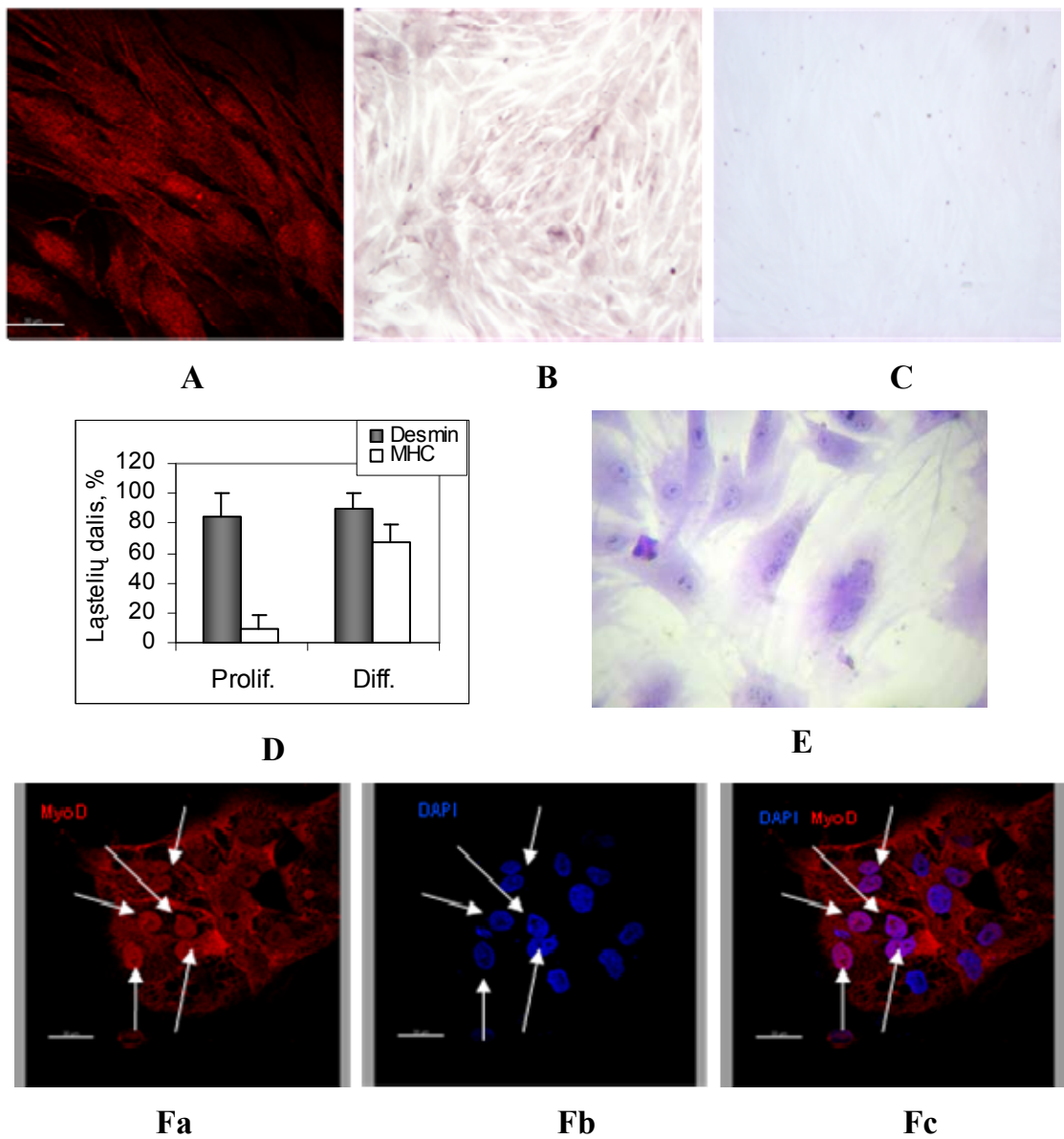
3.1 pav. Atskirų iš triušio skeleto raumens gautų pirminių miogeninių ląstelių linijų morfologijos bei proliferacijos palyginimas. A - Skirtingų pirminių miogeninių linijų Mio9, Mio10, Mio11 bei Mio59 ląstelių monosluoksnių nuotraukos; B – Mio2 linijos ankstyvo bei vėlyvo, Mio3 linijos vėlyvo bei Mio 11 linijos ankstyvo pasažų ląstelių dauginimasis kultūroje *in vitro* buvo vertinamas tripano mėlio testu. Ląstelės išskirtos ir auginamos vienodomis sąlygomis įprastoje auginimo terpėje nenaudojant papildomų augimo faktorių (žr. 2.2 ir 2.4 skyrius).

neribotas jų proliferacinis potencialas, todėl pradžioje tyrėme šių miogeninių linijų dauginimosi kultūroje *in vitro* galimybes. Buvo vertinama atskirų linijų ląstelių proliferacija, o taip pat lyginama dauginimosi priklausomybė nuo persėjimų skaičiaus. Gauti duomenys parodė, kad miogeninės ląstelės gali būti ilgą laiką auginamos kultūroje *in vitro* nesikeičiant jų proliferaciniam pajėgumui (3.1 pav., B) (Bukelskiene ir kt., 2005). Šiuo metu turime keletą linijų, kurios *in vitro* dauginasi daugiau nei metus (virš 100 pasažų). Mūsų gauti rezultatai apie neribotą miogeninių ląstelių proliferacinį potencialą yra nauji. 2005 metais išspausdinto straipsnio apie pelės raumens kilmės kamieninių ląstelių ilgalaikį dauginimąsi *in vitro* autoriai nurodo, kad iki šiol tokių duomenų nebuvo paskelbta (Deasy ir kt., 2005).

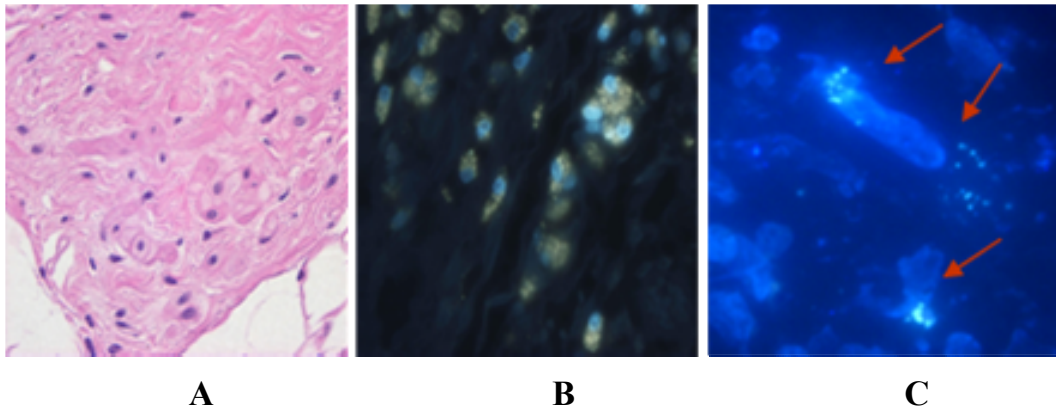
Kamieninės ląstelės audinyje yra aptinkamos ir apibūdinamos, remiantis molekuliniais žymenimis. Miogeninės ląstelės, gautos iš skirtingose diferenciacijos stadijose esančio audinio, pasižymi skirtingomis savybėmis, taip pat skiriasi ir skirtingose diferenciacijos stadijose esančios kamieninės

miogeninės ląstelės. Todėl pradžioje įvertinome desmino, kuris yra skeleto, lygiųjų raumenų bei širdies raumens tarpinių filamentų baltymas, raišką ir patvirtinome miogeninę gautų linijų ląstelių kilmę (Mermelstein ir kt., 2006; Paulin ir Li, 2004; Smythe ir kt., 2001). Šio baltymo raiška, buvo tiriama ankstyvo (5-10) bei vėlyvo (>50) pasažų proliferuojančiose ląstelėse. Gauti duomenys parodė, kad ilgalaikis miogeninių ląstelių auginimas *in vitro* desmino raiškos nekeitė. Visais atvejais desminą ekspresuojančios ląstelės sudarė didžiąją tiriamos populiacijos dalį (3.2 pav., A ir D). Satelitinių ląstelių miogenezės procesas yra reguliuojamas raumenims specifinių MRF šeimos transkripcijos veiksnių. Vienas jų yra MyoD, kurio raiška yra būdinga aktyvintoms satelitinėms ląstelėms (Yablonka-Reuveni ir kt., 2008). Gauti duomenys parodė šio transkripcijos veiksnio buvimą mūsų tiriamose ląstelėse (3.2 pav., Fa-Fc). Miozino sunkiųjų grandinių raiška (MHC), kuri žymi vėlyvą miogeninės diferenciacijos stadiją (Iezzi ir kt., 2002; Zammit ir kt., 2006a), buvo taip pat nustatyta tirtose ląstelėse, po jų auginimo 3 paras diferencijuojančioje terpėje, formuojantis daugiabranduolėms ląstelėms (žr. 2.9 skyrių) (3.2 pav., B-E).

Buvo atlikti pradiniai šių ląstelių transplantacijos į triušio širdį, kurioje dirbtinai sukeltas miokardo infarktas, tyrimai. Duomenys, gauti praėjus mėnesiui po transplantacijos, parodė, kad dalis persodintų ląstelių išgyveno (3.3 pav., A ir B) (Bukelskienė ir kt., 2005; Širmenis ir kt., 2007). Ląstelės buvo persodintos į „šviežią“ miokardo infarkto sritį, tai reiškia, kad jos pateko į pataloginį židinį, kuriame yra daug įvairių faktorių, veikiančių ląstelių išgyvenimą. 3.3 paveikslo C dalyje matome, kad širdies raumens audinyje greta gyvų ląstelių galima rasti ir negyvų, apoptozinių ląstelių. Todėl yra svarbu išsiaiškinti faktorius, sukeliančius transplantuojamų ląstelių žūtį, o taip pat rasti signalines molekules, atsakingas už šių ląstelių išgyvenimą ir/arba žūtį. Tokių signalinių molekulių moduliacija leistų pagerinti transplantacijai skirtų mioblastų išgyvenimo galimybes pataloginiame židinyje.



3.2 pav. Kamieninių miogeninių ląstelių charakterizavimas pagal specifinius markerius. Iš skeleto raumens gautų ląstelių būdinga desmino raiška (A), kuri išlieka diferencijuojant (D); po 72 val. auginimo diferencijuojančioje terpėje stimuliuojama miozino sunkiųjų grandinių (MHC) raiška (B, D), šios ląstelės diferencijuojasi į raumenines daugiabranduoles ląsteles (E). Tose pačiose ląstelėse, auginantose nediferencijuojančioje terpėje, MHC raiška neregistruota (C). Aktyvuotoms satelitinėms ląstelėms būdinga MyoD raiška (Fa); Fb – tos pačios ląstelių sankaupos branduoliai nudažyti DAPI; Fc - kompleksinis vaizdas: tie patys branduoliai švyti violetine spalva (DAPI dažyti branduoliai ir raudonai nusidažęs MyoD).



3.3 pav. Transplantuotų triušio miogeninių ląstelių aptikimas širdies audinyje. A – Širdies raumens histologinis preparatas dažytas hematoksilinu ir eozinu. **B** ir **C** – DAPI dažytų skeleto mioblastų aptikimas fluorescentiniu mikroskopu širdies audinyje. **C** – Rodyklėmis parodytos apoptozinės ląstelės. **A** ir **B** pateikti duomenys, gauti praėjus 1 mėn. po transplantacijos, o **C** – praėjus 1 savaitei po transplantacijos.

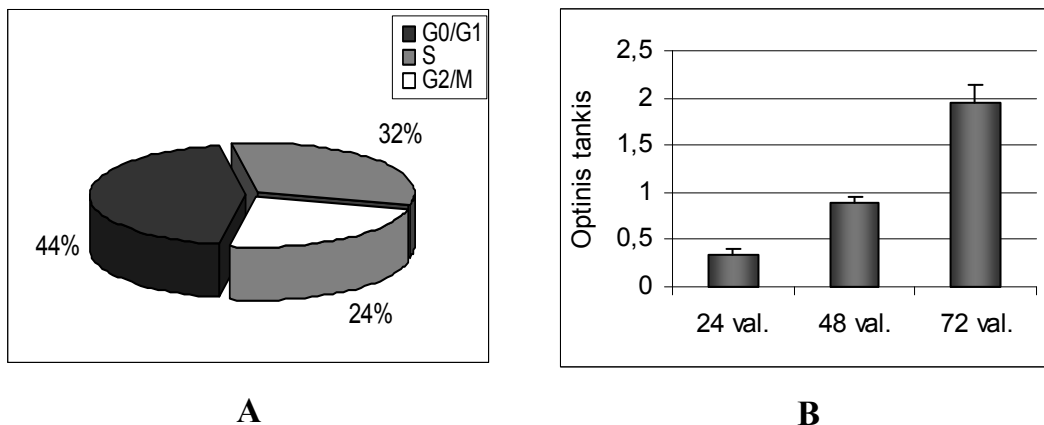
Taigi, mūsų parodytas neribotas iš triušio raumens gautų linijų ląstelių proliferacinis potencialas *in vitro*, jų gebėjimas diferencijuotis miogenine kryptimi bei išlikimas po transplantacijos gyvūno širdyje daro šias ląsteles patrauklias kardiomioplastijos tyrimuose - iš mažo raumens gabalėlio, padauginus kultūroje, galima gauti didelį ląstelių kiekį, o neribotas jų dauginimasis *in vitro* leidžia atlikti įvairias genetines manipuliacijas, siekiant į šias ląsteles įvesti genus, nulemiančius kamieninių miogeninių ląstelių atsparumą toksiniams poveikiams patologiniame židinyje.

3.2. Miogeninių ląstelių žūties tyrimai *in vitro*

Kadangi mūsų tiriamos pirminės miogeninės ląstelės, gautos iš triušio griaučių, yra skirtos transplantacijai į pažeistą gyvūno širdį, todėl yra svarbu išsiaiškinti mechanizmus, nulemiančius šių ląstelių žūtį ir išgyvenimą streso sąlygomis. Šiuo metu yra sukaupta nemažai žinių apie įvairias ląstelių žūties formas, tačiau apoptozė įvairių patologinių širdies būklių metu yra laikoma viena pagrindinių kardiotoksiškumo pasireiškimo priežasčių (Kang, 2001). Jos vaidmuo kardiomiopatijos vystymesi pirmą kartą paminėtas tik 1994 m., ir nors yra intensyviai dirbama, apoptozės indukcijos ir reguliavimo keliai tiek

patologiniame židinyje širdyje, tiek mioblastų kultūroje bei širdies miocitų kultūroje yra vis dar neaiškūs (Elsasser ir kt., 2001; Kang ir Izumo, 2003).

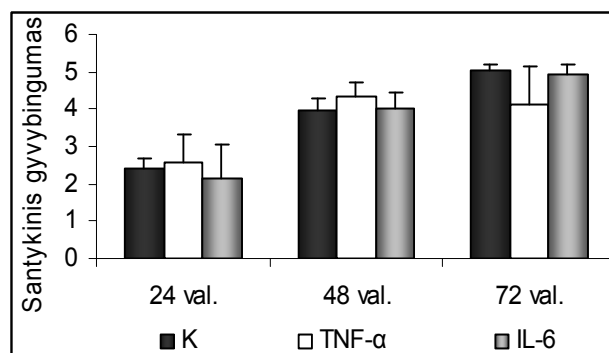
Siekdami įvertinti apoptozės pasireišimą bei nustatyti signalines molekules, reguliuojančias šį procesą, pagrindinius tyrimus atlikome su Mio9 ląstelių linija, tačiau palyginimui naudojome ir kitų miogeninių linijų ląsteles. Visi eksperimentai buvo atliekami, praėjus 24 val. po ląstelių išsėjimo, nes būtent per pirmąsias 24 val. po transplantacijos žūva dauguma į pataloginį židinį persodintų ląstelių. Be to, praėjus tik parai po transplantacijos, likusios gyvos ląstelės jau pradeda daugintis (Suzuki ir kt., 2004). 3.4 paveiksle pateikiamas tiriamų Mio9 linijos ląstelių pasiskirstymas ląstelės cikle pirmąją parą po išsėjimo, t. y. visų eksperimentų atskaitos taške (A) bei jų proliferacijos priklausomybė nuo auginimo laiko (B). Gauti rezultatai parodė, kad pirmąją parą po išsėjimo didelė miogeninių ląstelių populiacijos dalis dar yra G0/G1 ląstelės ciklo stadijoje, bet jau antrąją parą ląstelės pradeda intensyviai daugintis ir jų kiekis populiacijoje, praėjus 48 val. nuo ląstelių išsėjimo, padidėja daugiau nei 2 kartus, palyginus su ląstelių kiekiu, buvusiu 24 val. po jų išsėjimo.



3.4 pav. Mio9 linijos ląstelių ciklo ir proliferacijos vertinimas. A - Miogeninių ląstelių pasiskirstymas populiacijoje pagal ląstelės ciklo fazes, praėjus 24 val. po jų išsėjimo, nustatytas tėkmės citometrijos metodu. **B** – Mio9 ląstelių proliferacijos priklausomybė nuo auginimo laiko tirta MTT metodu (žr. 2.5 skyrių). Čia optinis tankis yra proporcingas metaboliškai aktyvių ląstelių skaičiui.

3.2.1. Citokinų TNF- α ir IL-6 poveikio miogeninių ląstelių gyvybingumui tyrimas

Literatūroje uždegiminiai citokinai (TNF- α bei IL-6) yra minimi kaip galimi apoptozės induktoriai (Afford ir kt., 1992; Van Antwerp ir kt., 1996). Šių citokinų sintezė yra indukuojama širdyje, įvykus miokardo infarktui bei vystantis uždegiminiam procesui, todėl jie dažnai naudojami kaip markeriai širdies pažeidimų diagnostikai. Šių citokinų kiekio padidėjimas taip pat buvo nustatytas, praėjus 24 val. po mioblastų transplantacijos į pelės širdį (Suzuki ir kt., 2004). Mes vertinome citokinų TNF- α ir IL-6 poveikį miogeninių ląstelių gyvybingumui. Gauti duomenys parodė, kad tiriami citokinai nepasižymi citotoksiniu poveikiu, o TNF- α netgi nežymiai stimuliuoja miogeninių ląstelių proliferaciją po trumpesnio poveikio. 3.5 paveiksle pateikiami duomenys, gauti tiriamas miogenines ląsteles paveikus didžiausiomis naudotomis citokinų koncentracijomis. Mažesnių koncentracijų poveikis niekuo nesiskyrė nuo pateiktų duomenų.



3.5 pav. Citokinai TNF- α ir IL-6 nepasižymi citotoksiniu veikimu.

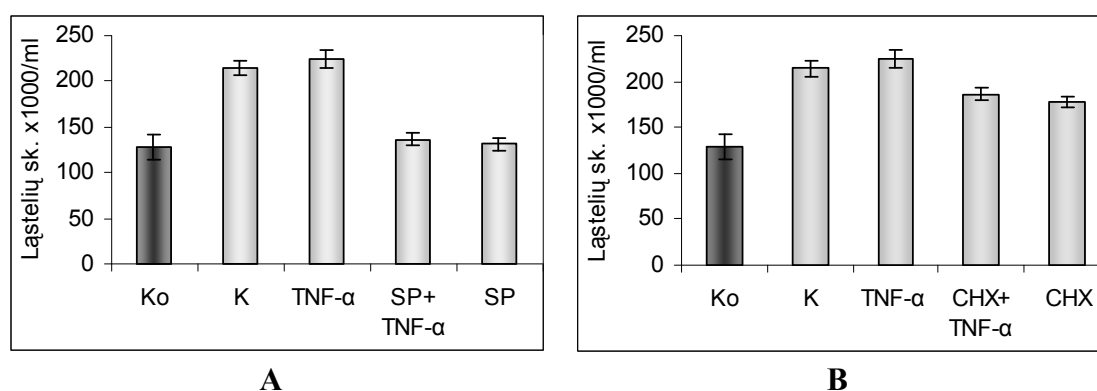
Ląstelių skaičiaus kitimas laike po TNF- α (150 ng/ml) bei IL-6 (300 VV/ml) poveikio įvertintas tripano mėlio testu ir išreikštas santykinu gyvybingumo (žr. 2.4 skyrių) vidurkiu \pm SN, apskaičiuotu iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų.

Stewart su kolegomis, tirdami TNF- α poveikį skeleto mioblastams C2, parodė, kad šis citokinas slopina diferenciaciją bei po ilgesnio poveikio sukelia apoptozę, tačiau trumpalaikis TNF- α veikimas skatina išgyvenimą bei proliferaciją, kuri priklauso nuo ilgalaikio JNK kinazės aktyvinimo. Šios MAP kinazės slopinimas ženkliai padidina tirtų ląstelių apoptozę (Stewart ir kt., 2003), todėl tolesnėje darbo dalyje, naudodami specifinę c-Jun N-galo kinazės (JNK) inhibitorių SP600125, nuslopinome šios MAP kinazės veikimą. Naudojome tokią inhibitoriaus SP600125 koncentraciją, kuri tiriamų ląstelių

žūties nesukėlė, tačiau stabdė jų dauginimąsi. Tai rodo, kad JNK reikalinga miogeninių ląstelių proliferacijai. Palyginę duomenis gautus, paveikus tiriamas ląsteles SP600125 ir TNF- α bei vienu SP2001625 veiktas ląsteles, negavome jokių ryškesnių miogeninių ląstelių gyvybingumo bei proliferacijos pokyčių (3.6 pav., A). Taigi, TNF- α neturi įtakos JNK sąlygojamai miogeninių ląstelių proliferacijai.

Žinoma, kad ląstelėse egzistuoja baltymai, apsaugantys jas nuo apoptozės induktorių poveikių, o kai kuriais atvejais ląstelių išgyvenimui po poveikių reikalinga naujų baltymų sintezė (Liu ir kt., 1994). Nustatyta, kad mažos TNF- α koncentracijos reikšmingai didina bendrą baltymų, tarp kurių galėtų būti ir apoptozės slopintojų, kiekį (El Naggar ir kt., 2004). Mes slopinome naujų baltymų sintezę, jos slopikliu – cikloheksimidu. Kadangi baltymų sintezės inhibitoriai patys sukelia apoptozę, mes parinkome tokią cikloheksimido koncentraciją, kuri tik slopino tiriamų ląstelių proliferaciją. Tačiau ir šiuo atveju miogeninių ląstelių jautrumas TNF- α nepadidėjo (3.6 pav., B).

Taigi, gauti rezultatai parodė, kad TNF- α ir IL-6 iš skeleto raumens gautų kamieninių linijų ląstelėse apoptozės neindukuoja.



3.6 pav. TNF- α poveikio miogeninėms ląstelėms tyrimas, nuslopinus JNK veikimą bei baltymų sintezę *de novo*. Gyvų ląstelių skaičiaus kitimas TNF- α (150 ng/ml) paveiktoje miogeninių ląstelių populiacijoje nuslopinus JNK (A) bei naujų baltymų sintezę (B) vertintas tripano mėlio testu (žr. 2.4 skyrių). JNK inhibitorius SP600125 (40 μ M) bei cikloheksimidas (1 μ g/ml) buvo pridedami 30 min. prieš TNF- α poveikį. K_o – ląstelių skaičius, nustatytas poveikio metu (24 val. po ląstelių išsėjimo). K – nepaveiktų ląstelių skaičius po 24 val. (48 val. po ląstelių išsėjimo). Tiriamomis medžiagomis ląstelės veiktos 24 val.

3.2.2. Genotoksinių/kardiotoksinių medžiagų sukeltos apoptozės žūties įvertinimas

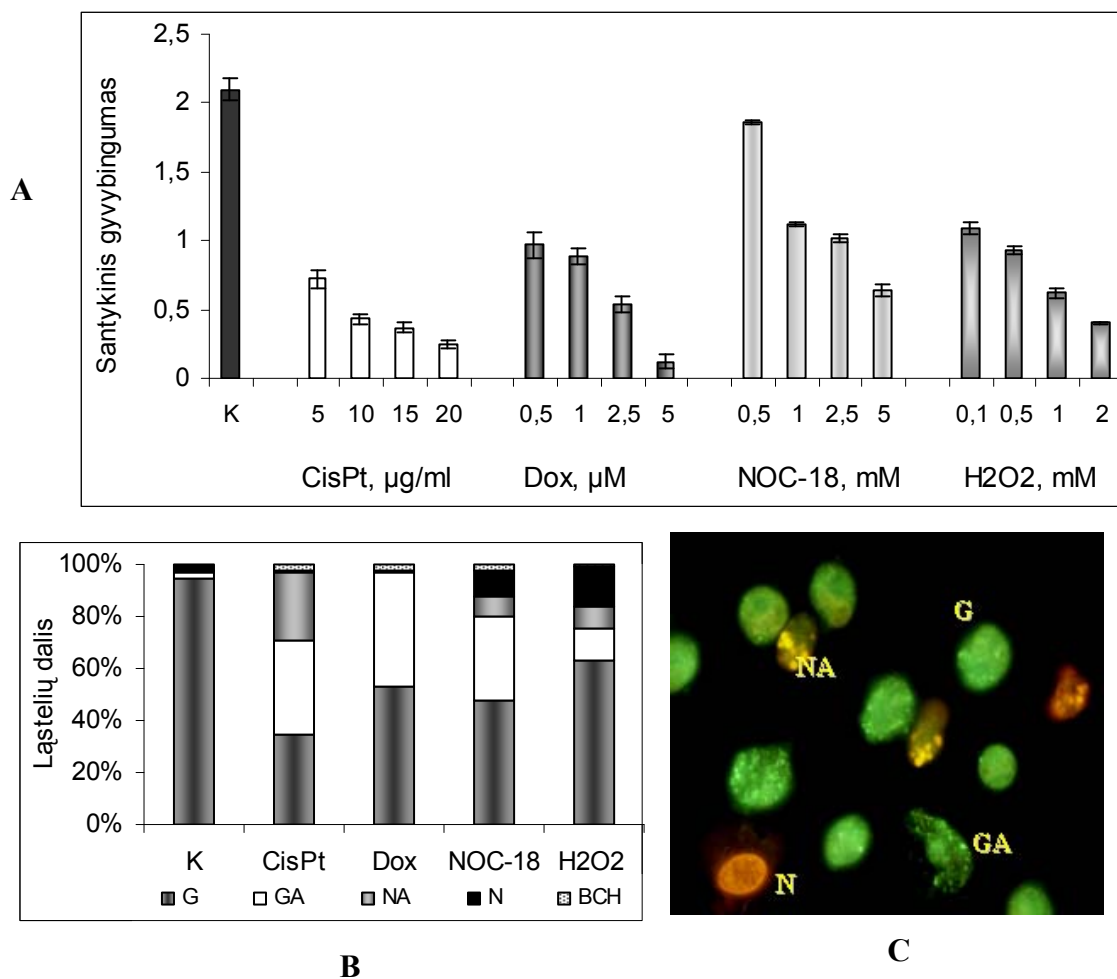
Kadangi didžioji dalis transplantuotų ląstelių žūva jau pirmosiomis 24 val. po jų persodinimo, todėl, siekdami įvertinti molekulinis mechanizmus, nulemiančius transplantuotų ląstelių žūtį, parinkome tokius apoptozės induktorių, kurių veikimas pasireiškia per 24 val. nuo poveikio pradžios. Taigi, tolesniame transplantacijai skirtų ląstelių žūties mechanizmų tyrimų etape tyrėme miogeninių ląstelių žūties pobūdį po kardiotoksiniu veikimu pasižyminčių chemoterapinių medžiagų – cisplatinos (CisPt) bei doksorubicino (DOX) (Kalyanaraman ir kt., 2002; Tassinari ir kt., 1997) bei patofiziologinių kardiotoksiškumą imituojančių medžiagų – azoto oksido donoro NOC-18 bei oksidacinį stresą sukeliančio vandenilio peroksido (H_2O_2) poveikių. H_2O_2 susidaro širdyje įvykus miokardo infarktui ir vystantis uždegiminiam procesui. Vienu iš H_2O_2 bei kitų reaktyvių deguonies formų šaltinių gali būti patys kardiomiocitai, pasižymintys didesniu mitochondrijų kiekiu (Suzuki ir kt., 2004). Tuo tarpu NO širdyje susidaro fiziologinėmis sąlygomis ir veikia kaip signalinė molekulė, reguliuojanti įvairius procesus – gali atpalaiduojančiai veikti kraujagysles, stimuliuoti širdies susitraukimus ir kt. Įvykus miokardo infarktui, prasideda uždegiminis procesas ir jo metu išsiskiria citokinai, skatinantys indukuojamos azoto oksido sintazės raišką (iNOS). Tada didesnės NO koncentracijos jau gali sąlygoti ląstelių žūtį (Pulkki, 1997). Visų šių medžiagų indukuotų pažeidimų suformuotas kryptingas signalinių molekulių moduliavimas ir lemia ląstelės žūtį.

Kadangi tiriamos medžiagos priklausomai nuo koncentracijos gali stabdyti proliferaciją, o taip pat indukuoti ląstelių žūtį, mes turėjome nustatyti ląstelių žūtį indukuojančias medžiagų koncentracijas. Tiriamas miogenines ląsteles veikėme įvairiomis šių agentų koncentracijomis: CisPt - 1, 10, 15, 20 $\mu\text{g/ml}$; DOX – 0.5, 1, 2.5, 5 μM ; NOC-18 – 0,5, 1, 2,5, 5 mM; H_2O_2 – 0,1, 0.5, 1, 2 mM. Po 24 val. nuo poveikio pradžios vertinome ląstelių kiekio kultūroje pasikeitimus. Gauti duomenys parodė, kad visos mūsų naudotos medžiagos pasižymėjo citotoksiniu poveikiu ir priklausomai nuo koncentracijos indukavo

miogeninių ląstelių žūtį (3.7 pav., A). 3.7 paveiksle, B dalyje pateikti duomenys rodo gyvų bei žuvusių ląstelių pasiskirstymą pagal skirtingą jų dažymąsi AO/EB, t. y., gyvų, gyvų-apoptozinių, nekrozinių, bei negyvų-apoptozinių ląstelių santykinį kiekį populiacijoje po poveikio tokiomis tiriamų medžiagų koncentracijomis, kurios sukėlė 40-60 % ląstelių žūtį. Rezultatai kiek variavo priklausomai nuo ląstelių linijos bei pačių ląstelių būklės – jų tankio poveikio metu, auginimo sąlygų ir pan. Tinkamiausios koncentracijų ribos CisPt buvo 10-15 $\mu\text{g/ml}$, DOX - 2.5-3 μM , NOC-18 – 5-6 mM bei H_2O_2 0.5-2 mM. 3.7 paveiksle, B dalyje parodėme, kad nemažą žuvusių miogeninių ląstelių dalį sudaro ląstelės, žuvusios apoptozės būdu. Nustatėme, kad CisPt indukuoja beveik išimtinai apoptozinę miogeninių ląstelių žūtį. Nekrozės būdu žuvusių ląstelių rasta tik apie 5 %, panašiai kaip ir kontrolinėje ląstelių populiacijoje, nors literatūroje yra duomenų ir apie CisPt indukuojamą nekrozinę ląstelių žūtį (Fuertesa ir kt., 2003).

Bandymais su mioblastais ir kitomis ląstelių linijomis nustatyta, kad dėl antraciklino antibiotiko – doksorubicino poveikio ląstelės žūva dvejopai: nekrozės ir apoptozės būdu. Tai priklauso nuo koncentracijos (Sawyer ir kt., 1999). Mūsų tyrimai parodė, kad naudotos DOX koncentracijos (0,5 - 5 μM) stabdė miogeninių ląstelių dauginimąsi: po 24 val. ląstelių populiacijoje, paveiktoje 2,5 μM doksorubicino, rasta du kartus mažiau ląstelių (lyginant su ląstelių skaičiumi medžiagos pridėjimo dieną). Įdomu tai, kad pakankama apoptozinių ląstelių frakcija kultūroje išlikdavo trumpai. Vėliau gana stipriai išaugdavo ląstelių, netekusių chromatino, dalis. 5 μM ir didesnėmis DOX koncentracijomis paveiktose ląstelių populiacijose jau vyravo nekrozinė ląstelių žūtis.

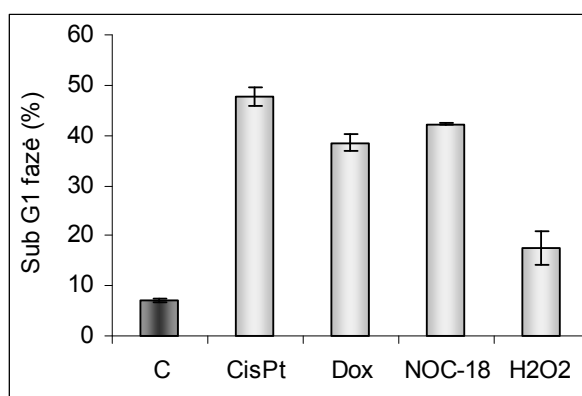
Literatūros duomenimis, patofiziologinį kardiotoksiškumą indukuojančių medžiagų – NO ir H_2O_2 , gebėjimas sukelti apoptozę labai priklauso nuo jų koncentracijos bei sukeliama viduląstelinė taikinių pažaidų (Hampton ir Orrenius, 1997, Pinsky ir kt., 1999). Mes nustatėme NOC-18 bei H_2O_2 koncentracijas, kurios gyvų ląstelių skaičių mažino 2 kartus, t.y., sukėlė apie 40-60 % ląstelių žūtį. Paveikus tokia NOC-18 koncentracija miogenines



3.7 pav. Kardiotoxinės medžiagos pasižymi citotoksiniu veikimu ir indukuoja miogeninių ląstelių žūtį. **A** – ląstelių skaičiaus kitimas po poveikio skirtingomis genotoksinių medžiagų koncentracijomis, įvertintas tripano mėlio testu ir išreikštas santykiniu gyvybingumu (žr. 2.4 skyrių); **B** - ląstelių pasiskirstymas kultūroje pagal nusidažymą AO/EB po 24 poveikio val. 10 µg/ml CisPt, 2.5 µM DOX; 5 mM NOC-18 bei 1 mM H₂O₂; **C** – Tipiniai ląstelių morfologijos pokyčiai, atsirandantys ląstelėms žūstant. Šiuo atveju, tiriamos ląstelės buvo 24 val. veiktos 10 µg/ml CisPt, dažytos AO/EB ir analizuotos fluorescentiniu mikroskopu. Čia: G – gyvos neapoptozinės; GA – gyvos apoptozinės; NA – negyvos apoptozinės, N – nekrozinės; BCH – netekusio chromotino ląstelės (žr. 2.13 skyrių).

ląsteles, rasta apie 10 % nekrozės būdu žuvusių ląstelių. Atitinkamai po 1 mM H₂O₂ poveikio (tai koncentracija, kuri gyvų ląstelių skaičių po 24 val. poveikio sumažino 2 kartus) rasta iki 20% apoptozinių ir 15% nekrozių ląstelių. Didinant H₂O₂ koncentraciją, nekrozių ląstelių kiekis populiacijoje augo. Taigi, H₂O₂ indukavo tiek apoptozinę, tiek ir nekrozinę ląstelių žūtį. Panaši dalis apoptozės būdu žuvusių ląstelių po H₂O₂ bei kitų tirtų medžiagų poveikių

buvo rasta apoptozės pasireiškimą įvertinus tėkmės citometrijos metodu (3.8 pav.).

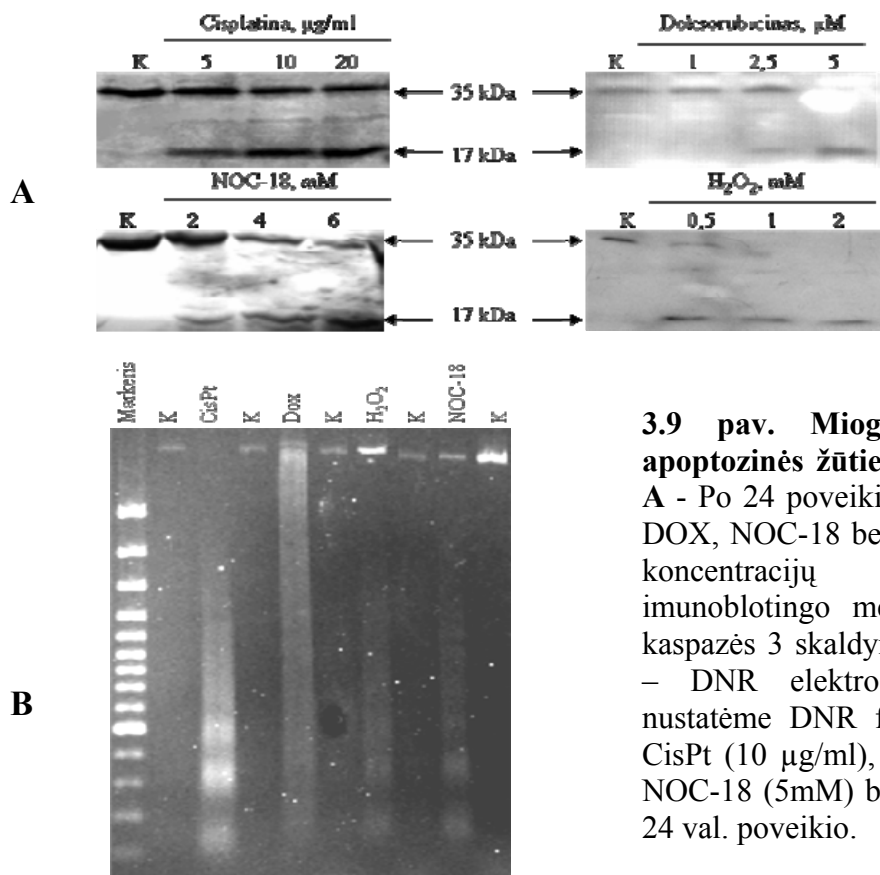


3.8 pav. Apoptozės pasireiškimo įvertinimas tėkmės citometrijos pagalba. Kontrolinių bei 10 µg/ml CisPt, 2.5 µM DOX, 5 mM NOC-18 ir 1 mM H₂O₂ 24 val. veiktų ląstelių apoptozė įvertinta kaip hipodiploidinis (SubG1) pikas.

Apoptozei nustatyti patariama vienu metu naudoti bent kelis metodus - vienu metodu gali būti registruojamos tik atskiros apoptozės savybės, kartais jos būna bendros tiek apoptozei, tiek nekrozei. Gerai yra derinti skirtingus metodus, leidžiančius nustatyti morfologinius bei biocheminius ląstelių pakitimus apoptozės metu.

Žinoma, kad apoptozinė ląstelių žūtis gali būti inicijuojama dviejų kelių - išorinio, nuo receptorių priklausomo, bei vidinio dalyvaujant mitochondrijoms. Abiem atvejais dalyvauja iniciatorinės kaspazės. Pirmu atveju - kaspazė 8, o antruoju - kaspazė 9, tačiau abiejų šių iniciatorinių kaspazių aktyvinimo keliai susitinka efektorinės kaspazės 3 aktyvinimo taške. Kaspazės ląstelėje yra saugomos neaktyvioje prokaspazių būsenoje, o aktyvinamos jas skaldant. Imunoblotingo metodu mes įvertinome ir nustatėme, kad visos tiriamos medžiagos, priklausomai nuo koncentracijos, po 24 poveikio valandų skaldo ir aktyvina kaspazę 3, taigi, indukuoja apoptozinę ląstelių žūtį (3.9 pav., A).

Vienas būdingiausių apoptozinės ląstelės žūties bruožų - endonukleazių sąlygojama internukleosominė DNR fragmentacija į maždaug 180 bp kartotinius fragmentus. Elektroforezės metodu analizuojant, gaunamas tipiškas



3.9 pav. Miogeninių ląstelių apoptozinės žūties patvirtinimas. A - Po 24 poveikio valandų CisPt, DOX, NOC-18 bei H₂O₂ skirtingų koncentracijų poveikio imunoblotingo metodu nustatėme kaspazės 3 skaldymą/aktyvaciją; B – DNR elektroforezės metodu nustatėme DNR fragmentaciją po CisPt (10 µg/ml), DOX (2,5 µM), NOC-18 (5mM) bei H₂O₂ (1 mM) 24 val. poveikio.

“DNR kopėčių” vaizdas. Mūsų gauti duomenys parodė, kad visos tiriamos medžiagos nulėmė charakteringą DNR fragmentaciją (3.9 pav. B).

Taigi, kardiotoksiniu veikimu pasižyminčios medžiagos - azoto oksido donoras NOC-18, vandenilio peroksidas, cisplatina bei doksorubicinas, stabdo raumeninės kilmės kamieninių ląstelių dauginimąsi ir, priklausomai nuo dozės, indukuoja apoptozinę jų žūtį, kuri pasireiškia apoptozei būdingais ląstelių morfologijos pakitimais, DNR fragmentacija bei kaspazės 3 skaldymu. Vėlesniuose signalinių molekulių veikimo mechanizmų tyrimuose buvo naudojamos kelios apoptozę indukuojančių medžiagų koncentracijos, tačiau atskaitos tašku buvo pasirinktos tos dozės, kurios sukeldavo 40-60 % tiriamų ląstelių žūtį po 24 val. poveikio.

3.3. Signalinių molekulių, dalyvaujančių raumeninės kilmės kamieninių ląstelių išgyvenimo/žūties procesuose, nustatymas

Ląstelės išgyvenimą ar žūtį reguliuoja įvairūs signaliniai keliai, iš kurių geriausiai ištirti yra mitogenų aktyvinamų proteinkinazių (MAPK) šeimos bei fosfatidilinozitol-3-kinazės/Akt keliai. MAP kinazių šeimai priklauso ekstraląstelinio signalo reguliuojamos kinazės 1/2 (ERK1/2), c-Jun N-galo kinazės 1/2 (JNK 1/2) ir p38 MAP kinazė. Jų aktyvinimas yra svarbus įvairių procesų, vykstančių širdyje, patogenezėje (Kang, 2001). MAPK signalinis kelias ir jo moduliacija gali skirtingai veikti širdies miogenines ląsteles įvairių terapijų metu.

Fosfatidilinozitol-3-kinazės/Akt signalinis kelias žinomas kaip ląstelių išgyvenimą sąlygojantis kelias. Akt aktyvinimas po išemijos veikia kaip apsauginis veiksnys, todėl ši kinazė gali būti svarbus taikynys širdies ligų gydyme (Shiraishi ir kt., 2002).

Šių kinazių raiškos ir aktyvinimo tyrimams mes pasirinkome tokias apoptozės induktorių (CisPt, DOX, NOC-18 bei H₂O₂) koncentracijas, kurios sukėlė 40-60% ląstelių žūtį praėjus 24 valandoms nuo poveikio pradžios. Ląstelės buvo veikiamos apoptozės induktoriais, ir signalinių molekulių raiškos bei aktyvinimo kinetika, buvo analizuojama praėjus parai nuo jų išsėjimo. Signalinių molekulių vaidmuo kamieninių ląstelių apoptozėje buvo tiriamas panaudojant biocheminius ir genetinius metodus. Molekulių aktyvinimas buvo tiriamas imunoblotingo metodu, panaudojant antikūnus prieš fosforilintas šių signalinių molekulių formas. Žinoma, kad daugumos signalinių molekulių aktyvumas koreliuoja su jų fosforilinimu. Siekiant nustatyti ERK, JNK, p38 MAPK bei PI3/Akt kinazių vaidmenį, jos buvo slopinamos specifiniais inhibitoriais. JNK slopinti buvo naudojamas SP600125, p38 MAPK – SB203580, Akt – LY294002, vortmaninas bei Akt inhibitorius VIII. ERK kinazės aktyvinimas buvo slopinamas netiesiogiai, o inhibavus MEK1/2, kurios fosforilina ir aktyvina ERK1/2. Šiuo atveju poveikis buvo registruojamas trimis metodais: dažant ląsteles kristalvioletu, kuris

nespecifiškai nudažo visus ląstelės baltymus (trūkumas – kai kuriais atvejais žuvusios ląstelės nedisocijuodavo nuo paviršiaus, ir tai iškreipdavo tyrimų rezultatus, o taip pat šis metodas netiko vertinti ląstelių gyvybingumui tais atvejais, kai analizuojamos medžiagos indukuodavo ląstelių hipertrofiją), MTT testu (trūkumas – rezultatai gali atspindėti ląstelių metabolinio aktyvumo pokyčius net ir nesikeičiant jų gyvybingumui) bei tripano mėliu, kuris atspindi ląstelių membranos vientisumą (Kueng ir kt., 1989; Pozzolini ir kt., 2003) (žr. 2.4-2.6 skyrius). Visais atvejais eksperimentai pakartoti mažiausiai tris kartus. Gauti duomenys palyginti keliose miogeninių linijų ląstelėse. Tyrimams naudotos tokios inhibitorių koncentracijos, kurios nesukėlė tiriamų ląstelių žūtis.

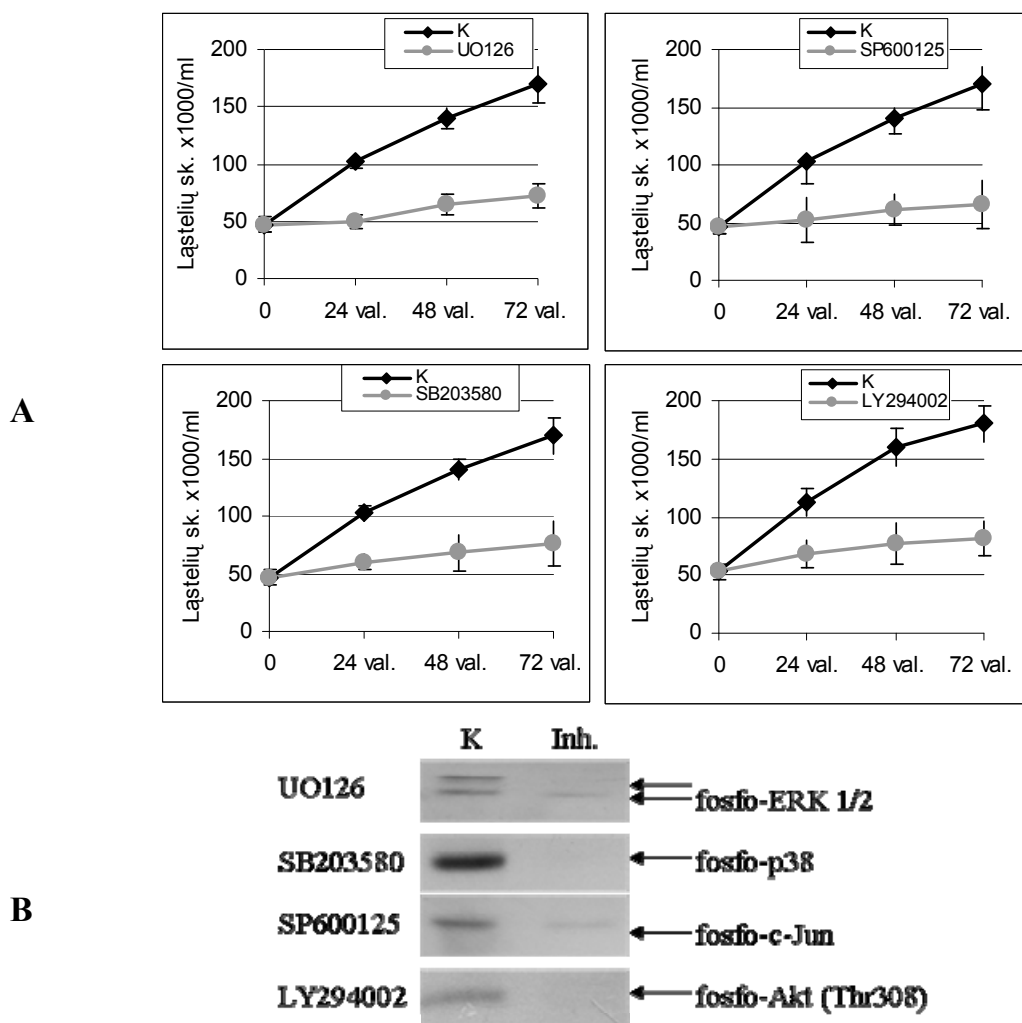
Transkripcijos faktoriaus c-Jun bei Akt kinazės vaidmens tyrimuose buvo naudojami ir genetiniai metodai įvedant į ląsteles egzogenines šių baltymų genų sekas.

3.3.1. MAPK bei Akt kinazės vaidmuo miogeninių ląstelių proliferacijoje

ERK MAP kinazės bei Akt kinazės vaidmuo ląstelių proliferacijoje yra gerai žinomas bei siejamas su teigiamų ląstelės ciklo reguliatorių stimuliacija ir antiproliferacinių genų slopinimu. Žinoma, kad ERK skatina proliferaciją, stimuliuodama ciklino D1 raišką, o ilgalaikis ERK1/2 aktyvinimas yra reikalingas ląstelių perėjimui iš G1 į S ciklo fazę (Meloche ir Pouyssegur, 2007). Akt kinazė, kaip ir ERK, gali reguliuoti ląstelių proliferaciją veikdama ciklino D raišką bei slopindama Cdk (nuo ciklinų priklausoma kinazė) inhibitorių - p21 bei p27 veikimą (Lawlor ir Alessi, 2001). Streso aktyvinamos MAP kinazės – JNK ir p38, dažniau siejamos su apoptozės reguliacija, tačiau jų vaidmuo ląstelių proliferacijoje taip pat yra žinomas. Nustatyta, kad p38 MAPK yra svarbi ląstelės ciklo reguliacijai G1 bei G2/M stadijose (Zarubin ir Han, 2005). Be to, ši kinazė reikalinga UV sukeltam ląstelės ciklo stabdymui G2 stadijoje (Wang ir kt., 2000b). Yra duomenų, kad JNK reikalinga streso neveikiamų ląstelių augimui bei proliferacijai (Du ir kt., 2004). Kiti šaltiniai

teigia, kad tik aktyvinta JNK dalyvauja proliferacijos skatinime, ir šis aktyvinimas nėra susijęs su apoptozės stimuliacija (Smith ir kt., 1997). JNK vaidmuo ląstelių proliferacijoje nėra aiškus, bet, manoma, kad šios kinazės slopinimas yra susijęs su ląstelės ciklo stabdymu S ir G2/M stadijose.

ERK, p38, JNK bei Akt vaidmenį pirminių miogeninių ląstelių proliferacijoje tyrėme naudodami šių kinazių inhibitorius. ERK kinazei slopinti buvo naudojamas MEK1/2 inhibitorius U0126, p38 MAP kinazei – SB203580, JNK – SP600125, o Akt kinazės aktyvumas buvo mažinamas naudojant inhibitorių LY294002. 3.10 paveiksle, A dalyje pateikti duomenys rodo



3.10 pav. MAPK bei Akt kinazės yra reikalingos pirminių miogeninių ląstelių proliferacijai. A – Kontrolinių bei U0126 (20 μ M), SB203580 (20 μ M), SP600125 (40 μ M) ir Ly294002 (20 μ M) paveiktų ląstelių skaičiaus kitimas laike. Ląstelių skaičiaus didėjimas vertintas tripano mėlio testu (žr. 2.4 skyrių), atlikus mažiausiai tris nepriklausomus ekperimentus. **B** – U0126, SB203580, SP600125 bei LY294002 inhibitorių veikimas buvo patvirtintas imunoblotingo metodu, naudojant antikūnus prieš fosfo-ERK, fosfo-p38, fosfo-c-Jun bei fosfo-Akt baltymus.

ženkliai susilpnėjusį miogeninių ląstelių dauginimąsi po visų tirtų inhibitorių poveikių. U0126, SB203580, SP600125 bei LY294002 veikimas buvo patvirtintas imunoblotingo metodu. Nustatyta, kad U0126 slopino ERK1/2 fosforilinimą, SB203580 – p38, SP600125 – c-Jun, o LY294002 - Akt (3.10 pav., B). Tyrimuose naudotos inhibitorių koncentracijos miogeninių ląstelių žūtis nesukėlė.

Taigi, ERK, p38, JNK MAP kinazės ir Akt kinazė yra svarbios pirminių miogeninių ląstelių proliferacijai.

3.3.2. MAP kinazės ERK vaidmuo miogeninių ląstelių apoptozės reguliacijoje

Žinoma, kad ERK signalinio kelio aktyvinimas pasižymi kardiomiocitus apsaugančiu veikimu, yra svarbus ląstelių dalijimuisi, migracijai, ląstelės skeleto reorganizacijai, diferenciacijai, o taip pat gali dalyvauti atsake į stresą bei reguliuoti jo sukeltą ląstelių žūtį (Gustafsson ir Gotlieb, 2003; Ravingerová ir kt., 2003; Werlen ir kt., 2003).

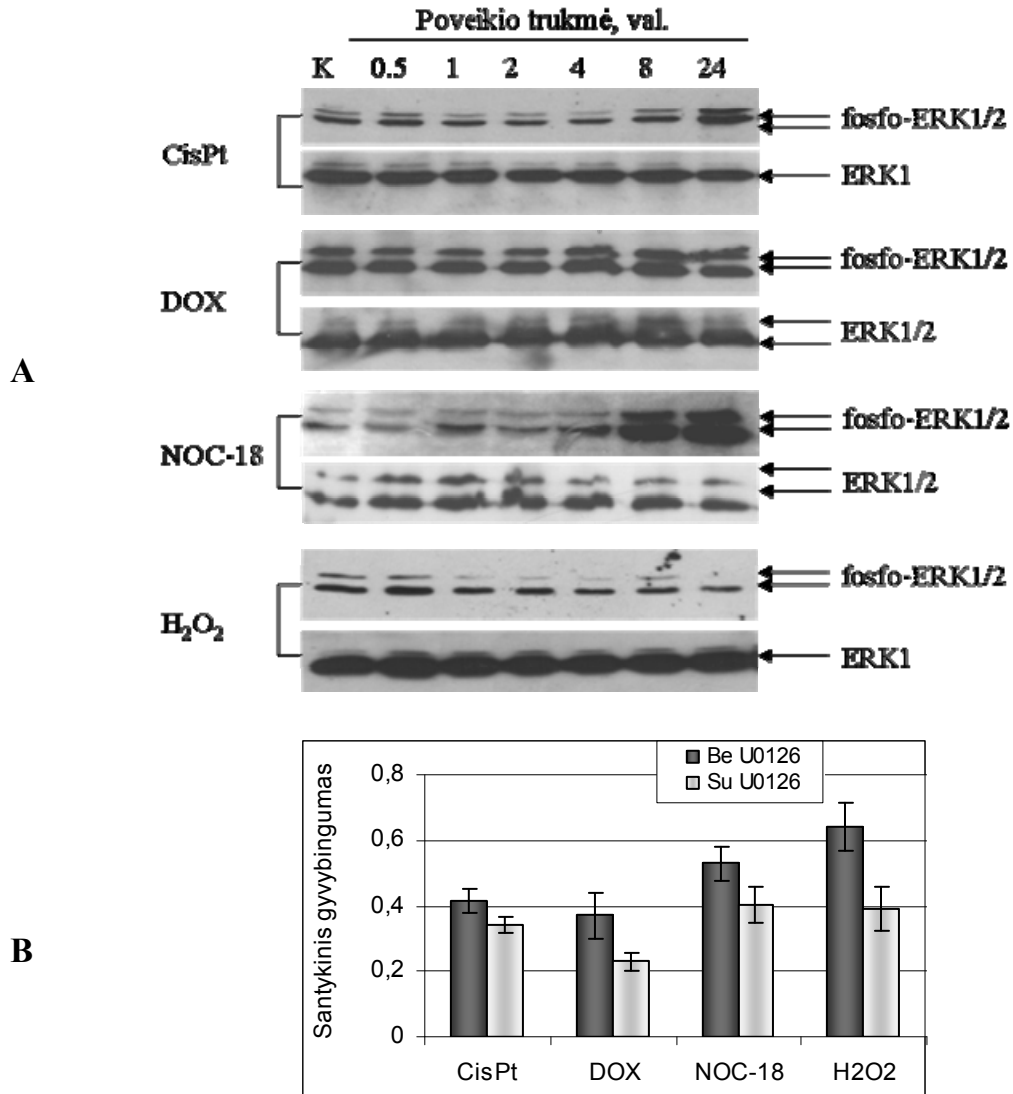
3.11 paveiksle, A dalyje pateikti duomenys apie ERK MAP kinazės raiškos ir fosforilinimo kitimą miogeninių ląstelių apoptozės metu po genotoksinių medžiagų (CisPt ir DOX) bei patofiziologinių kardiotoksiškumą imituojančių medžiagų (NO donoro - NOC-18 ir H₂O₂) poveikio. Mūsų gauti rezultatai rodo, kad ERK MAP kinazių raiška dėl apoptozės induktorių poveikio nekito. Taip pat ženkliai nesikeitė ERK fosforilinimo lygis po CisPt, DOX ir H₂O₂ poveikio, tiksliai po ilgesnio NOC-18 veikimo buvo nustatytas vėlyvas, 8 val. nuo poveikio pradžios, ir ilgalaikis, iki 24 tyrimo valandos trunkantis, šios kinazės fosforilinimo/aktyvinimo padidėjimas. Reikia pažymėti, kad mūsų tiriamos ląstelės ir kontrolėje (be poveikio) turėjo pastoviai fosforilintą ERK. Siekdami įvertinti ERK kinazės vaidmenį šių medžiagų indukuojamame apoptozės procese, mes netiesiogiai slopinome ERK kinazės aktyvinimą, inhibuodami MEK1/2, kuri fosforilina ir aktyvina ERK1/2. Gauti duomenys parodė, kad ERK signalinio kelio kinazės slopinimas

MEK1/2 inhibitoriumi U0126 neigiamai veikia miogeninių ląstelių gyvybingumą po visų tirtų medžiagų poveikių (3.11 pav., B). Taigi, ERK kinazė dalyvauja apsaugant griaučių raumens kamieninių linijų ląsteles nuo genotoksinių bei patofiziologinių kardiotoksiškumą indukuojančių medžiagų sukeltos ląstelių žūties.

Literatūroje yra daug duomenų apie apsauginį ERK MAP kinazės vaidmenį įvairių stresų metu. Nustatyta, kad ilgalaikis ERK aktyvinimas koreliuoja su apoptozės slopinimu (Xia ir kt., 1995). Analogiškus duomenis mes gavome po NO donoro NOC-18 poveikio. Azoto oksido vaidmuo širdyje yra gana prieštaringas. Nustatyta, kad jis, priklausomai nuo koncentracijos, gali apsaugoti kardiomiocitus nuo apoptozinės žūties dėl ERK aktyvinimo (Li ir kt., 2006). Kai kuriose ląstelėse ERK gali skatinti vandenilio peroksido sukeltą apoptozę slopindama PI3K/Akt kelią bei aktyvindama kaspazę 3 (Zhuang ir kt., 2007). Choi su kolegomis nustatė, kad DOX indukuoja ankstyvą ir ilgalaikį ERK aktyvinimą, kuris reikalingas antiapoptoziniam šios kinazės vaidmeniui hepatomos ląstelėse (Choi ir kt., 2008).

Mūsų tiriamoje sistemoje ryškesnis ERK aktyvinimas po apoptozės induktorių CisPt bei DOX poveikio registruotas nebuvo, tačiau galbūt apsauginiam ERK vaidmeniui pakanka bazinio ERK aktyvinimo/fosforilavimo lygio, kuris buvo nustatytas visais tirtais atvejais. Yra parodyta, kad apsauginis ERK vaidmuo miocituose koreliuoja su kitų signalinių molekulių - PKC- ϵ ar Akt aktyvinimu (Zhou ir kt., 2002). Pastarosios kinazės vaidmuo triušio miogeninių ląstelių apoptozės reguliacijoje po CisPt, DOX, NOC-18 bei H₂O₂ bus nagrinėjamas šiame darbe kiek vėliau.

Taigi, mūsų rezultatai parodė, kad ERK signalinis kelias gali apsaugoti raumeninės kilmės kamienines ląsteles nuo įvairių apoptozės induktorių poveikio. ERK signalinio kelio aktyvintojai galėtų būti naudojami ląstelių transplantacijos metu, siekiant apsaugoti ląsteles nuo toksinių poveikių transplantacijos vietoje.



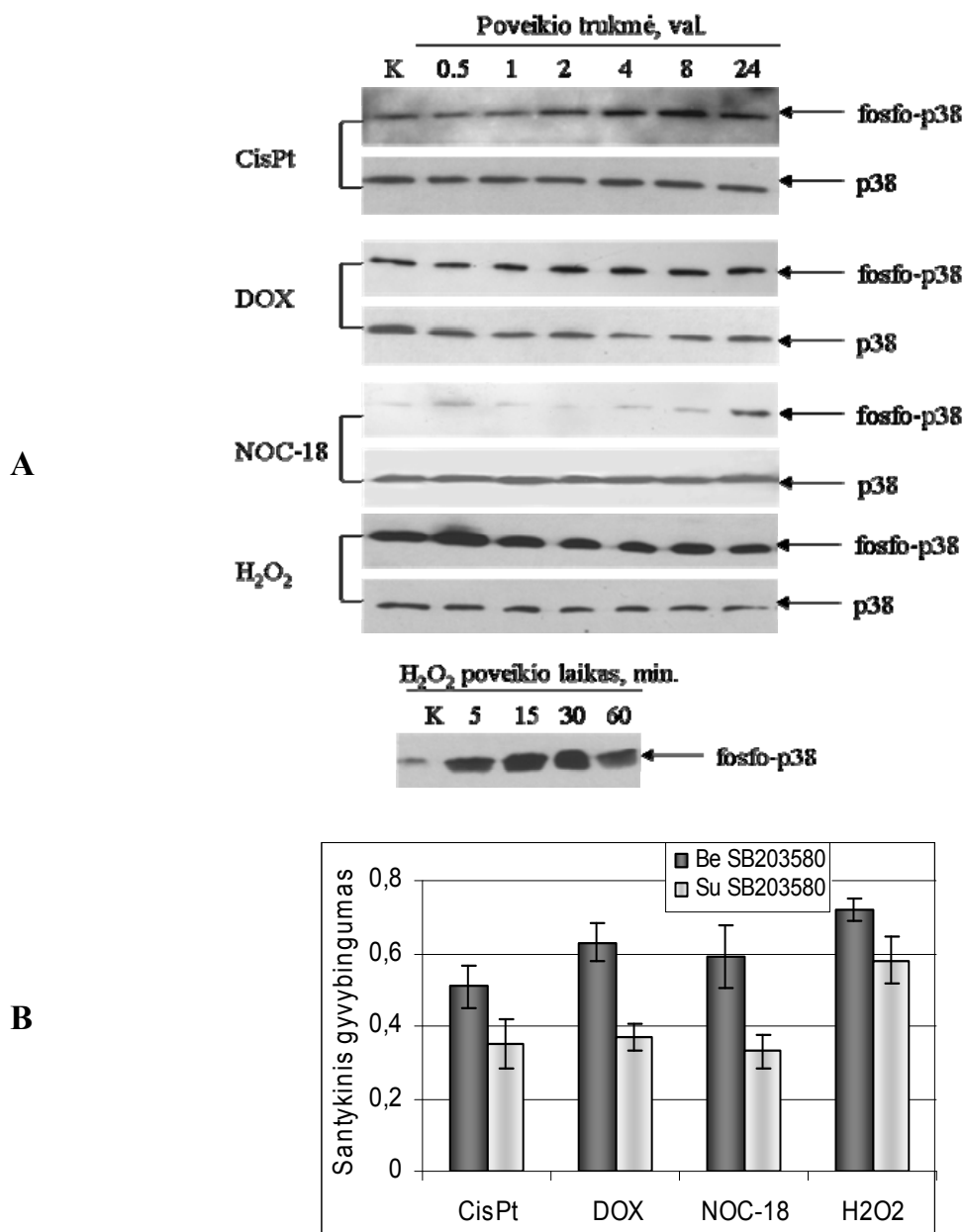
3.11 pav. MAP kinazės ERK vaidmuo kamieninėse miogeninėse ląstelėse po apoptozę indukuojančių poveikių. **A** - MAP kinazės ERK raiškos ir fosforilinimo kitimas kamieninėse miogeninėse ląstelėse po CisPt (10 $\mu\text{g/ml}$), DOX (2.5 μM), NOC-18 (5 mM) bei H_2O_2 (1mM) poveikio nustatytas imunoblotingo metodu. Pateiktas tipinis vaizdas, gautas atlikus mažiausiai tris nepriklausomus eksperimentus. **B** – MEK1/2 kinazės inhibitoriaūs U0126 įtaka miogeninių ląstelių gyvybingumui po kardiotoksinių medžiagų – CisPt, DOX, NOC-18 bei H_2O_2 , poveikio buvo vertinta MTT metodu, gauti duomenys išreikšti santykinio gyvybingumo (žr. 2.4 ir 2.5 skyrius) vidurkiu \pm SN, apskaičiuotu iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų. $P < 0.02$ (CisPt atveju) ir $P < 0.05$ (kitais atvejais). UO126 (20 μM) inhibitoriumi ląstelės veiktos 30 min. prieš pridedant apoptozės induktorius.

3.3.3. p38 MAP kinazės vaidmuo miogeninių ląstelių apoptozės reguliacijoje

Literatūroje randama duomenų tiek apie proapoptozinį, tiek ir apie antiapoptozinį p38 MAP kinazės veikimą. Tai priklauso nuo įvairių faktorių: ląstelės rūšies, poveikio stiprumo, trukmės bei prigimties. Nustatyta, kad padidėjusi MKK6, kuri aktyvina p38 MAP kinazę, raiška apsaugo kardiomiocitus nuo apoptozės indukuojamos per β -adrenerginius receptorius, o ankstyvas p38 kinazės fosforilinimas apsaugo kai kurias ląsteles nuo TNF- α sukeltos apoptozinės jų žūties (Lenassi ir Plemenitaš, 2006; Zechner ir kt., 1998). Tačiau yra žymiai daugiau duomenų, įrodančių p38 MAP kinazės dalyvavimą apoptozės indukcijoje. Pavyzdžiui, ši MAP kinazė svarbi neuronų bei širdies ląstelių apoptozės aktyvinimui (DeZutter ir Davis, 2001; Saurin ir kt., 2000). p38 MAP kinazę gali aktyvinti ir RDD (Lenassi ir Plemenitaš, 2006).

Mes analizavome šios kinazės raišką bei fosforilinimą po CisPt, DOX, NOC-18 bei H₂O₂ poveikio. Gauti duomenys neparodė ryškesnių p38 MAP kinazės raiškos pokyčių po tirtų medžiagų poveikių. Analizuodami šios kinazės aktyvinimą, nustatėme neryškų vėlyvą ir ilgalaikį fosfo-p38 baltymo lygio padidėjimą po CisPt bei azoto oksido donoro NOC-18 poveikio, tuo tarpu DOX neįtakojė šios kinazės fosforilinimo/aktyvinimo. Tirdami oksidacinį stresą imituojančio H₂O₂ įtaką, gavome trumpalaikį, 1-2 val. trunkantį, tiriamos kinazės aktyvinimą. Detalesni tyrimai parodė, kad p38 fosforilinimas/aktyvacija išryškėja jau po 5 min. H₂O₂ poveikio, aukščiausią lygį pasiekdamas 15-30 poveikio minutę, o vėliau mažėja iki kontrolinio lygio (3.12 pav., A).

Paprastai trumpalaikis streso aktyvinamų MAPK aktyvinimas yra siejamas su apsauginiu antiapoptoziniu jų vaidmeniu, o ilgalaikis – lemia apoptozės indukciją. Tam, kad įvertintume biologinį p38 MAPK vaidmenį kardiotoksinių poveikių metu, naudojome specifinį šios kinazės inhibitorių SB203580. Nustatėme, kad tiek ilgalaikio, tiek trumpalaikio p38 MAP kinazės aktyvinimo atvejais tiriamose miogeninėse ląstelėse p38 inhibitorius



3.12 pav. MAP kinazės p38 vaidmuo kamieninėse miogeninėse ląstelėse po apoptozę indukuojančių poveikių. **A** - p38 MAP kinazės raiškos ir fosforilavimo kitimas kamieninėse miogeninėse ląstelėse po CisPt (10 $\mu\text{g/ml}$), DOX (2.5 μM), NOC-18 (5 mM) bei H_2O_2 (1mM) poveikio nustatytas imunoblotingo metodu. Pateiktas tipinis vaizdas, gautas atlikus mažiausiai tris nepriklausomus eksperimentus. **B** – p38 kinazės inhibitoriaus SB203580 įtaka miogeninių ląstelių gyvybingumui po kardiotoksinių medžiagų – CisPt, DOX, NOC-18 bei H_2O_2 , poveikio buvo vertinta MTT metodu, gauti duomenys išreikšti santykinio gyvybingumo (žr. 2.4 ir 2.5 skyrius) vidurkiu \pm SN, apskaičiuotu iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų, $P < 0.05$. SB203580 (20 μM) inhibitoriumi ląstelės veiktos 30 min. prieš pridendant apoptozės induktorius.

SB203580 didino ląstelių žūtį po tirtų medžiagų poveikio. 3.12 paveiksle, B dalyje pateikti duomenys rodo, p38 kinazės slopinimas jos inhibitoriumi padidino miogeninių ląstelių jautrumą CisPt, DOX, NOC-18 bei H₂O₂. Tai rodo apsauginį p38 vaidmenį miogeninių ląstelių apoptozės reguliacijoje. Be to, p38 kinazės atveju, taip pat kaip ir ERK, yra registruojama bazinė šios kinazės aktyvacija, kurios, matyt, pakanka miogenines ląsteles apsaugoti nuo kardiotoksinių medžiagų indukuojamos ląstelių žūties. Kitų autorių duomenimis, tiriant p38 vaidmenį širdies kardiomiocituose po NO poveikio nenustatyta jokių pasikeitimų nei šios kinazės aktyvinimo kinetikoje, nei apoptozės indukcijoje (Andreka ir kt., 2001; Davis, 2000). Taigi, p38 MAPK vaidmuo apoptozės reguliacijoje, priklausomai nuo ląstelių rūšies, gali skirtis.

Kaip ir ERK atveju, p38 MAPK signalinis kelias dalyvauja apsaugant miogeninės ląsteles nuo tirtų kardiotoksinių medžiagų poveikio ir yra reikalingas ląstelių dauginimuisi. ERK ir p38 MAP kinazių aktyvinimo strategijos galėtų būti naudojamos ląstelių transplantacijos metu, siekiant pagerinti jų regeneracinį potencialą.

3.3.4. JNK signalinio kelio vaidmuo miogeninių ląstelių apoptozės reguliacijoje

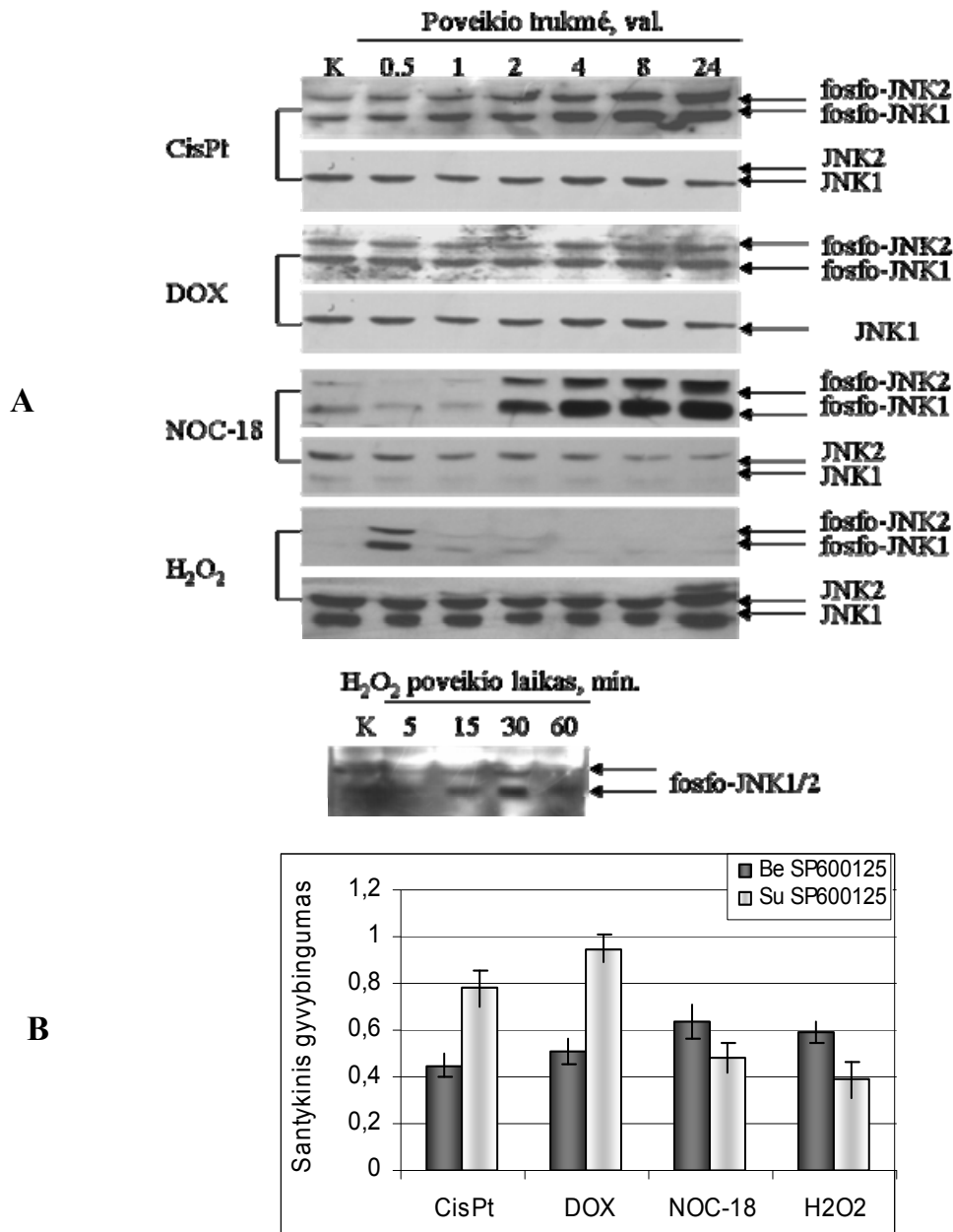
3.3.4.1. c-Jun N-galo kinazės vaidmuo

c-jun N-galo kinazė yra aktyvinama ląstelei atsakant į įvairius stresinius poveikius (UV, oksidacinį stresą, uždegiminius citokinus), todėl dar žinoma kaip streso aktyvinama proteinkinazė (SAKP). SAKP kinazėms priskiriama ir p38 MAP kinazė, kurios vaidmenį miogeninių ląstelių apoptozės reguliacijoje jau aptarėme. Literatūroje JNK vaidmuo dažniausiai siejamas su jos dalyvavimu apoptozės indukcijoje, bet galimas ir apsauginis šios MAPK vaidmuo. Širdyje JNK aktyvacija išemijos metu lemia kardiomiocitų žūtį, kuri siejama su JNK sąlygojamu cit c išlaisvinamu iš mitochondrijų bei kaspazės 9 aktyvacija (Aoki ir kt., 2002; Engelbrecht ir kt., 2004; Qin ir kt., 2003). Paprastai JNK vaidmuo priklauso nuo jos bei žemiau esančių taikinių fosforilavimo/aktyvinimo trukmės, o taip pat nuo poveikio prigimties bei

ląstelių rūšies. Remiantis literatūros duomenimis ilgalaikis JNK, o taip pat ir p38, MAP kinazių aktyvinimas yra siejamas su apoptozės iniciacija ir vystymusi (Mansouri ir kt., 2003; Lou ir kt., 2005; Tobiume ir kt., 2001). Yra žinoma ir apie JNK dalyvavimą apsaugant kardiomiocitus nuo NO indukuojamos ląstelių žūties. Nustatyta, kad ši JNK vaidmenį lemia trumpalaikė jos aktyvacija (Andreka ir kt., 2001).

Mes analizavome JNK raišką ir jos fosforilinimą/aktyvinimą skeleto miogeninėse ląstelėse po kardiotoksinių medžiagų poveikio. Gauti rezultatai parodė ženklų vėlyvą ir ilgalaikį JNK kinazės aktyvinimą po CisPt, DOX bei NOC-18 poveikių, o oksidacinį stresą indukuojantis H_2O_2 skatino staigų trumpalaikį JNK aktyvinimą (3.13 pav., A). Tą patvirtino ir detalesnis JNK aktyvinimo tyrimas po H_2O_2 poveikio (3.13 pav., A, apačioje). JNK raiška po minėtų poveikių nesikeitė. Siekdami įvertinti šios kinazės vaidmenį iš griaučių raumens gautų miogeninių ląstelių apoptozės indukcijoje, panaudojome specifinį šios kinazės inhibitorių SP600125. Anksčiau mūsų pateikti duomenys apie JNK taikinio - c-Jun, fosforilinimo sumažėjimą po SP600125 (40 μ M) poveikio rodo, kad šis inhibitorius slopina JNK aktyvumą (3.10 pav.). Mūsų gauti rezultatai parodė, kad chemoterapinių/genotoksinių medžiagų CisPt ir DOX indukuojamas vėlyvas ilgalaikis JNK fosforilinimas/aktyvinimas koreliuoja su miogeninių ląstelių žūtimi apoptozės būdu. Nuslopinus JNK veikimą, rasta daugiau gyvų ląstelių po CisPt bei DOX poveikių. Vadinasi, JNK kinazė yra reikalinga chemoterapinių medžiagų CisPt ir DOX sąlygojamai apoptozei, t.y., JNK, šiuo atveju, pasižymi proapoptoziniu veikimu. Patofiziologinių apoptozės induktorių atveju stebėjome apsauginį JNK kinazės veikimą (3.13 pav., B). Nuslopinę JNK aktyvumą ir miogeninės ląstelės paveikę patofiziologinį kardiotoksiškumą indukuojančiomis medžiagomis NOC-18 ir H_2O_2 , po 24 jų poveikio valandų radome mažiau gyvų ląstelių. Kaip buvo minėta anksčiau, šiomis sąlygomis pats inhibitorius ląstelių žūties nesukėlė. Taigi, JNK dalyvauja apsaugant tiriamas ląsteles nuo NOC-18 bei H_2O_2 indukuojamos žūties. Manoma, kad trumpalaikė JNK

aktyvacijos banga, kurią mes nustatėme ir mūsų ląstelėse po H₂O₂ poveikio, atideda



3.13 pav. JNK MAP kinazės vaidmuo kamieninėse miogeninėse ląstelėse po apoptozę indukuojančių poveikių. **A** - JNK raiškos ir fosforilavimo kitimas kamieninėse miogeninėse ląstelėse po CisPt (10 μg/ml), DOX (2.5 μM), NOC-18 (5 mM) bei H₂O₂ (1mM) poveikio nustatytas imunoblotingo metodu. Pateiktas tipinis vaizdas, gautas atlikus mažiausiai tris nepriklausomus eksperimentus. **B** – JNK kinazės inhibitoriaus SP600125 įtaka miogeninių ląstelių gyvybingumui po kardiotoksinių medžiagų – CisPt, DOX, NOC-18 bei H₂O₂, poveikio buvo vertinta MTT metodu, gauti duomenys išreikšti santykinio gyvybingumo (žr. 2.4 ir 2.5 skyrius) vidurkiu ± SN, apskaičiuotu iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų, P<0.05. SP600125 (40 μM) inhibitoriumi ląstelės veiktos 30 min. prieš pridėdant apoptozės induktorius.

kaspazių nulemtą DNR fragmentaciją (Andreka ir kt., 2004). Tačiau mūsų duomenys apie ilgalaikį NOC-18 indukuotą JNK aktyvinimą ir apsauginį šios kinazės vaidmenį kamieninėse miogeninėse ląstelėse, gautose iš triušio griaučių raumens, prieštarauja kitų autorių paskelbtiems rezultatams. Dauguma jų nurodo, kad ilgalaikis streso kinazių aktyvinimas yra susijęs su jų proapoptoziniu veikimu ir, atvirkščiai, trumpalaikis atlieka apsauginį vaidmenį. Pavyzdžiui, trumpalaikis JNK aktyvinimas apsaugo žiurkės kardiomiocitus nuo apoptozinės jų žūties (Andreka ir kt., 2001). Tačiau yra darbų, rodančių, kad būtent trumpalaikis JNK aktyvinimas po NO donoro SNAP poveikio lemia žiurkių kardiomiocitų apoptozę (Taimor ir kt., 2001).

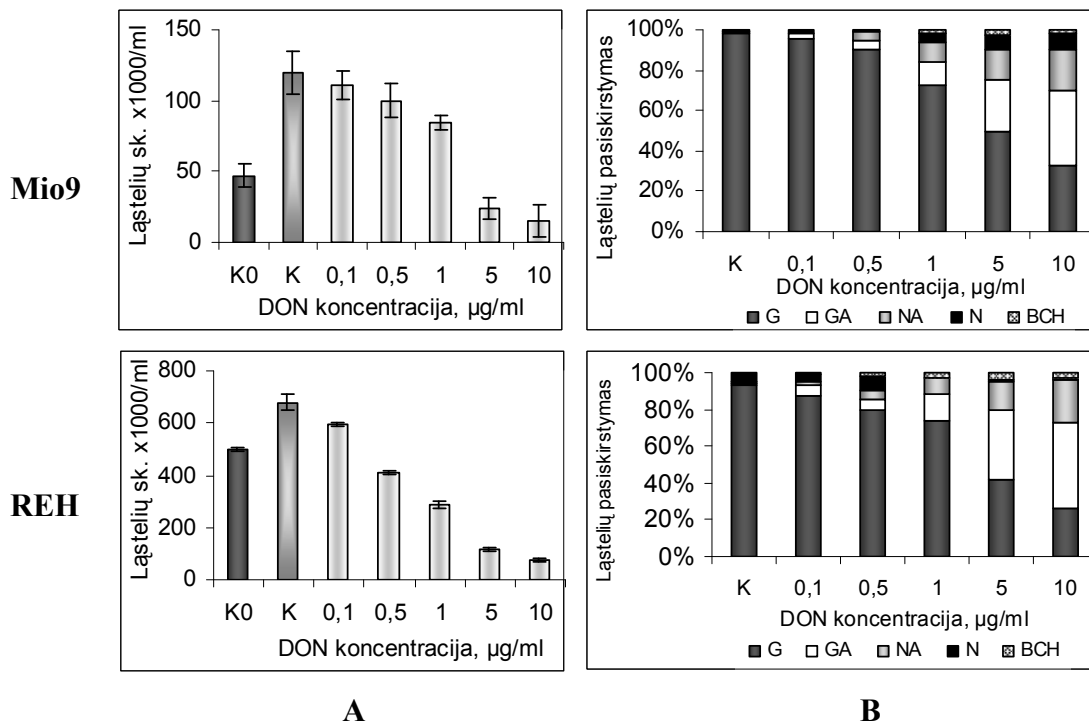
3.3.4.2. JNK kinazės aktyvinimo trukmės vaidmens tyrimas miogeninių ir vėžinių ląstelių apoptozės indukcijoje

Kaip minėjome anksčiau, ilgalaikis JNK, kaip ir p38 MAPK, aktyvinimas yra siejamas su apoptozės indukcija, o trumpalaikis – apsprendžia ląstelių išgyvenimą po toksinių poveikių (Chen ir kt., 1996; Hu ir kt., 1999). Manoma, kad trumpo šios kinazės aktyvinimo nepakanka inicijuoti ląstelių žūtį apoptozės būdu apsprendžiančių procesų aktyvinimui (Mansouri ir kt., 2003). Tačiau tai gali priklausyti nuo ląstelių rūšies, nes kiti autoriai nurodo, jog būtent trumpalaikis JNK aktyvinimas sąlygoja ląstelių apoptozę (Taimor ir kt., 2001). Prieš tai mūsų pateikti duomenys rodo, kad JNK aktyvinamas ir jos vaidmuo taip pat gali priklausyti ir nuo poveikio prigimties.

Siekdami įvertinti JNK aktyvinimo trukmės ir jos vaidmens apoptozėje priklausomybę nuo ląstelių rūšies bei apoptozės induktoriaus, pasirinkome kitą modelinę sistemą: lyginome JNK kinazės vaidmenį miogeninių bei navikinių ląstelių apoptozinės žūties iniciacijoje po to paties induktoriaus poveikio. Tyrimams naudojome kraujo kilmės REH (B-leukemijos) ir Jurkat (T-leukemijos) ląsteles, o apoptozės induktoriumi buvo pasirinktas *Fusarium* genties mikromicetų produkuojamas mikotoksinas deksinivalenolis (DON). Mes esame parodę, kad mikotoksinais yra efektyvūs leukeminių ir kitų

ląstelių apoptozės induktoriai (Baltriukienė ir kt., 2007). Literatūroje yra duomenų, kad trichotecenai, kuriems priskiriamas ir DON, gali aktyvinti MAP kinazes bei dalyvauti apoptozės indukcijoje (Zhou ir kt., 2005).

Pradžioje tiriamų linijų ląsteles paveikėme didėjančiomis šio mikotoksino koncentracijomis ir nustatėme, kad DON priklausomai nuo koncentracijos stabdo ląstelių proliferaciją bei sukelia apoptozinę žūtį. 3.14 paveiksle, A ir B dalyse pateikiamas Mio9 ir REH ląstelių skaičiaus ir gyvybingumo kitimas po įvairių DON koncentracijų 24 val. poveikio. Įdomu tai, kad Mio9 ląstelių jautrumas šiam mikotoksinui yra gana panašus į leukeminės REH linijos ląstelių jautrumą. Mes esame nustatę, kad kitos adhezinės navikinės ląstelės (MH-22a, BHK21) yra gana atsparios DON poveikiui (Baltriukiene ir kt., 2007).

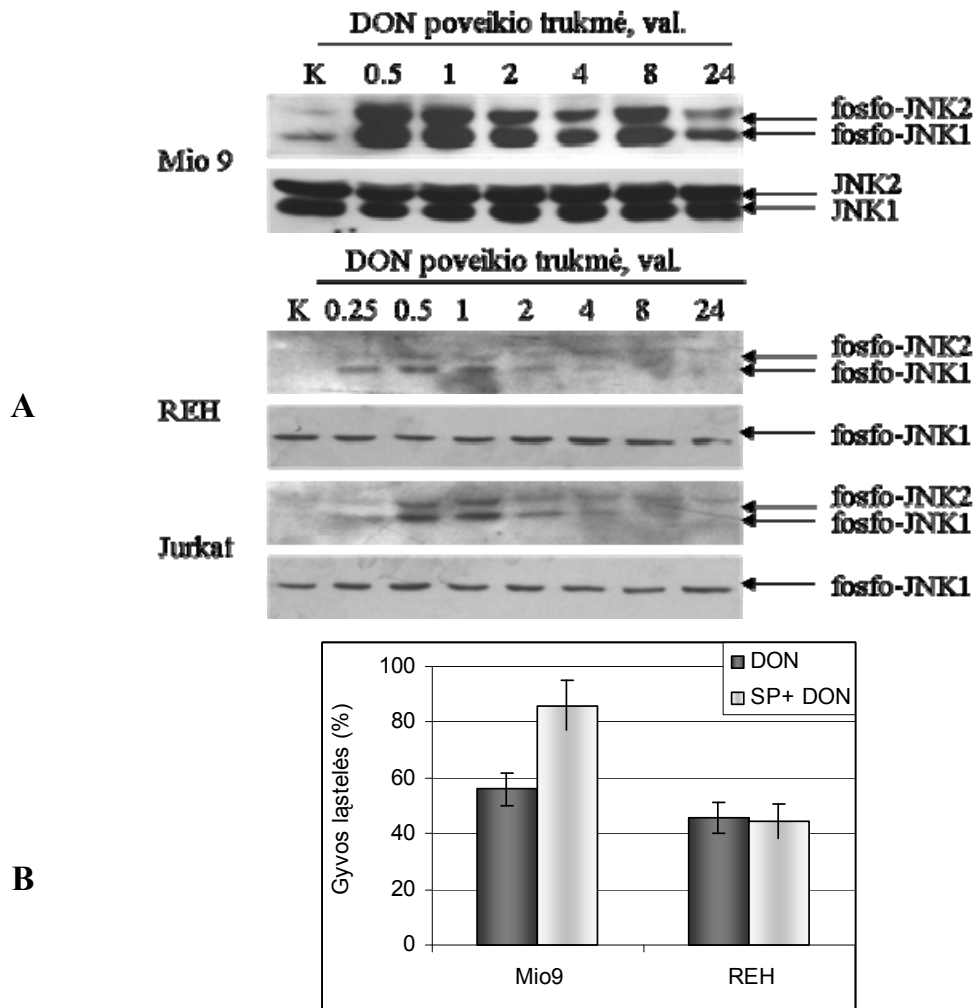


3.14 pav. DON, priklausomai nuo koncentracijos, pasižymi citotoksinu, apoptozinę ląstelių žūtį sukeliančiu veikimu. A - Mio9 bei REH ląstelių skaičiaus kitimas po poveikio skirtingomis DON koncentracijomis, įvertintas tripano mėlio testu ir išreikštas ląstelių skaičiumi 1ml ląstelių suspensijos (žr. 2.4 skyrių); B – Mio9 ir REH ląstelių pasiskirstymas kultūroje pagal nusidažymą AO/EB po 24 poveikio val. skirtingomis DON koncentracijomis analizuotas fluorescentiniu mikroskopu. Čia: G – gyvos neapoptozinės; GA – gyvos apoptozinės; NA – negyvos apoptozinės, N – nekrozinės; BCH – netekusio chromotino ląstelės (žr. 2.13 skyrių).

Tolimesniems tyrimams mes pasirinkome tokias mikotoksino koncentracijas, kurios sukėlė 40-60% ląstelių žūtį, ir vertinome, kokią vaidmenį streso aktyvinama JNK MAP kinazė atlieka DON indukuojamame apoptozės procese. Tuo tikslu tyrėme JNK kinazės fosforilinimą/aktyvinimą po įvairiai trunkančio DON poveikio. Kadangi miogeninių ląstelių jautrumas šiam mikotoksinui yra panašus į leukeminių linijų ląstelių jautrumą, tolimesniuose tyrimuose naudojome tą pačią DON dozę (5 µg/ml), kuri sukėlė 40-60% ląstelių žūtį. Gauti duomenys parodė, kad šis mikotoksinas indukavo ankstyvą ir trumpalaikį JNK MAP kinazės fosforilinimą REH bei Jurkat linijų ląstelėse, bet ilgai trunkantį miogeninės Mio9 linijos ląstelėse. REH ir Jurkat ląstelėse JNK buvo aktyvinama tik 1-2 val. nuo DON poveikio pradžios, tuo tarpu miogeninėse ląstelėse JNK išlikdavo fosforilinta ir 24 valandą nuo DON poveikio pradžios (3.15 pav., A). JNK raiška išliko pastovi visą tyrimo laiką visose tirtose ląstelių linijose.

Galimas JNK MAPK dalyvavimas DON sukeltamoje Mio9 bei REH ląstelių apoptozėje buvo vertinamas naudojant specifinį šios kinazės inhibitorių, SP600125. Iš literatūros yra žinoma, kad Jurkat ląstelėse DON indukuotos apoptozės metu JNK vaidina apsauginį vaidmenį (Pestka ir kt., 2005). Iš 3.15 paveiksle, B dalyje pateiktųjų duomenų matome, kad JNK slopinimas nedidino REH ląstelių gyvybingumo po DON poveikio, tačiau šios kinazės aktyvumo sumažinimas Mio9 miogeninėse ląstelėse ženkliai pagerino šių ląstelių išgyvenimą po DON poveikio.

Taigi, mūsų gauti rezultatai rodo, kad ta pati medžiaga skirtingų rūšių ląstelėse gali indukuoti skirtingos trukmės JNK MAP kinazės aktyvinimą. Šiuo atveju JNK aktyvinimo pobūdis ir vaidmuo apoptozėje atitinka literatūroje priimtai nuostatai: miogeninėse ląstelėse DON indukuoja ilgalaikį JNK kinazės aktyvinimą, kuris reikalingas DON indukuotai apoptozei pasireikšti šiose ląstelėse. Ir atvirkščiai, trumpai aktyvinta JNK apsaugo leukemines Jurkat ląsteles, bet, panašu, pasižymi neutraliu veikimu REH leukeminėse ląstelėse (Baltriukienė ir kt., 2007; Pestka ir kt., 2005).



3.15 pav. JNK MAP kinazės aktyvacijos bei vaidmens tyrimas miogeninėse bei leukeminėse ląstelių linijose po DON poveikio. **A** - JNK raiškos ir fosforilinimo kitimas po DON (5 $\mu\text{g/ml}$) poveikio nustatytas imunoblotingo metodu. Pateiktas tipinis vaizdas, gautas atlikus mažiausiai tris eksperimentus. **B** - JNK kinazės inhibitoriaus SP600125 įtaka Mio9 ir REH ląstelių gyvybingumui po DON poveikio buvo vertinta MTT metodu, gauti duomenys išreikšti procentais, laikant, kad kontrolinės, niekuo neveiktos gyvos ląstelės sudaro 100 % (žr. 2.5 skyrius). Apskaičiuotas vidurkis iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų \pm SN, $P < 0.05$. SP600125 (40 μM) inhibitoriumi ląstelės veiktos 30 min. prieš pridėdant DON.

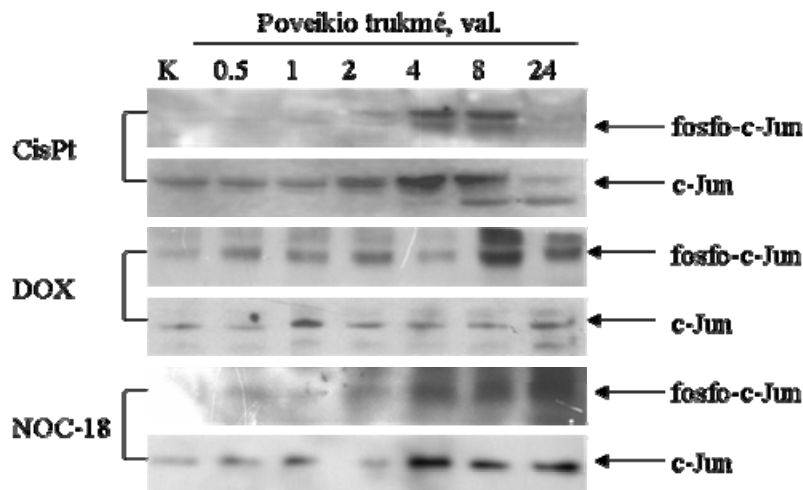
3.3.4.3. Transkripcijos veiksnio c-Jun vaidmens miogeninių ląstelių apoptozėje tyrimas

Mes parodėme, kad JNK dalyvauja indukuojant apoptozę miogeninėse ląstelėse po apoptozės induktorių - CisPt ir DOX, poveikio. Apoptozės stabdymas ir ląstelių gyvybingumo išsaugojimas reikštų JNK slopinimą. Apoptozę galima būtų stabdyti ir slopinant kitus šio signalinio kelio

komponentus bei JNK taikinius. Todėl svarbu išsiaiškinti JNK signalo perdavimo eiliškumą apoptozės indukcijoje.

Vienas pagrindinių JNK taikinių - protoonkogeno *c-jun* koduojamas baltymas, kurį ji fosforilina ir tokiu būdu aktyvina. Signalo perdavimo metu gali būti svarbus ir signalinių molekulių raiškos aktyvinimas. c-Jun raišką gali reguliuoti MAP kinazės – p38 bei ERK (Kayahara ir kt., 2005). Yra duomenų apie tai, kad ERK reguliuoja ir c-Jun aktyvumą. Nustatyta, kad ERK1/2 fosforilina c-Jun tiek baltymo N-gale (kiek mažiau nei JNK), tiek C-gale vienoje iš inhibitorinių sričių, lokalizuotų šalia DNR surišančio domeno (Shaulian ir Karin, 2001). Literatūroje yra daug duomenų apie c-Jun vaidmenį apoptozėje - tiek proapoptozinį, tiek ir antiapoptozinį (Eferl ir kt., 2003; Munemasa ir kt., 2006). Todėl tolesniame darbo etape vertinome šio transkripcijos veiksnio vaidmenį miogeninių ląstelių apoptozės indukcijoje. Pradžioje tyrėme, kaip kinta c-Jun baltymo raiška ir fosforilinimas po tiriamų medžiagų poveikių. Gauti duomenys parodė gana vėlyvą c-Jun baltymo fosforilinimą po CisPt, DOX ir NOC-18 (3.16 pav.). Šiuo atveju buvo stebima ir panaši c-Jun raiškos kitimo kinetika po CisPt, DOX bei NOC-18 poveikių, nors po DOX poveikio mažiau išreikšta. Taigi, c-Jun fosforilinimo koreliacija su JNK fosforilinimu/aktyvinimu, kuris buvo registruotas CisPt ir DOX poveikio atveju, leidžia manyti, kad c-Jun galėtų dalyvauti apoptozės indukcijoje. Iš kitos pusės, esame nustatę, kad vėlyvas JNK aktyvinimas apsaugo tiriamas Mio9 ląsteles nuo NO donoro NOC-18 poveikio.

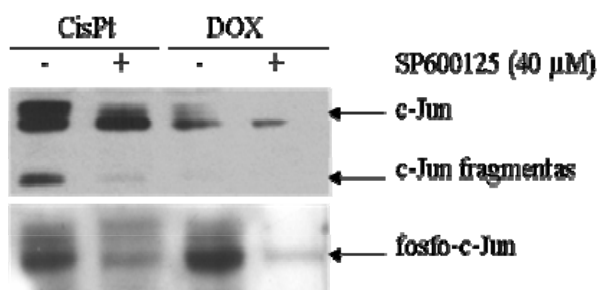
c-Jun baltymo raiškos bei jo fosforilinimo/aktyvinimo padidėjimas po genotoksinių bei patofiziologinių kardiotoksiškumą imituojančių medžiagų poveikių rodo jo galimą dalyvavimą miogeninių ląstelių apoptozės indukcijoje. Tokių duomenų esama ir literatūroje. Pavyzdžiui, c-Jun reikalingas apoptozei, vykstančiai simpatiniuose neuronuose po nervų augimo faktoriaus (NGF) pašalinimo, taip pat ceramido indukuotai apoptozei mieloidinių ir limfoidinių navikų ląstelių linijose, pelės fibroblastų ląstelėse, Sirijos žiurkėno embrioninėse ląstelėse. Be to, c-Jun/AP-1 aktyvacija šiose ląstelėse yra svarbi



3.16 pav. c-Jun raiškos ir fosforilavimo kitimas po poveikio kardiotoksinėmis medžiagomis. c-Jun raiška ir fosforilavimas miogeninėse ląstelėse po CisPt (10 µg/ml), DOX (2.5 µM) bei NOC-18 (5 mM) poveikio buvo analizuojami imunoblotingo metodu. Pateiktas tipinis vaizdas, gautas atlikus mažiausiai tris nepriklausomus eksperimentus.

apoptozei, indukuojamai oksidacinio streso. Kaip proapoptozinis veiksnys, c-Jun funkcionuoja ir širdyje išemijos metu (Sato ir kt., 2001; Wang ir kt., 1999).

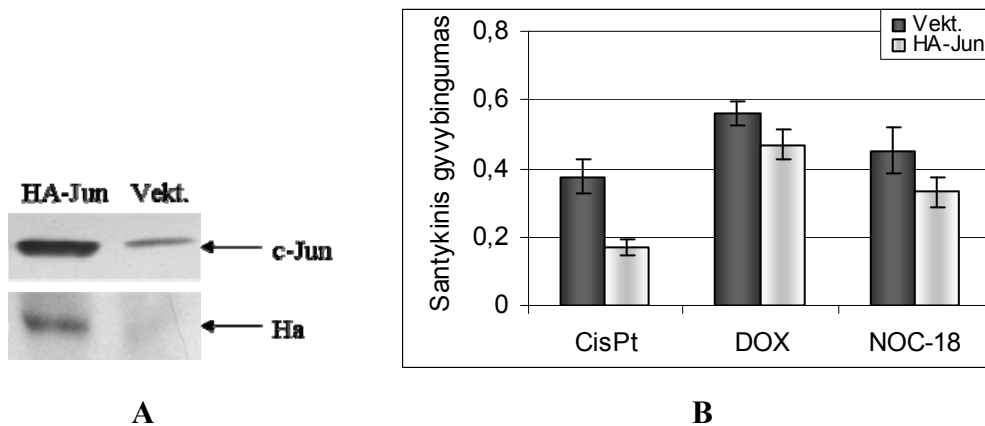
Specifinis JNK inhibitorius slopina c-Jun N-galo kinazės aktyvumą, taigi, tuo atveju jiniai negali fosforilinti savo taikinių. Mes parodėme, kad po JNK inhibitoriaus SP600125 poveikio sumažėja bazinis c-Jun fosforilavimas (žr. 3.3.1. sk., 3.10 pav.). Dar daugiau, 3.17 paveiksle pateikti duomenys rodo, kad tiriamas JNK inhibitorius ne tik slopina c-Jun fosforilavimą, bet ir mažina CisPt bei DOX indukuotą c-Jun raišką (3.17 pav.)



3.17 pav. JNK inhibitoriaus SP600125 įtaka c-Jun raiškos ir fosforilavimo kitimui po CisPt ir DOX poveikių. JNK aktyvumą nuslopinus SP600125 (40 µM), c-Jun raiška ir fosforilavimas miogeninėse miogeninėse ląstelėse po CisPt (10 µg/ml, 8val.) ir DOX (2.5 µM, 8 val.) poveikio buvo analizuojami imunoblotingo metodu. Pateiktas tipinis vaizdas, gautas atlikus mažiausiai tris eksperimentus. Ląstelės SP600125 buvo veikiamos 30 min. prieš pridėdant apoptozės induktorių.

Taigi, JNK, fosforilindama c-Jun, dalyvauja šio transkripcijos veiksnio raiškos reguliacijoje. Žinoma, kad *c-jun* geno promotoriuje yra AP-1 surišimo vietos, todėl c-jun gali dalyvauti savo paties geno transkripcijoje - pasireiškia teigiama autoreguliacija.

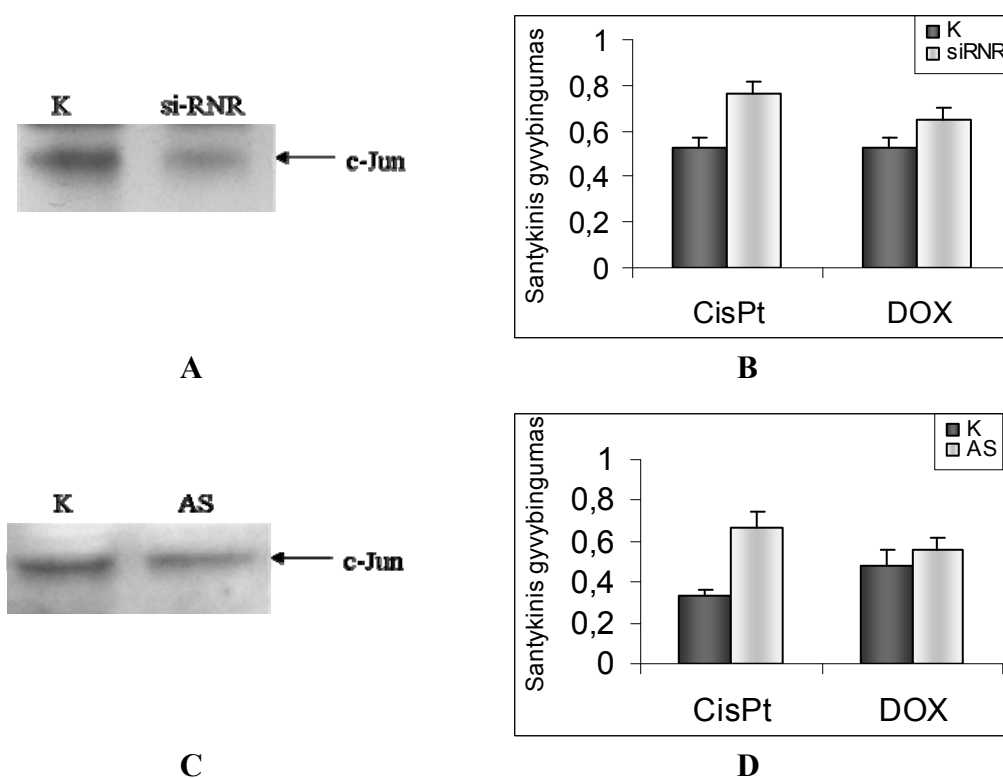
Siekdami įvertinti šio transkripcijos veiksnio vaidmenį miogeninių ląstelių apoptozės indukcijoje gavome genetiškai modifikuotas miogenines ląsteles su padidinta c-Jun baltymo raiška. Šiuo tikslu panaudojome pcDNR-HA-Jun plazmidę, sukurtą pcDNA3 vektoriaus pagrindu (Invitrogen). Ši plazmidė turėjo įklonuotą *c-jun* geno seką sulietą su HA. HA yra hemagliutininas - gripo viruso baltymas, sukeliantis stiprų imuninį atsaką, todėl antikūnai prieš jį lengvai gaunami, o nedidelį epitopą koduojanti seka sėkmingai pritaikyta genų žymėjimui. Transfektuotų ląstelių atrankai buvo naudotas antibiotikas geneticinas (50 µg/ml - 300 µg/ml). HA bei padidinta c-Jun raiška buvo įvertinta imunoblotingo metodu (3. 18 pav., A). Kontrolei į miogenines ląsteles buvo transfekuota plazmidė, nekeičianti c-Jun raiškos.



3.18 pav. c-Jun vaidmuo miogeninių ląstelių apoptozės reguliacijoje. A – HA bei c-Jun raiška kontrolinėse ląstelėse bei modifikuotose ląstelėse su padidintu c-Jun baltymo lygiu buvo analizuota imunoblotingo metodu. Pateiktas tipinis vaizdas, gautas atlikus mažiausiai tris eksperimentus. **B** – Kontrolinės ląstelės bei ląstelėse su padidintu c-Jun baltymo kiekiu buvo 24 val. veikiamos CisPt (10 µg/ml), DOX (2,5 µM) bei NOC-18 (5 mM). Gauti rezultatai išreikšti santykinio gyvybingumo (žr. 2.4 ir 2.5 skyrius) vidurkiu ± SN, apskaičiuotu iš mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų, P<0.05.

Paveikę kontrolines ląsteles bei ląsteles su padidinta *c-jun* raiška, tiriamomis kardiotoksinėmis medžiagomis (CisPt, DOX, NOC-18), nustatėme didesnę šių genetiškai pakeistų ląstelių jautrumą tiriamoms medžiagoms (3.18 pav., B). Tai rodo galimą *c-Jun* dalyvavimą šių medžiagų indukuojamoje miogeninių ląstelių apoptozėje.

Norėdami patvirtinti šiuos duomenis, mes mažiname tiriamo transkripcijos veiksnio raišką. Šiam tikslui pasiekti pasirinkome du būdus. Pirmuoju atveju *c-Jun* raišką slopinome, panaudodami mažų dvigrandžių RNR – siRNR metodu. Tai naujas ir gana efektyvus būdas genų raiškai reguliuoti.



3.19 pav. *c-Jun* vaidmens miogeninių ląstelių apoptozės reguliacijoje tyrimas. **A** - *c-Jun* raška analizuota *c-Jun*-siRNR transfekuotose ir kontrolinėse Mio9 ląstelėse. **B** – *c-Jun*-siRNR įtaka miogeninių ląstelių gyvybingumui po poveikio CisPt (10 μ g/ml, 24 val.) ir DOX (2,5 μ M, 24 val.). **C** - *c-Jun* raška analizuota miogeninėse ląstelėse, kuriose *c-Jun* baltymo lygis buvo mažinamas priešprasminių sekų metodu, bei kontrolinėse Mio9 ląstelėse. **D** – Priešprasminės *c-jun* sekos įtaka miogeninių ląstelių gyvybingumui po poveikio CisPt (10 μ g/ml, 24 val.) ir doksorubicino (2,5 μ M, 24 val.). **(A)** ir **(C)** – *c-Jun* raiška tirta imunoblotingo metodu. Pateiktas tipinis vaizdas, gautas atlikus mažiausiai tris eksperimentus. **(B)** ir **(D)** – duomenys gauti, dažant ląsteles kristalvioletu (žr. 2.6 skyrių) ir išreikšti santykinio gyvybingumo vidurkiu \pm SN, $P < 0.05$ (CisPt atveju) ir $P < 0.02$ (DOX atveju).

Antruoju atveju į tiriamas ląsteles buvo įvestas konstruktas, turintis priešprasminę c-Jun seką (žr. 2.17 skyrių). Priešprasminių sekų metodas šiuo metu efektyviai naudojamas signalo perdavimo tyrimuose. Gautose linijose c-Jun raiška buvo įvertinta imunoblotingo metodu, kuris parodė kiek mažesnę c-Jun baltymo lygį lyginant su kontrole (3.19 pav., A ir C). Paveikę šias modifikuotas ir kontrolines ląsteles CisPt bei DOX nustatėme, kad c-Jun slopinimas didina ląstelių atsparumą tirtoms medžiagoms (3.19 pav., B ir D). Šie rezultatai patvirtino anksčiau gautus duomenis, naudojant modifikuotas ląsteles su padidinta c-Jun raiška. Taigi, c-Jun dalyvauja iš triušio griaučių raumens gautų miogeninių ląstelių apoptozės indukcijoje po genotoksinių medžiagų - CisPt ir DOX, poveikio.

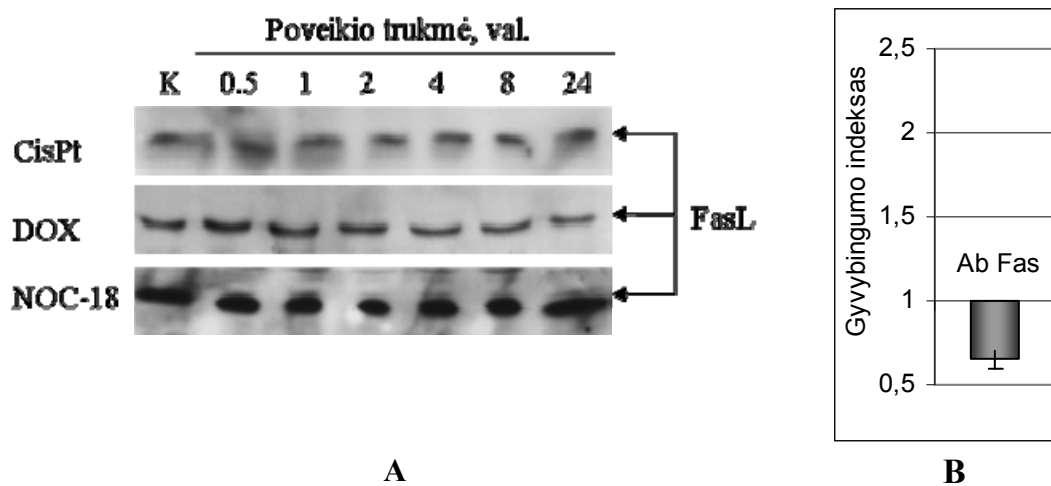
Taigi, galima teigti, kad JNK miogeninės ląstelėse dalyvauja apoptozės indukcijoje fosforilindama c-Jun, AP-1 transkripcijos veiksnio komponentą.

3.3.4.4. Apoptozės iniciacijos kelių tyrimas chemoterapinių medžiagų sukultoje miogeninių ląstelių apoptozėje

Kaip parodėme anksčiau, JNK aktyvinimas bei po jo sekantis c-Jun fosforilinimas nulemia CisPt ir DOX indukuojamą apoptozę miogeninėse ląstelėse. Toliau aiškindamiesi apoptozinio signalo perdavimo ląstelėje eiliškumą, tyrėme apoptozės veiksnio Fas ligando (FasL) raišką po apoptozės induktorių ir JNK/c-Jun signalinio kelio aktyvintojų - CisPt ir DOX, poveikių.

Žinoma, kad FasL yra vienas iš transkripcijos veiksnio c-Jun taikinių, dalyvaujančių apoptozės indukcijoje. c-Jun stimuliuoja jo raišką bei susijungimą su Fas receptoriumi. Su FasL raiškos aktyvinimu paprastai siejamamas JNK signalinio kelio ilgalaikis aktyvinimas ir svarba apoptozės indukcijoje. Visa tai ląsteles veda link apoptozės – inicijuojamas išorinis apoptozės kelias (Mansouri ir kt., 2003). Todėl FasL gali būti proapoptozinis JNK/c-Jun signalinio kelio taikiny, nulemiantis miogeninių ląstelių žūtį po CisPt bei DOX poveikių. Norėdami tai patikrinti, mes įvertinome FasL baltymo raišką miogeninėse ląstelėse po CisPt, DOX bei NOC-18 poveikių.

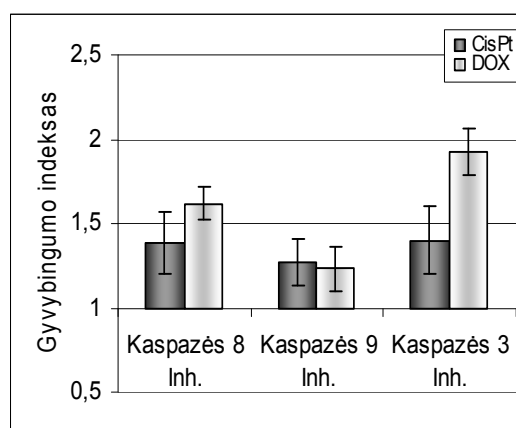
Gauti duomenys neparodė jokių FasL raiškos pakitimų po minėtų poveikių, bet registruota gana aukšta bazinė FasL raiška miogeninėse ląstelėse (3.20 pav., A). Siekdami įvertinti ar šis išorinis FasL/Fas indukuotas apoptozės iniciacijos kelias yra svarbus CisPt poveikio atveju, panaudojome antikūnius prieš FasL receptorių Fas. Tai imitavo ligando (FasL) poveikį. Iš 3.20 paveiksle, B dalyje pateiktų duomenų matome, kad FasL/Fas signalinis kelias dalyvauja CisPt indukuotoje miogeninių ląstelių apoptozėje – anti-Fas didina CisPt paveiktų ląstelių žūtį, bet neveikia kontrolinių ląstelių. Tačiau mes negavome duomenų apie šio kelio aktyvinimą mūsų tirtų chemoterapinių medžiagų indukuoto apoptozinio proceso metu. Beje, literatūroje yra duomenų ir apie tai, kad FasL raiškos padidėjimas, sąlygojamas aktyvaus c-Jun, gali būti ir nepakankamas kardiomiocitų apoptozei (Nelson ir kt., 2000). Gali būti, kad, šiuo atveju, JNK/c-Jun kelias dalyvauja apoptozės indukcijoje, panaudodamas kitus savo taikinius ir kelius.



3.20 pav. FasL/Fas vaidmuo miogeninių ląstelių apoptozėje. **A** – FasL raiška miogeninėse ląstelėse po CisPt (10 μ g/ml), DOX (2,5 μ M), NOC-18 (5 mM) poveikių buvo analizuota imunoblotingo metodu. Pateiktas tipinis vaizdas, gautas atlikus mažiausiai tris eksperimentus. **B** – Antikūnų prieš Fas įtaka miogeninių ląstelių gyvybingumui buvo tirta po poveikio CisPt (10 μ g/ml). Gauti rezultatai išreikšti gyvybingumo indeksu reiškiančiu santykį gyvų ląstelių rastu po kompleksinio anti-Fas ir CisPt 24 val. poveikio su gyvų ląstelių skaičiumi rastu po CisPt tokios pat trukmės poveikio. Pateikiamas mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkis \pm SN, $P < 0.03$.

Be išorinio FasL/Fas kelio apoptozė ląstelėje gali būti inicijuojama ir vidiniu, nuo mitochondrijų priklausomu, keliu. Pirmasis yra inicijuojamas

FasL susijungiant su transmembraniniu glikoproteinu Fas, dėl to aktyvinama visa eilė signalų, vedančių į kaspazės 8 aktyvaciją ir apoptozinę ląstelės žūtį. Kaspazė 9 perduoda mitochondrinio kelio signalą. Todėl norėdami išsiaiškinti, koku keliu vyksta miogeninių ląstelių apoptozė, indukuojama CisPt bei DOX poveikių (t.y. įvertinti ar abu signaliniai keliai dalyvauja apoptozėje mūsų atveju), panaudojome specifinius šių kaspazių inhibitorius. Gauti rezultatai parodė, kad kaspazių 3, 8 ir 9 inhibitoriai (atitinkamai Z-DEVD-FMK, Z-IETD-FMK ir Z-LEHD-FMK) stabdė CisPt ir DOX indukuotą ląstelių žūtį (3.21 pav.). Taigi, šių medžiagų sukėltoje apoptozėje dalyvauja tiek išorinis, tiek ir vidinis apoptozės iniciacijos keliai.



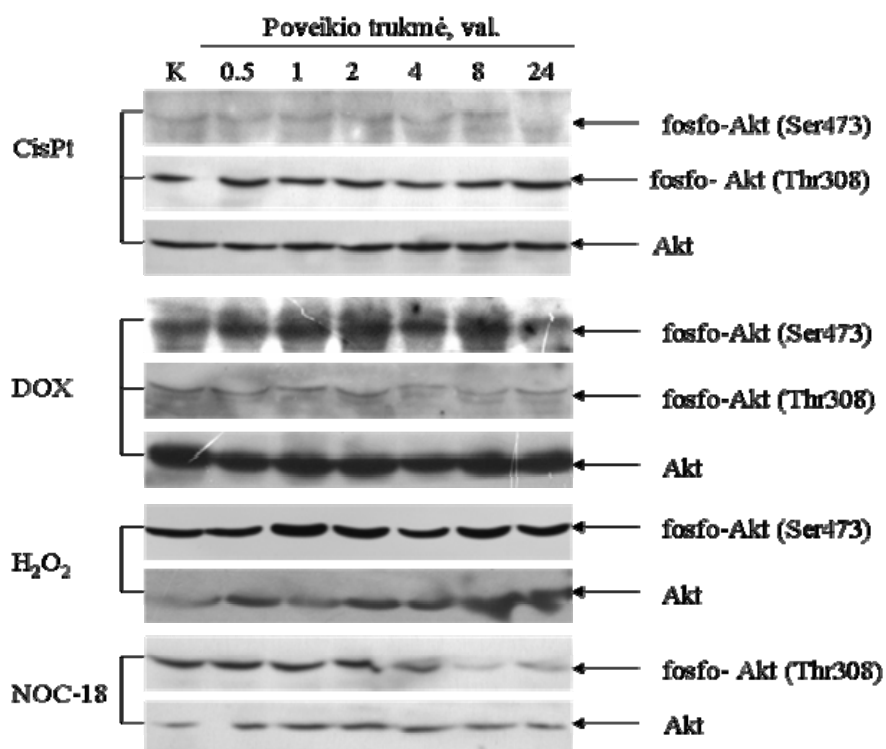
3.21 pav. Išorinis - receptorinis ir vidinis - mitochondrinis apoptozės iniciacijos keliai dalyvauja CisPt ir DOX indukuotoje apoptozėje. Kaspazių inhibitorių (visi po 20 μ M) poveikis miogeninių ląstelių gyvybingumui po kardiotoksinių medžiagų – CisPt (10 μ g/ml, 24 val.) ir DOX (2.5 μ M, 24 val.), poveikio tirtas tripano mėlio testu (žr. 2.4 skyrių). Gauti rezultatai išreikšti gyvybingumo indeksu (žr. 3.20 pav. aprašą). Pateikiamas mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkis \pm SN, $P < 0.025$.

3.3.5. PI3 kinazės/Akt signalinis kelias ir jo vaidmuo miogeninių ląstelių apoptozėje

Siekiant pagerinti miogeninių ląstelių išgyvenimą po kardiotoksinių poveikių, pirmiausia yra kreipiamas dėmesys į PI3K/Akt signalinį kelią, kuris paprastai siejamas su apsauginiu, antiapoptoziniu jos vaidmeniu ląstelėse. PKB/Akt išgyvenimą skatinantis veikimas pasireiškia tiesiogiai fosforilinant ir slopinant pagrindinius apoptozės vykdytojus - baltymą Bad, prokaspazę 9 bei kinazę ASK1, kurios fosforilinimas neleidžia perduoti streso signalo streso aktyvinamoms MAP kinazėms - JNK ir p38 (Cardone ir kt., 1998; Negoro ir kt., 2001; Pastorino ir kt., 1999). Yra duomenų apie tai, kad Akt dalyvauja

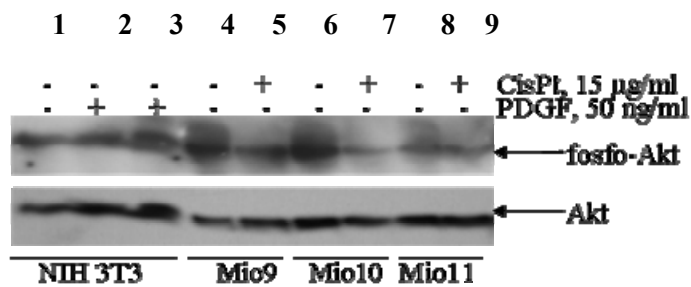
apsaugant kardiomiocitus nuo apoptozės išemijos metu *in vivo* (Fujio ir kt., 2000). Kitais duomenimis, PI3K/Akt signalinis kelias gali ir nedalyvauti miogeninių ląstelių išgyvenime (Stewart ir kt., 2004), o pastaraisiais metais pasirodė straipsnių ir apie galimą jo proapoptozinį veikimą ląstelėse (Fedier ir kt., 2006; van Gorp ir kt., 2006).

Todėl, siekdami įvertinti PI3K/Akt signalinio kelio vaidmenį miogeninių ląstelių, skirtų transplantacijai į pažeistą širdies audinį, žūtis ir išgyvenimo procesuose, tyrėme Akt kinazės raišką bei fosforilinimą. 3.22 paveiksle pateikti duomenys neparodė ryškesnio Akt baltymo lygio pasikeitimo po kardiotoksinių medžiagų (CisPt, DOX, NOC-18 bei H₂O₂) poveikių. Apoptozės induktoriai neindukavo ir Akt kinazės Thr 308 ir Ser 473 fosforilinimo padidėjimo, kuris paprastai yra siejamas su Akt aktyvinimu. Tyrimai parodė, kad kamieninės miogeninės ląstelės turi pastoviai fosforilintą fosfo-Akt baltymą, kurio lygis kiek mažėjo ląstelių apoptozinio proceso metu.



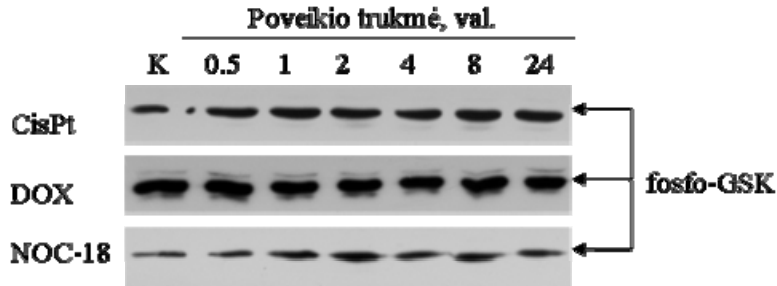
3.22 pav. Akt raiškos ir fosforilinimo dinamikos tyrimas po kardiotoksinių poveikių. Akt raiškos ir fosforilinimo kitimas po CisPt (10 µg/ml), DOX (2,5 µM), NOC-18 (5 mM) bei H₂O₂ (1 mM) poveikių buvo analizuojamas imunoblotingo metodu. Pateiktas tipinis vaizdas, gautas atlikus mažiausiai tris eksperimentus.

Norėdami įvertinti bazinį Akt fosforilinimo lygį miogeninėse ląstelėse, mes palyginome Akt fosforilinimą keliose miogeninių linijų ląstelėse ir ląstelėse, kuriose, kaip žinoma, augimo faktoriai aktyvina šios kinazės fosforilinimą. Palyginimui pasirinkome plokštelių kilmės augimo faktoriumi PDGF stimuliuotus pelės NIH 3T3 fibroblastus. 3.23 paveiksle pateikti duomenys rodo aukštą bazinį Akt Thr 308 fosforilinimo lygį miogeninėse ląstelėse, kuris po ilgesnio (24 val.) apoptozės induktoriaus - CisPt poveikio sumažėja.



3.23 pav. Akt raiškos ir fosforilinimo lygio palyginimas skirtingose ląstelių sistemose. Palyginimui naudotos NIH 3T3 linijos ląstelės: nepaveiktos (1 takelis) bei stimuliuotos su PDGF 5 min. ir 15 min. (atitinkamai 2 ir 3 takeliai), bei miogeninių 9, 10, 11 linijų ląstelės: kontrolinės bei 20 val. veiktos CisPt (10 µg/ml). Akt raiška ir fosforilinimas vertinti imunoblotingo metodu. Pateiktas tipinis vaizdas, gautas atlikus mažiausiai tris eksperimentus.

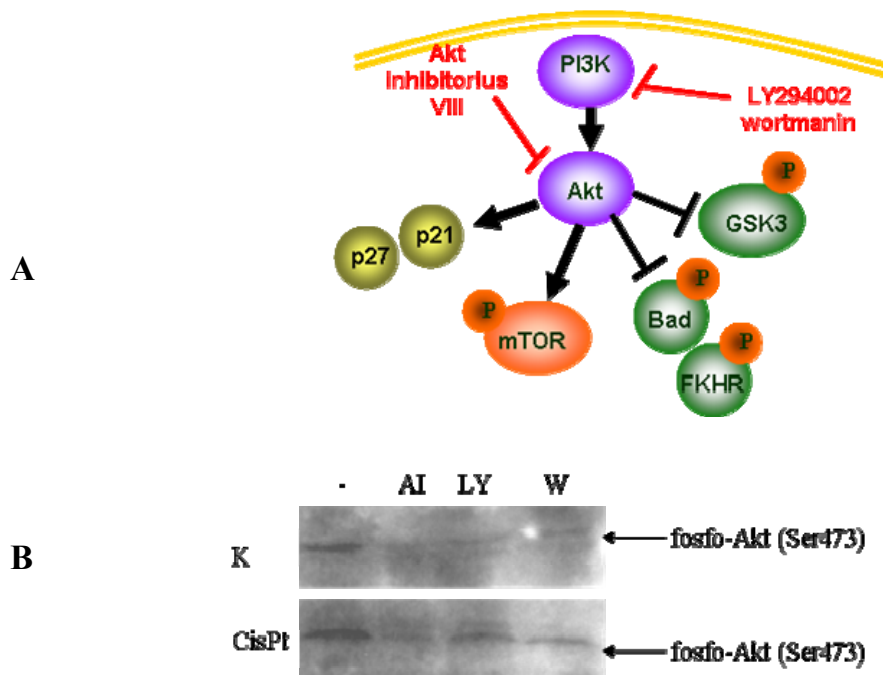
Duomenis apie pastovų Akt signalinio kelio aktyvumą miogeninėse ląstelėse patvirtinome, tirdami vieno iš jo taikinių - glikogeno sintazės 3 (GSK-3), fosforilinimą. Žinoma, kad Akt fosforilina GSK-3 ir taip nuslopina jos veikimą. Buvo parodyta, kad skirtingas PI3K/GSK-3 signalinio kelio moduliavimas gali lemti arba apsauginį, arba proapoptozinį šio kelio vaidmenį. GSK-3 taikiniai yra transkripcijos veiksniai, struktūriniai baltymai bei metabolizmą reguliuojantys fermentai. Visų jų aktyvumo reguliavimas ir nulemia ląstelės likimą (Woodgett, 2005). Yra nustatyta, kad GSK3 dalyvauja oksidacinio streso indukuojamos apoptozės reguliacijoje, o šios kinazės aktyvumo nuslopinimas apsaugo kardiomicitus nuo jų žūties (Nair ir Olanow, 2008; Tong ir kt., 2002). Todėl toliau vertinome GSK3 kinazės aktyvinimą griaučių miogeninėse ląstelėse po kardiotoksinių medžiagų poveikių. 3.24 paveiksle pateikti duomenys nerodo jokio GSK3 fosforilinimo pasikeitimų.



3.24 pav. Glikogeno sintazės fosforilinimo/aktyvinimo tyrimas miogeninėse ląstelėse. Fosfo-GSK3 baltymo lygis įvertintas imunoblotingo metodu, naudojant monokloninius antikūnus prieš šį baltymą. Pateiktas tipinis vaizdas, gautas atlikus mažiausiai tris eksperimentus.

Taigi, mūsų tirti apoptozės induktoriai tiek pačios Akt, tiek jos taikinio GSK3 fosforilinimo padidėjimo neindukavo. Manome, kad būdama pastoviai aktyvi miogeninėse ląstelėse, Akt galėtų apsaugoti šias ląsteles nuo įvairių proapoptozinių poveikių.

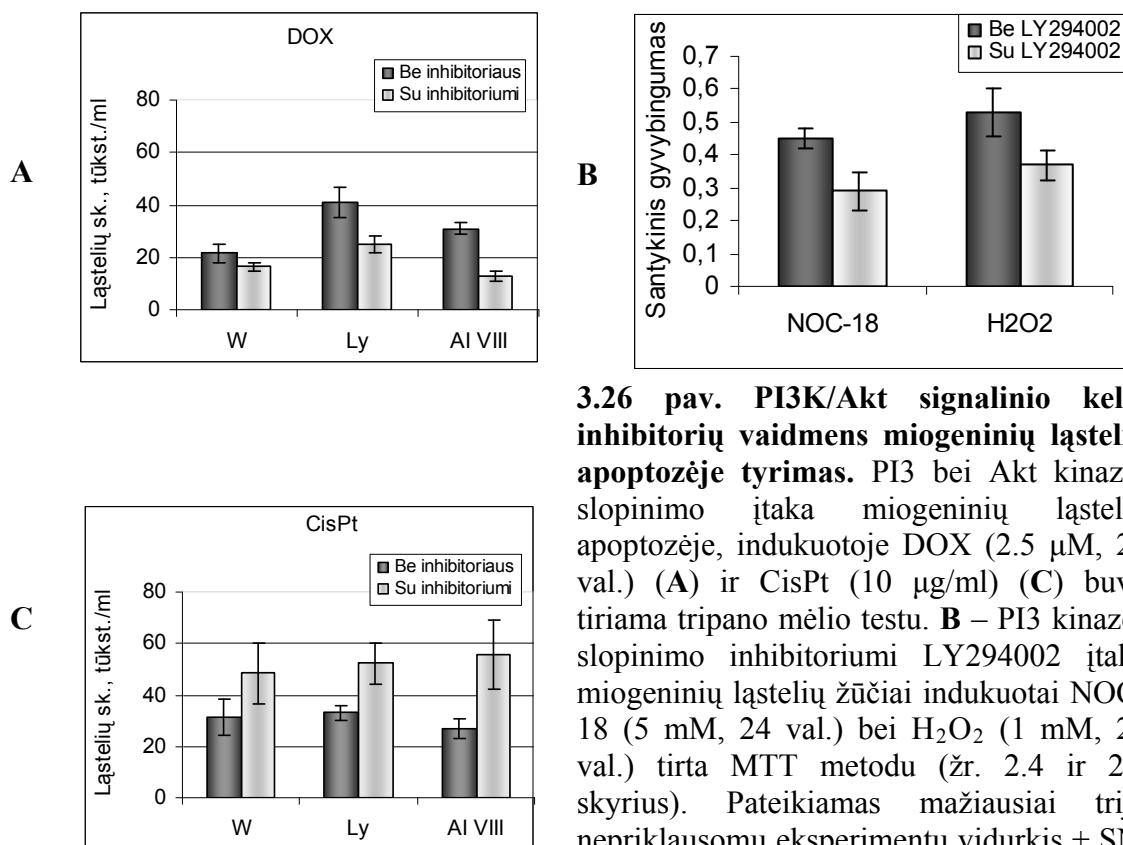
Siekdami įvertinti Akt vaidmenį miogeninių ląstelių apoptozės indukcijoje, naudojome biocheminius ir genetinius metodus. Pirmuoju atveju buvo panaudoti šio signalinio kelio specifiniai inhibitoriai - PI3 kinazės inhibitoriai LY294002 ir wortmaninas bei Akt kinazės inhibitorius VIII, kuris slopina Akt kinazės veikimą (3.25 pav., A). Šių inhibitorių veikimas buvo patvirtintas kontrolinėse bei CisPt paveiktose ląstelėse imunoblotingo metodu, kuris parodė Akt fosforilinimo slopinimą po visų mūsų naudotų PI3K/Akt inhibitorių poveikių (3.25 pav., B). Toliau šie inhibitoriai ir buvo naudoti tiriant Akt vaidmenį kardiotoksinių medžiagų indukuotoje miogeninių ląstelių apoptozėje. Kaip ir buvo galima tikėtis, mūsų gauti duomenys parodė, kad PI3K/Akt signalinio kelio inhibitoriai didina patofiziologinį kardiotoksiškumą imituojančių medžiagų - NO donoro NOC-18 bei H₂O₂, o taip pat DOX poveikių sukeliama miogeninių ląstelių žūtį (3.26 pav. A ir B). Taigi, PI3K/Akt signalinis kelias reikalingas apsaugoti šias ląsteles nuo kardiotoksinių medžiagų indukuojamos jų žūties. Tačiau netikėtus duomenis gavome miogenines ląsteles, po PI3K ir Akt slopinimo, paveikę CisPt. Šiuo atveju visi tirti PI3K/Akt signalinio kelio inhibitoriai - Ly294002 ir



3.25 pav. PI3K/Akt signalinis kelias ir jo slopikliai. **A** – PI3K/Akt signalinis kelias, pagrindiniai jo taikiniai ląstelėje bei šio kelio inhibitoriai. **B** – PI3K bei Akt kinazių inhibitorių – LY249002, wortmanino bei AI VIII, įtaka Akt kinazės fosforilinimui kontrolinėse bei CisPt (10 $\mu\text{g/ml}$, 8 val.) veiktose miogeninėse ląstelėse buvo analizuota imunoblotingo metodu. Pateiktas tipinis vaizdas, gautas atlikus mažiausiai tris eksperimentus. Inhibitoriai pridėti 30 min. prieš paveikiant ląstelės CisPt.

wortmaninas bei Akt inhibitorius VIII, stabdė cisplatina paveiktų miogeninių ląstelių žūtį, t.y. didino ląstelių skaičių, palyginus su ląstelių skaičiumi kontrolinėje populiacijoje, kuri buvo veikta tik CisPt (3.26 pav., C). Tai rodo, kad PI3 kinazė/Akt signalinis kelias kamieninėse miogeninėse ląstelėse, priklausomai nuo apoptozės induktoriaus, gali būti proapoptozinis.

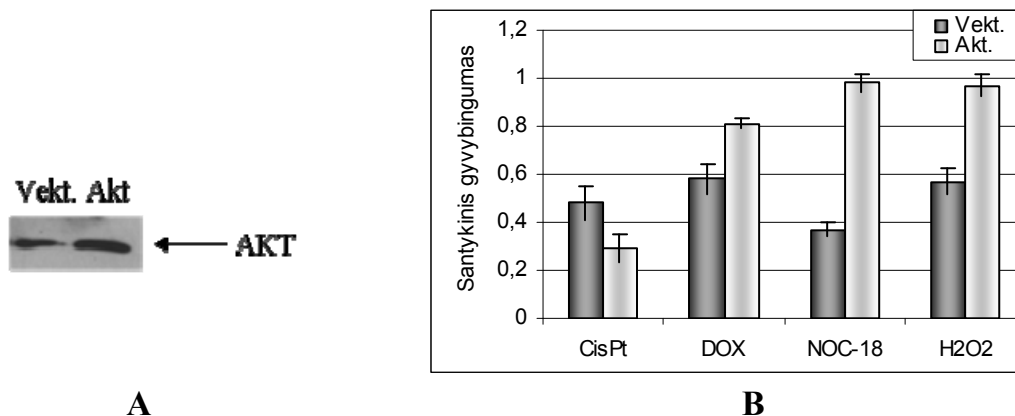
Gautus duomenis apie PI3K/Akt signalinio kelio vaidmenį miogeninių ląstelių žūties reguliacijoje patvirtinome genetiniais metodais. Siekdami padidinti Akt raišką miogeninėse ląstelėse, į šias ląstelės transfekavome plazmidę puroBabe-Akt. Palyginimui į kitas tos pačios Mio9 linijos ląsteles įvedėme plazmidę puroBabe-vekt. Gavome dvi naujas ląstelių linijas, kurių vienoje buvo padidinta Akt raiška, o kitoje, kontrolinėje, Akt lygis nesikeitė. Abiem atvejais ląstelių atrankai naudotas buvo puromicinas (1-2 $\mu\text{g/ml}$). Akt lygis buvo patvirtintas imunoblotingo metodu (3.27 pav., A). Toliau šios naujos ląstelių linijos buvo veikiamos tiriamais apoptozės induktoriais. Iš 3.27



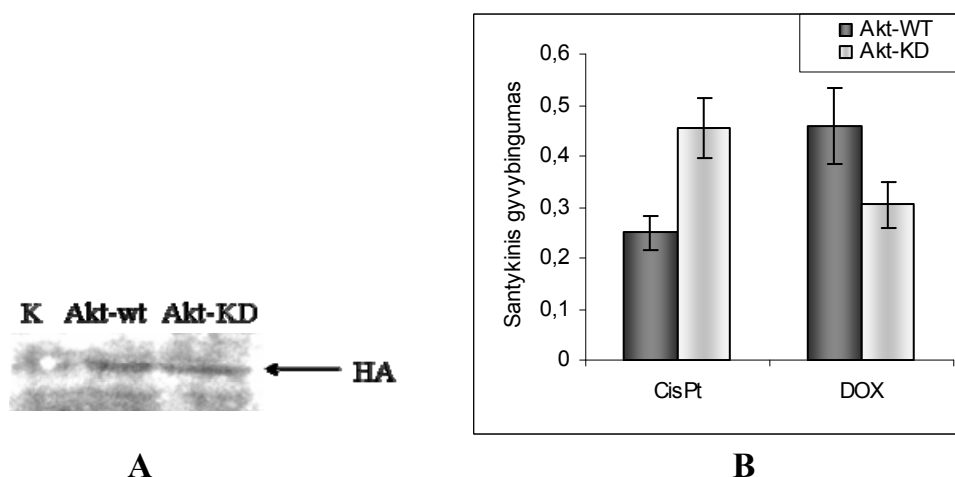
3.26 pav. PI3K/Akt signalinio kelio inhibitorių vaidmens miogeninių ląstelių apoptozėje tyrimas. PI3 bei Akt kinazių slopinimo įtaka miogeninių ląstelių apoptozėje, indukuotoje DOX (2.5 μ M, 24 val.) (A) ir CisPt (10 μ g/ml) (C) buvo tiriama tripano mėlio testu. B – PI3 kinazės slopinimo inhibitoriumi LY294002 įtaka miogeninių ląstelių žūčiai indukuotai NOC-18 (5 mM, 24 val.) bei H₂O₂ (1 mM, 24 val.) tirta MTT metodu (žr. 2.4 ir 2.5 skyrius). Pateikiamas mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkis \pm SN. Inhibitoriai pridėti 30 min. prieš paveikiant ląsteles apoptozės induktoriais.

paveiksle, B dalyje pateiktų duomenų matome, kad padidinta Akt raiška teigiamai veikia triušio miogeninių ląstelių gyvybingumą po DOX, NOC-18 bei H₂O₂ poveikių. Šiuo atveju, rasta daugiau gyvų ląstelių nei kontrolinėje populiacijoje, kurioje Akt lygis išliko nepakitęs, tuo tarpu ląstelės su padidintu Akt lygiu buvo jautresnės CisPt poveikiui. Tai patvirtino anksčiau mūsų gautus duomenis apie galimą proapoptozinį Akt vaidmenį CisPt indukuotoje miogeninių ląstelių apoptozėje.

Analogiškus rezultatus apie Akt vaidmenį gavome CisPt ir DOX indukuotoje apoptozėje ir kitu būdu genetiškai modifikuotose ląstelėse, kurios buvo gautos, panaudojus pSG5 ir pCMV vektorių pagrindu sukurtus konstruktus: padidintos *Akt* raiškos vektorių (HA-Ak-wt), kuriame *akt* genas yra sulietas su HA epitopo seka bei vektorių, turintį neaktyvų Akt variantą (HA-Akt-KD). Atrinkus geneticinui (atrankos agentas) atsparias ląsteles transfekcijos efektyvumą įvertinome imunoblotingo metodu pagal HA epitopo



3.27 pav. Padidintos Akt raiškos vaidmens tyrimas miogeninių ląstelių apoptozės reguliacijoje. **A** -Akt baltymo lygis ląstelėse, į kurias įvesta plazmidė puroBabe-Akt (Akt), bei kontrolinėse ląstelėse, į kurias įvesta plazmidė puroBabe-vekt., vertintas imunoblotingo metodu. Pateiktas tipinis vaizdas, gautas atlikus mažiausiai tris eksperimentus. **B** – Padidintos Akt raiškos įtaka miogeninių ląstelių gyvybingumui po 24 val. CisPt (10 $\mu\text{g/ml}$), DOX (2,5 μM), NOC-18 (5 mM) bei H₂O₂ (1 mM) poveikių tirta MTT metodu. Gauti rezultatai išreikšti santykinio gyvybingumu (žr. 2.4 ir 2.5 skyrių). Pateikiamas mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkis \pm SN, $P < 0.05$.



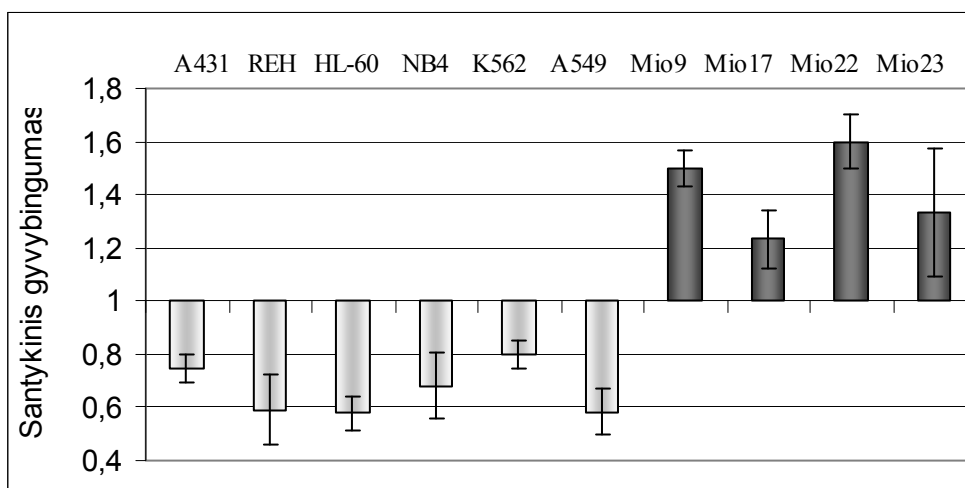
3.28 pav. PI3K/Akt signalinio kelio vaidmens tyrimas miogeninių ląstelių apoptozės reguliacijoje. **A** – transfekcijos efektyvumas pagal HA epitopo raišką kontrolinėse, netransfekuotose bei transfekuotose HA-Akt-wt bei HA-Akt-KD miogeninių ląstelių linijose, vertintas imunoblotingo metodu. Pateiktas tipinis vaizdas, gautas atlikus mažiausiai tris eksperimentus. **B** – Padidintos Akt raiškos įtaka miogeninių ląstelių gyvybingumui po 24 val. CisPt (10 $\mu\text{g/ml}$) ir DOX (2,5 μM) poveikių tirta MTT metodu. Gauti rezultatai išreikšti santykinio gyvybingumu (žr. 2.4 ir 2.5 skyrių). Pateikiamas mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkis \pm SN, $P < 0.02$.

raišką (3.28 pav., A). Paveikę gautas modifikuotas ląstelių linijas tiriamomis medžiagomis, nustatėme, kad HA-Akt-wt transfekuotos ląstelės (su padidinta

Akt raiška) buvo jautresnės CisPt bei atsparesnės DOX nei kontrolinės, turinčios neaktyvų Akt (HA-Akt-KD) (3.28 pav., B).

Visi šie rezultatai leidžia teigti, kad PI3K/Akt signalinis kelias dalyvauja CisPt indukuojamos apoptozinės miogeninių ląstelių žūties vystymesi. Literatūroje gausu duomenų apie priešingą - apsauginį, šio signalinio kelio vaidmenį CisPt sukeltos apoptozės metu. Nustatyta, kad PI3K/Akt signalinis kelias netgi dalyvauja atsparumo CisPt vystymesi vėžinėse ląstelėse (Gagnon ir kt., 2004). Todėl tolesnėje darbo dalyje pabandėme palyginti PI3K/Akt signalinio kelio vaidmenį CisPt indukuotoje apoptozėje įvairių vėžinių bei keleto pirminių miogeninių linijų ląstelėse. Tyrimuose buvo naudotos skirtingos navikinių linijų ląstelės. Tai - žmogaus eritroleukeminės HEL, promielocitinės leukemijos HL-60 ir NB4, chronininės mieloidinės leukemijos K562 ląstelės, o taip pat B-leukemijos REH limfoidinės ląstelės. Iš pastovių navikinių linijų ląstelių, augančių kultūroje ant substrato, tyrėme žmogaus plaučių epitelinės karcinomos A549 ir epidermoidinės karcinomos A431 linijų ląsteles. Buvo analizuojamas visų šių linijų ląstelių atsakas į CisPt poveikį, prieš tai PI3K/Akt signalinį kelią nuslopinus PI3K inhibitoriumi LY294002. Iš 3.29 paveiksle pateiktų duomenų matome, kad vėžinių linijų ląstelėse PI3K inhibitorius didina ląstelių žūtį, tuo metu, kai miogeninių linijų ląstelės po LY294002 poveikio tampa atsparesnės CisPt. Tai rodo apsauginį PI3K/Akt signalinio kelio veikimą vėžinėse ląstelėse ir proapoptozinį - miogeninėse. Ilgą laiką buvo manoma, kad šio signalinio kelio vaidmuo apoptozės indukcijoje yra išimtinai apsauginis ir tik neseniai pasirodė nuorodų apie galimą proapoptozinį PI3K/Akt signalinio kelio veikimą.

Taigi, mūsų gauti duomenys rodo, kad Akt signalinis kelias miogeninėse ląstelėse pasižymi antiapoptoziniu veikimu po įvairių apoptozės induktorių poveikio. Šio signalinio kelio aktyvumo didinimas galėtų pagerinti transplantuojamų ląstelių išgyvenimą patologijos židinyje. Tyrimo metu gauti nauji, tirtų kamieninių linijų ląstelėms būdingi, duomenys apie proapoptozinį PI3K/Akt kelio veikimą.



3.29 pav. PI3K kinazės inhibitoriaus LY294002 vaidmens palyginimas CisPt indukuotoje miogeninių bei vėžinių ląstelių apoptozėje. PI3 kinazės inhibitoriaus Ly294002 (20 μ M) įtaka vėžinių bei miogeninių ląstelių gyvybingumui po CisPt (10-15 μ g/ml, 24val.) buvo tiriama dažant ląsteles kristalvioletu (žr. 2.6 skyrių). Gauti rezultatai išreikšti santykinu gyvybingumu (žr. 2.4 ir 2.5 skyrių). Pateikiamas mažiausiai trijų nepriklausomų eksperimentų vidurkis \pm SN, $P < 0.05$. LY294002 veikta 30 min. prieš pridėdant CisPt. A431, A431, REH, HL60, NB4, K562 ir A459 yra vėžinės ląstelių linijos; Mio9, Mio17, Mio22 bei Mio23 – triušio miogeninių ląstelių linijos.

3.4. Rezultatų apibendrinimas

Viena iš dažniausiai minimų problemų, su kuria susiduriama ląstelių terapijos metu, yra nepakankama audinio regeneracija dėl didelės ląstelių žūties transplantacijos vietoje. Šiame darbe buvo tiriami suaugusio organizmo kamieninių miogeninių ląstelių žūties ir išgyvenimo molekuliniai mechanizmai, ieškoma signalinių molekulių, atsakingų už šių ląstelių išgyvenimą. Darbo metu iš triušio griaučių skersaruožio raumens buvo gautos pirmosios ląstelių linijos, pasižyminčios desmino bei aktyvintų satelitinių ląstelių žymens MyoD raiška, ir galinčios diferencijuotis į daugiabranduoles miozino sunkiąją grandinę (MHC) ekspresuojančias ląsteles. Įvertinus šių ląstelių proliferacinį potencialą nustatyta, kad jos gali būti ilgą laiką auginamos *in vitro* nesikeičiant jų proliferacinėms savybėms. Suaugusio organizmo ląstelių gebėjimas neribotai daugintis *in vitro* bei diferencijuotis į nulemtas ląsteles yra kamieninių ląstelių savybė. Mūsų 2005 m. paskelbti duomenys apie raumens kilmės ląstelių savybę neribotai daugintis *in vitro* yra nauji (Bukelskienė ir kt., 2005). Tais pačiais metais paskelbtame Deasy ir kt.

straipsnyje apie pelės kamieninių miogeninių ląstelių neribotą proliferacinį potencialą, nurodoma, kad iki šiol tokių duomenų nebuvo skelbta (Deasy ir kt., 2005). Iki klinikiniai miokardo regeneracijos tyrimai parodė mūsų gautų kamieninių ląstelių prigijimą išeminiame židinyje. Tai patvirtino šių ląstelių, kaip eksperimentinio modelio, skirto ląstelių transplantacijai, tinkamumą.

Taigi, mūsų gauti tyrimų rezultatai apie neribotą iš triušio raumens gautų ląstelių ląstelių proliferacinį potencialą *in vitro*, jų gebėjimą diferencijuotis miogenine kryptimi bei išlikimą po transplantacijos gyvūno širdyje daro šias ląsteles patraukliomis kardiomioplastijos tyrimuose. Iš mažo raumens gabalėlio, padauginus kultūroje, galima gauti didelį ląstelių kiekį, o neribotas šių ląstelių dauginimasis leidžia atlikti įvairias genetines manipuliacijas. Dėl to miogenines ląsteles galima naudoti įvairių, šių ląstelių atsparumą toksiniams poveikiams patologiniame židinyje sąlygojančių, genų įvedimui bei savybių tyrimui.

Viena iš svarbiausių transplantuotų ląstelių išgyvenimo sąlygų - atsparumas ląstelių žūtį (apoptozę ar nekrozę) indukuojantiems veiksniais. Apoptozė yra neatsiejama įvairių širdies susirgimų dalis, tačiau jos mechanizmai, tiek patologiniame židinyje širdies raumenyje, tiek mioblastų ar širdies miocitų kultūroje yra vis dar neaiškūs (Elsasser ir kt., 2001). Taigi, transplantacijai skirtų kamieninių ląstelių apoptozės mechanizmų tyrimams pasirinkome uždegiminius citokinus – TNF- α ir IL-6 bei kardiotoksiniu veikimu pasižyminčias medžiagas – cisplatiną, doksorubiciną, NO donorą (NOC-18) ir vandenilio peroksidą. Tirdami TNF- α poveikį nustatėme, kad jis neveikė miogeninių ląstelių gyvybingumo ir net nežymiai stimuliavo jų proliferaciją. Tik po ilgesnio – 72 val., poveikio buvo stebimas ląstelių dauginimosi sulėtėjimas. Literatūroje yra duomenų apie tai, kad trumpalaikis TNF- α veikimas skatina išgyvenimą bei proliferaciją, kuri priklauso nuo ilgalaikės JNK kinazės aktyvacijos (Stewart ir kt., 2003), tačiau mes tokios priklausomybės negavome. JNK inhibicija, kaip ir naujų baltymų sintezės slopinimas, triušio miogeninių ląstelių jautrumo TNF- α nepadidino.

IL-6 vaidmuo širdies ligų patologijoje nėra aiškus, bet labiau linkstama prie proliferaciją skatinančio, antiapoptozinio jo veikimo aiškinimo (Craig ir kt., 2000; Coles ir kt., 2005; Wollert ir Drexler, 2001). Taip pat yra duomenų, kad įvykus raumens pažeidimui, IL-6 skatina nekrozinio audinio degradaciją, sinchronizuoja satelitinių ląstelių ciklą, nedidindamas jų proliferacijos greičio, bei stimuliuoja makrofagų apoptozę (Hawke ir Garry, 2001). Mūsų tiriamoje sistemoje IL-6 neturėjo įtakos ląstelių gyvybingumui, tačiau ir ženklus proliferaciją skatinančio vaidmens nenustatyta.

Žinoma, kad didžioji dalis transplantuotų ląstelių žūva pirmosiomis dienomis po jų persodinimo, o jau po 24 val. prasideda likusių gyvų ląstelių dauginimasis. Todėl tiriamos miogeninės ląstelės buvo veikiamos apoptozės induktoriais kitą dieną po jų išsėjimo. Apoptozei sukelti naudojome chemoterapines medžiagas – cisplatiną (CisPt) ir doksorubiciną DOX) bei patofiziologinį kardiotoksiškumą imituojančias medžiagas – azoto oksido donorą NOC-18 bei oksidacinį stresą sukeltantį vandenilio peroksidą (H_2O_2). Šių medžiagų indukuojama apoptozinė ląstelių žūtis buvo patvirtinta bei įvertinta kiekybiškai, derinant morfologinius ir biocheminius apoptozės nustatymo metodus. Gauti duomenys parodė, kad CisPt, DOX, NOC-18 bei H_2O_2 , priklausomai nuo dozės stabdė tirtų ląstelių proliferaciją bei indukavo apoptozinę jų žūtį. Nustatytos apoptozės induktorių koncentracijos, po 24 val. poveikio sukeliančios 40-60 % miogeninių ląstelių žūtį, kurios buvo naudojamos tolimesniuose signalinių molekulių vaidmens tyrimuose.

Taigi, pirmą kartą buvo įvertintas kamieninių miogeninių linijų ląstelių jautrumas galimiems toksiniams poveikiams pažeistame širdies raumenyje, charakterizuotas ląstelių žūties pobūdis. Gautos žinios apie ląstelių žūties charakteristikas yra svarbios tiriant molekulinis kamieninių miogeninių ląstelių žūties mechanizmus.

Siekiant pagerinti miogeninių ląstelių išgyvenimą patologiniame židinyje svarbu išsiaiškinti signalines molekules ir kelius, apsprendžiančius ląstelių išgyvenimą ir žūtį. Tuo tikslu tyrėme mitogenų aktyvinamų kinazių

(MAPK) bei PI3/Akt signalinių molekulių vaidmenį kardiotoksinių veikimu pasižyminčių medžiagų indukuojamoje apoptozėje, naudodami biocheminius ir genetinius metodus. ERK MAP kinazės bei Akt kinazės vaidmuo ląstelių proliferacijoje yra gerai žinomas bei siejamas su teigiamų ląstelės ciklo reguliatorių stimuliacija ir antiproliferacinių genų slopinimu. Streso aktyvinamos MAP kinazės – JNK ir p38, dažniau siejamos su apoptozės pasireiškimu, tačiau jų vaidmuo ląstelių proliferacijoje ir išgyvenime taip pat yra žinomas. Specifiškai slopindami MAP kinazių bei Akt kinazės veikimą, mes parodėme šių kinazių svarbą griaučių miogeninių ląstelių proliferacijai – ERK, JNK, p38 bei Akt kinazių inhibitoriai stabdė kamieninių miogeninių ląstelių dauginimąsi *in vitro*. Literatūroje yra duomenų apie šių mūsų tirtų kinazių reikalingumą kitų rūšių ląstelių proliferacijoje. Žinoma ne tik apie ERK ir Akt, bet ir apie streso aktyvinamų kinazių - p38 bei JNK, vaidmenį ląstelių dauginimesi. Parodyta, kad bazinio JNK lygio slopinimas tiesiogiai yra susijęs su ląstelių proliferacijos slopinimu (Du ir kt., 2004). Kiti šaltiniai teigia, kad tik aktyvinta JNK dalyvauja proliferacijos skatinime, ir šis aktyvinimas nėra susijęs su apoptozės stimuliacija (Smith ir kt., 1997). p38 MAPK yra svarbi ląstelės ciklo reguliacijai G1 ir G2/M stadijose bei UV indukuotam ląstelės ciklo stabdymui G2 stadijoje (Wang ir kt., 2000; Zarubin ir Han, 2005).

Žinoma, kad MAPK šeimai priklausančios kinazės ERK, JNK bei p38 MAPK dalyvauja įvairių procesų širdyje reguliavime. Ekstraląstelinio signalo reguliuojama kinazė ERK paprastai yra aktyvinama augimo faktorių bei hipertrofinių agentų ir yra siejama su ląstelių išgyvenimu, tačiau yra duomenų apie ERK dalyvimą streso atsake bei ląstelės žūties procesuose (Werlen ir kt., 2003; Zhuang ir kt., 2007). Mūsų rezultatai parodė, kad ERK signalinis kelias gali apsaugoti raumeninės kilmės kamienines ląsteles nuo daugelio apoptozės induktorių poveikio. Mes nustatėme, kad miogenines ląsteles nuo kardiotoksinių medžiagų poveikio apsaugančiu veikimu pasižymi ir kita MAPK - p38, kuri yra dažniau siejama su apoptozės indukcija. Literatūroje yra duomenų ir apie apsauginį p38 MAP kinazės vaidmenį, kuris siejamas su

trumpalaikiu šios kinazės fosforilimu/aktyvinimu. Žinoma, kad ankstyvas šios kinazės aktyvinimas apsaugo kai kurių rūšių ląsteles nuo TNF- α sukeltos apoptozinės ląstelių žūties (Lenassi ir Plemenitaš, 2006; Zechner ir kt., 1998). Mūsų atveju, ankstyvas ir trumpalaikis p38 kinazės fosforilimas buvo registruojamas tik po vandenilio peroksido poveikio ir jis koreliavo su apsauginiu šios kinazės veikimu. Kitais atvejais ryškesnių p38 MAP kinazės raiškos ir aktyvinimo pokyčių po tirtų medžiagų poveikių nenustatėme. Gali būti, kad miogenines ląsteles apsaugoti nuo kardiotoksinių medžiagų indukuojamos ląstelių žūties pakanka mūsų registruotos bazinės šios kinazės aktyvacijos.

Literatūroje JNK vaidmuo dažniausiai siejamas su jos dalyvavimu apoptozės indukcijoje, tačiau JNK gali dalyvauti ir apsaugant ląsteles nuo žūties. Paprastai skirtingas JNK signalinio kelio vaidmuo - proapoptozinis ar antiapoptozinis, aiškinamas skirtinga šios kinazės bei žemiau esančių jos taikinių aktyvinimo trukme, stiprumu, o taip pat gali priklausyti nuo poveikio prigimties bei ląstelių rūšies. Miokarde JNK aktyvacija išemijos metu lemia kardiomiocitų žūtį, kuri siejama su JNK sąlygojamu citochromo c išlaisvinamu iš mitochondrijų bei kaspazės 9 aktyvacija (Aoki ir kt., 2002; Engelbrecht ir kt., 2004; Qin ir kt., 2003). Tačiau yra žinoma ir apie JNK dalyvavimą apsaugant kardiomiocitus nuo NO indukuojamos ląstelių žūties. Nustatyta, kad šį JNK vaidmenį lemia trumpalaikė jos aktyvacija (Andreka ir kt., 2001). Literatūroje vyrauja nuomonė, kad ilgalaikis JNK, kaip ir p38, MAP kinazės aktyvinimas yra siejamas su apoptozės indukcija ir vystymusi, o trumpalaikis nulemia ląstelių išgyvenimą (Mansouri ir kt., 2003; Lou ir kt., 2005; Tobiume ir kt., 2001). Tirdami JNK signalinio kelio vaidmenį kamieninių miogeninių linijų ląstelių apoptozėje nustatėme, kad chemoterapinių/genotoksinių medžiagų cisplatinos ir doksorubicino indukuojamas vėlyvas ir ilgalaikis JNK fosforilimas/aktyvinimas koreliuoja su proapoptoziniu šios kinazės veikimu. Ir atvirkščiai, ankstyvas ir trumpalaikis JNK fosforilimas bei apsauginis JNK vaidmuo buvo nustatytas po vandenilio peroksido poveikio. Priešingai, azoto oksido donoras NOC-18 indukavo ilgalaikį JNK fosforilinimą, bet, taip pat,

kaip ir vandenilio peroksido atveju, buvo nustatytas antiapoptozinis JNK vaidmuo. Taigi, JNK dalyvauja apsaugant miogenines ląsteles nuo patofiziologinių apoptozės induktorių poveikio, nors šios kinazės aktyvinimo kinetika po NOC-18 poveikio skyrėsi nuo vandenilio peroksido ir neatitiko literatūroje iškelto hipotezės, apie tai, kad ilgalaikis streso kinazių aktyvinimas yra susijęs su jų proapoptoziniu veikimu ir, atvirkščiai, trumpalaikis - lemia apsauginį vaidmenį. Tiesa, ne visada ir trumpalaikis JNK aktyvinimas yra susijęs su antiapoptoziniu jos veikimu – žinoma, kad trumpai aktyvuota JNK po NO donoro SNAP poveikio lemia žiurkių kardiomiocitų apoptozę (Taimor ir kt., 2001).

Ar JNK aktyvinimo pobūdis bei jos vaidmuo apoptozėje priklauso nuo ląstelių rūšies bei apoptozės induktoriaus, tyrėme pasirinkę kitą modelinę sistemą – JNK fosforilinimą bei jos vaidmenį apoptozėje lyginome miogeninių bei leukeminių Jurkat ir REH linijų ląstelėse po mikotoksino deoksinivalenolio poveikio. Žinoma, kad šis mikotoksinas ląstelėse indukuoja MAPK fosforilinimą ir apoptozę. Mūsų gauti rezultatai parodė, kad tas pats induktorius skirtingos kilmės ląstelėse gali sąlygoti skirtingos trukmės JNK MAP kinazės aktyvinimą. JNK aktyvinimo pobūdis ir vaidmuo apoptozėje šiuo atveju atitiko literatūroje priimtą nuostatą – ilgalaikis JNK fosforilinimas miogeninėse ląstelėse buvo susijęs su apoptozės indukcija, o trumpalaikis poveikis, leukeminėse ląstelėse, pasižymėjo apsauginiu arba neutraliu veikimu.

Mes parodėme, kad JNK dalyvauja indukuojant apoptozę miogeninėse ląstelėse po genotoksinių medžiagų CisPt ir DOX poveikio. Norėdami išsiaiškinti apoptozės indukcijos mechanizmus miogeninės ląstelėse, tyrėme kitus galimus šio signalinio kelio komponentus bei JNK taikinius. Vienas pagrindinių JNK taikinių - protoonkogeno *c-jun* koduojamas baltymas. Literatūroje yra daug duomenų apie c-Jun vaidmenį apoptozėje - tiek proapoptozinį, tiek ir antiapoptozinį. c-Jun reikalingas apoptozei vykstančiai simpatiniuose neuronuose po nervų augimo faktoriaus (NGF) pašalinimo, o kaip proapoptozinis veiksnys c-Jun funkcionuoja ir širdies raumeniniame audinyje išemijos metu (Sato ir kt., 2001; Wang ir kt., 1999). Mes nustatėme c-

Jun baltymo raiškos bei jo fosforilinimo/aktyvinimo padidėjimą po genotoksinių medžiagų poveikio, kuris priklausė nuo JNK aktyvumo. Siekdami nustatyti c-Jun vaidmenį apoptozėje, genetiniais metodais didinome ir mažinome jo kiekį ląstelėse. Gauti duomenys parodė c-Jun dalyvavimą kardiotoksinių medžiagų indukuojamoje miogeninių ląstelių apoptozėje. Taigi galima teigti, kad JNK miogeninėse ląstelėse apoptozės indukcijoje dalyvauja fosforilindama transkripcijos komplekso AP-1 komponentą - c-Jun.

Yra žinoma, kad vienas iš transkripcijos veiksnio c-Jun taikinių, dalyvaujančių apoptozės indukcijoje, yra Fas ligandas (FasL). Su FasL raiškos aktyvinimu paprastai siejamama JNK signalinio kelio ilgalaikio aktyvinimo svarba apoptozės indukcijoje. Visa tai ląsteles veda link apoptozės – inicijuojamas išorinis apoptozės kelias (Mansouri ir kt., 2003). Mūsų tyrimai, panaudojant antikūnus prieš FasL receptorių Fas (tai imitavo FasL veikimą), bei specifinius kaspazių 3, 8, ir 9 inhibitorius, parodė, kad apoptozės indukcijoje miogeninėse ląstelėse po genotoksinių medžiagų poveikio dalyvauja tiek išorinis, receptorinis, tiek ir vidinis, mitochondrinis, keliai. Tačiau, įvertinę FasL raišką po kardiotoksinių medžiagų poveikio, mes nenustatėme FasL baltymo lygio pasikeitimų, t.y., JNK/c-Jun kelio aktyvinimas miogeninėse ląstelėse apoptozės metu FasL raiškos nekeitė.

Siekiant pagerinti miogeninių ląstelių išgyvenimą po kardiotoksinių poveikių, pirmiausia kreipiamas dėmesys į PI3K/Akt signalinį kelią, kuris paprastai siejamas su apsauginiu, antiapoptoziniu jos vaidmeniu ląstelėse. Nustatyta, kad šis signalinis kelias dalyvauja apsaugant kardiomiocitus nuo apoptozės išemijos metu *in vivo* (Fujio ir kt., 2000). Kitais duomenimis, PI3K/Akt signalinis kelias gali ir nedalyvauti miogeninių ląstelių išgyvenime, o pastaraisiais metais pasirodė straipsnių ir apie galimą jo proapoptozinį veikimą (Fedier ir kt., 2006; van Gorp ir kt., 2006; Stewart ir kt., 2004). Mes nenustatėme Akt bei jo taikinio GSK3 aktyvinimo po apoptozės induktorių poveikio, bet parodėme, kad kamieninėse miogeninėse ląstelėse yra pastoviai aukštas Akt fosforilinimo lygis. Biocheminiais ir genetiniais metodais parodėme, kad Akt signalinis kelias dalyvauja apsaugant miogenines ląsteles

nuo įvairių kardiotoksiškumu pasižyminčių apoptozės induktorių poveikio. Tyrimo metu gauti nauji duomenys apie galimą proapoptozinį PI3K/Akt kelio veikimą kamieninių miogeninių linijų ląstelėse cisplatinos indukuotos apoptozės metu.

Taigi, ERK, p38, JNK MAPK bei Akt kinazės yra reikalingos kamieninių miogeninių ląstelių proliferacijai bei gali dalyvauti apsaugant šias ląsteles nuo apoptozę indukuojančių patofiziologinių veiksnių poveikio. Šių signalinių molekulių aktyvinimas ląstelių transplantacijos metu galėtų pagerinti transplantuojamųjų ląstelių išgyvenimą patologijos židinyje.

IŠVADOS

- Iš triušio griaučių raumens gautos miogeninės ląstelių linijos pasižymi kamieninėms ląstelėms būdingomis savybėmis - neribotu proliferaciniu potencialu bei gebėjimu, net ir po ilgalaikio auginimo *in vitro*, diferencijuotis miogenine linkme.
- Kardiotoksinu veikimu pasižymintios medžiagos - vandenilio peroksidas, NO donoras NOC-18 bei chemoterapiniai agentai - cisplatina ir doksorubicinas, indukuoja apoptozinę miogeninių ląstelių žūtį. Tuo tarpu uždegiminiai citokinai – TNF- α bei IL-6, šių ląstelių gyvybingumui įtakos neturi.
- Signalinės molekulės - MAP kinazės ERK, p38 ir JNK bei Akt kinazė, yra skirtingai aktyvinamos/fosforilinamos po apoptozės induktorių poveikio; individualių signalinių molekulių aktyvinimo pobūdis skiriasi priklausomai nuo indukuojančios medžiagos.
- Mitogenų aktyvinamos kinazės ERK bei p38 pasižymi apsauginiu veikimu kardiotoksinių medžiagų indukuotoje miogeninių ląstelių apoptozėje. JNK MAP kinazės vaidmuo šių ląstelių apoptozėje priklauso nuo poveikio ir gali būti tiek apoptozę stimuliuojantis, tiek ir ją slopinantis. Transkripcijos veiksnys c-Jun, pagrindinis JNK taikinytis branduolyje, miogeninėse ląstelėse pasižymi proapoptoziniu veikimu.
- Akt signalinis kelias miogenines ląsteles apsaugo nuo įvairių apoptozės induktorių poveikio. Tačiau, kamieninių ląstelių ląstelėse galimas ir proapoptozinis PI3K/Akt kelio veikimas.
- ERK, p38, JNK MAPK bei Akt kinazės yra svarbios miogeninių ląstelių proliferacijai, todėl jų aktyvumo padidinimas transplantuojamose ląstelėse galėtų pagerinti šių ląstelių išgyvenimą patologiniame židinyje.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Adams, J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 2003; 17: 2481–2495.
- Afford, S. C., Pongracz, J., Stockley, R. A., Crocker J., Burnett, D. The induction by human interleukin-6 of apoptosis in the promonocytic cell line U937 and human neutrophils. *J Biol Chem* 1992; 267: 21612-21616.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 7915-7922.
- Andjelković, M., Jakubowicz, T., Cron, P., Ming, X.-F., Han, J. H., Hemmings, B. A. Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *PNAS USA* 1996; 93: 5699-5704.
- Andreka, P., Tran, T., Webster, K. A., Bishopric, N. H. Nitric oxide and promotion of cardiac myocyte apoptosis. *Mol Cell Biochemistry* 2004; 263: 35-53.
- Andreka, P., Zhang, J., Dougherty, C., Slepak, T. I., Webster, K. A., Bishopric, N. H. Cytoprotection by Jun kinase during nitric oxide-induced cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 2001; 88: 305-312.
- Al-Rubeai, M. and Singh, R.P. Apoptosis in cell culture. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9: 152-156.
- Al-Shanti, N., Saini, A., Faulkner, S. H., Stewart, C. E. Beneficial synergistic interactions of TNF- α and IL-6 in C2 skeletal myoblasts-potential cross-talk with IGF system. *Growth Factors* 2008; 26: 61-73.
- Alter, J., Rozentzweig, D., Bengal, E. Inhibition of myoblast differentiation by TNF- α is mediated by c-Jun N-terminal kinase 1 and leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem* 2008; 283: 23224-23234.
- Aoki, H., Kang, P. M., Hampe, J., Yoshimura, K., Noma, T., Matsuzaki, M., Izumo, S. Direct activation of mitochondrial apoptosis machinery by c-Jun N-terminal kinase in adult cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2002; 277: 10244-10250.
- Arstall, M. A., Sawyer, D. B., Fukazawar, R., Kelly, A. Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: The role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. *Circ Res* 1999; 85: 829-840.
- Asada, S., Fukuda, K., Nishisaka, F., Matsukawa, M., Hamanisi, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis of chondrocytes; involvement of calcium ion and extracellular signal-regulated protein kinase. *Inflamm Res* 2001; 50: 19-23.
- Asakura, A. Stem cells in adult skeletal muscle. *TMC* 2003; 13: 123-128.
- Bajaj, G. and Sharma, R. K. TNF- α -mediated cardiomyocyte apoptosis involves caspase-12 and calpain. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345: 1558-1564.
- Baltriukiene, D., Kalvelyte, A., Bukelskiene, V. Induction of apoptosis and activation of JNK and p38 MAPK pathways in the deoxynivalenol-treated model cell lines. *ATLA* 2007; 35: 53-59.
- Barišić, K., Petrik, J., Rumora, L. Biochemistry of cell death. *Acta Pharm.* 2003; 53: 151-164.
- Beauchamp, J. R., Heslop, L., Yu, D. S., Tajbakhsh, S., Kelly, R. G., Wernig, A., Buckingham, M. E., Partridge, T. A., Zammit, P. S. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. *J Cell Biol* 2000; 151(6): 1221-1234.
- Beauchamp, J. R., Morgan, J.E., Pagel, C. N., Partridge, T. A. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol* 1999; 144: 1113-1122.

- Behrens, A., Sibia, M., David, J.-P., Möhle-Steinlein, U., Troche, F., Schütz, G., Wagner, E.F. Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J* 2002; 21:1782-1790.
- Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., Leri, A., Kajstura, J., Nadal-Ginard, B., Anversa, P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114: 763-776.
- Berndt, N. Protein dephosphorylation and the intracellular control of the cell number. *Front Biosci* 1999; 4: d22-42.
- Berndtsson, M., Hägg, M., Panaretakis, T., Havelka, A. M., Shoshan, M. C., Linder, S. Acute apoptosis by cisplatin requires induction of reactive oxygen species but is not associated with damage to nuclear DNA. *Int J Cancer* 2006; 120: 175–180.
- Binétruy, B., Heasley, L., Bost, F., Caron, L., Aouadi, M. Concise review: regulation of embryonic stem cell lineage commitment by mitogen-activated protein kinases. *Stem Cells* 2007; 25:1090 –1095.
- Bironaitė, D., Kalvelytė, A. V., Imbrasaitė, A., Stulpinas, A. The intracellular antioxidant balance of HL-60 cells and its implication in the apoptosis induced by quinoidal compounds. *Biologija* 2004; 1: 48-51.
- Bischoff, R., 1994. The satellite cell and muscle regeneration. In: Engel, A.G. and Franzini-Armstrong, C., Editors, 1994. *Myogenesis*, McGraw-Hill, New York 97–118.
- Bishopric, N. H., Andrecka, P., Slepak, T., Webster, K. A. Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte. *Curr Opin Pharmacol* 2001; 1: 141-150.
- Blanco, F. J., Ochs, R. L., Schwarz, H., Lotz, M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am J Pathol* 1995; 146: 75–85.
- Blatt, N. B. and Glick, G. D. Signaling pathways and effector mechanisms pre-programmed cell death. *Bioorg Med Chem* 2001; 9:1371-1384.
- Blum, A. and Miller, H. Pathophysiological role of cytokines in congestive heart failure. *Ann Rev Med* 2001; 52: 15-27.
- Bossy-Wetzell, E., Bakiri, L., Yaniv, M. Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *EMBO J* 1997; 16: 1695-1709.
- Bost, F., McKay, R., Bost, M., Potapova, O., Dean, N. M., Mercola, D. The Jun kinase 2 isoform is preferentially required for epidermal growth factor-induced transformation of human A549 lung carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1938-1949.
- Bost, F., Caron, L., Marchetti, I., Dani, C., Le Marchand-Brustel, Y., Binétruy, B. Retinoic acid activation of the ERK pathway is required for embryonic stem cell commitment into the adipocyte lineage. *Biochem J* 2002; 361: 621-627.
- Brack, A. S., Bildsoe, H., Hughes, S. M. Evidence that satellite cell decrement contributes to preferential decline in nuclear number from large fibres during murine age-related muscle atrophy. *J Cell Sci* 2005; 118: 4813-4821.
- Bragado, P., Armesilla, A., Silva, A., Porras, A. Apoptosis by cisplatin requires p53 mediated p38a MAPK activation through ROS generation. *Apoptosis* 2007; 12: 1733–1742.
- Brantley-Finley, C., Lyle, C. S., Du, L., Goodwin, M. E., Hall, T., Szwed, D., Kaushal, G. P., Chambers, T.C. The JNK, ERK and p53 pathways play distinct roles in apoptosis mediated by antitumor agents vinblastine, doxorubicin and etoposide. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 459-469.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., Greenberg, M. E. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999; 96: 857-868.
- Buchkovich, K. J. and Ziff, E. B. Nerve growth factor regulates the expression and activity of p33cdk2 and p34cdc2 kinases in PC12 pheochromocytoma cells. *Mol Biol Cell* 1994; 5: 1225–41.

- Buckingham, M. and Relaix, F. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 645-673.
- Bukelskienė, V., Baltriukienė, D., Bironaitė, D., Imbrasaitė, A., Širmenis, R., Balčiūnas, M., Žurauskas, E., Kalvelytė, A. Muscle-derived primary stem cell lines for heart repair. *Semin Cardiol* 2005; 11: 99-105.
- Burgering, B. M. & Coffey, P. J. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*. 1995; 376:599–602.
- Cabane, C., Englaro, W., Yeow, K., Ragno, M., Dérijard, B. Regulation of C2C12 myogenic terminal differentiation by MKK3/p38 α pathway. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284: C658-C666.
- Callsen, D. and Brune, B. Role of mitogen-activated protein kinases in S-nitrosoglutathione-induced macrophage apoptosis. *Biochemistry* 1999; 38: 2279-2286.
- Caporossi, D., Ciafre, S. A., Pittaluga, M., Savini, I., Farace, M. G. Cellular responses to H₂O₂ and bleomycin-induced oxidative stress in L6C5 rat myoblasts. *Free Rad Biol Med* 2003; 35: 1355-1364.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S., Reed, J. C. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 1998; 282: 1318-1321.
- Chae, H. J., Kim, H. R., Kwak, Y. G., Ko, J. K., Joo, C. U., Chae, S. W., Chae, S.-W. Signal transduction of nitric oxide donor-induced protection in hydrogen peroxide-mediated apoptosis in H9C2 cardiomyoblasts. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001; 23: 187-204.
- Chang, L. and Karin, M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 2001; 140, 37-40.
- Charge, S.B. and Rudnicki, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 2004; 84: 209-238.
- Chen, C.Y., Gherzi, R., Andersen, J.S., Gaietta, G., Jurchott, K., Royer, H.D., Mann, M., Karin, M. Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev*. 2000; 14:1236-48.
- Chen, S.-E., Gerken, E., Zhang, Y., Zhan, M., Mohan, R. K., Li, A. S., Reid, M. B., Li, Y.-P. Role of TNF- α signaling in regeneration of cardiotoxin-injured muscle. *Am J Cell Physiol Cell Physiol* 2005; 289: C1179-C1187.
- Chen, S.-E., Jin, B., Li, Y.-P. TNF- α regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C1660-C1671.
- Chen, Y., Ke, Q., Yang, Y., Rana, J. S., Tang, J., Morgan, J. P., Xiao, Y.-F. Cardiomyocytes overexpressing TNF- α attract migration of embryonic stem cells via activation of p38 and c-Jun amino-terminal kinase. *FASEB J* 2003; 17: 2231-2239.
- Chen Y.-R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R. Tan, T.-H. The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and γ -radiation. *J Biol Chem*. 1996; 50: 31929–31936.
- Chen, Z., Chua, C. C., Ho, Y.-S., Hamdy, R. C., Chua, B. H. L. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H2313-H2320.
- Christopherson, K. S. and Bredt, D. S. Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J Clin Invest* 1997; 100: 2424-2429.
- Ciesielska, E., Studzian, K., Zyner, E., Ochocki, J., Szmigiero, L. DNA damage and apoptosis induction in L1210 cells by cis-DDP and its aminoflavone analogue. *Cell Mol Biol Lett* 2000; 5: 441-450.

- Clifton, A. D., Young, P. R., Cohen, P. A comparison of the substrate specificity of MAPKAP kinase-2 and MAPKAP kinase-3 and their activation by cytokines and cellular stress. *FEBS Lett* 1996; 392: 209–214.
- Choi, J., Yip-Schneider, M., Albertin, F., Wiesenauer, C., Wang, Y., Schmidt, C. M. The effect of doxorubicin on MEK-ERK signaling predicts its efficacy in HCC. *J Surg Res* 2008;
- Choukroun, G., Hajjar, R., Fry, S., del Monte, F., Hag, S., Guerrero, J. L., Picard, M., Rosenzweig, A., Force, T. Regulation of cardiac hypertrophy in vivo by stress-activated protein kinases/c-Jun NH(2)-terminal kinases. *J. Clin Invest.* 1999, 104: 391-398.
- Christoforou, N. and Gearhart, J. D. Stem cells and their potential in cell-based cardiac therapies. *Progr Cardiovasc Dis* 2007; 49: 396-413.
- Cobb, M.H. and Schaefer, E.M. MAP kinase signaling pathways. *Promega Notes Magazine* 1996; 59: 37-41.
- Coles, J. G., Boscarino, K., Takahashi, M., Grant, D., Changa, A., Ritter, J., Dai, X., Du, C., Musso, G., Yamabi, H., Goncalves, J., Kumar, A. S., Woodgett, J., Lu, H., Hannigan, G. Cardioprotective stress response in the human fetal heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 129: 1128-1136.
- Collins, C. A. Satellite cell self-renewal. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 301-306.
- Collins, R.A. and Grounds, M. D. The role of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in skeletal muscle regeneration. Studies in TNF- α ^(-/-) and TNF- α ^(-/-)/LT- α ^(-/-) mice. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 989–1001.
- Colston, J. T., de la Rosa, S. D., Freeman, G. L. Impact of brief oxidant stress on primary adult cardiac fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 316: 256-262.
- Cook, S. A., Sugden, P. H., Clerk, A. Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 1429-1434.
- Coolican, S. A., Samuel, D. S., Ewton, D. Z., McWade, F. J., Florini, J. R. The Mitogenic and Myogenic Actions of Insulin-like Growth Factors Utilize Distinct Signaling Pathways. *J Biol Chem* 1997; 272: 6653-6662.
- Cooper, R. N., Butler-Browne, G. S., Mouly, V. Human muscle stem cells. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 295-300.
- Cornelison, D. D., Filla, M. S., Stanley, H. M., Rapraeger, A. C., Olwin, B. B. Syndecan-3 and syndecan-4 specifically mark skeletal muscle satellite cells and are implicated in satellite cell maintenance and muscle regeneration. *Dev Biol* 2001; 239: 79-94.
- Cornelison, D. D., Wilcox-Adelman, S. A., Goetinck, P. F., Rauvala, H., Rapraeger, A. C., Olwin, B. B. Essential and separable roles for syndecan-3 and syndecan-4 in skeletal muscle development and regeneration. *Genes & Dev* 2004; 18: 2231-2236.
- Cornelison, D. D. and Wold, B. J. Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal satellite cells. *Dev Biol* 1997; 191: 270-283.
- Colvin, M. Alkylating agents and platinum antitumor compounds. Holland, J. F. Frei, E., Kufe, D.W., Weichselbaum R. R., Pollock, R.E. eds. *Cancer Medicine*, B.C. Decker Inc. 5th ed. 2000; 648-669.
- Cowan, K. J. and Storey, K. B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol* 2003; 206: 1107-1115.
- Craig, R., Larkin, A., Mingo, A. M., Thuerauf, D. J., Andrews, C., McDonough, P. M., Glembotski, C. C. P38 MAPK and NF-kappa B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. Evidence for a cytoprotective autocrine signaling pathway in a cardiac myocyte model system. *J Biol Chem* 2000; 275: 23814-23824.
- Cuenda, A. and Cohen, P. Stress-activated protein kinase-2/p38 and a rapamycin-sensitive pathway are required for C2C12 myogenesis. *J Biol Chem* 1999; 274: 4341-4346.

- Cui, S., Reichmer, J. S., Mateo, R. B., Albina, J. E. Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer Res* 1994; 54: 2462–2467.
- Cutts, S. M., Parsons, P. G., Sturm, R. A., Philip, R. Adriamycin-induced DNA adducts inhibit the DNA interactions of transcription factors and RNA polymerase. *J Biol Chem* 1996; 271: 5422-5429.
- Cutts, S. M., Swift, L. P., Rephaeli, A., Nudelman, A., Phillips, D. R. Sequence specificity of adriamycin-DNA adducts in human tumor cells. *Mol Cancer Ther* 2003; 2: 661-670.
- D'Autréaux, B. and Toledano, M. B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 813-824.
- Danial, N. N. and Korsmeyer, S. J. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116: 205–219.
- Datta, S. R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., Greenberg, M. E. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 1997; 91: 231–241.
- Davis, R. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 1993; 268: 14553-14556.
- Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000; 103: 239-252.
- Deasy, B. M., Gharaibeh, B. M., Pollett, J. B., Jones, M. M., Lucas, M. A., Kanda, Y., Huard, J. Long-term self-renewal of postnatal muscle-derived stem cells. *Mol Biol* 2005; 16: 3323-3333.
- De Falco, G., Comes, F., Simone, C. pRb: master of differentiation. Coupling irreversible cell cycle withdrawal with induction of muscle-specific transcription. *Oncogene* 2006; 25: 5244-5249.
- DeGraff, W., Hahn, S. M., Mitchell, J.B., Krishna, M. C. Free radical modes of cytotoxicity of adriamycin and streptonigrin. *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 1427-1435.
- DeMeester, S. L. Qiu, Y., Buchman, T., Hotchkiss, R., Dunnigan, K., Karl, I., Cobb, J. P. Nitric oxide inhibits stress-induced endothelial cell apoptosis. *Crit Care Med* 1998; 26: 1500-1509.
- DeZutter, G. S. and Davis, R. J. Pro-apoptotic gene expression mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6168-6173.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., Kolch, W. MAP kinase signaling pathways in cancer. *Oncogene* 2007; 26: 3279–3290.
- Dominov, J. A., Dunn, J. J., Miller, J. B. Bcl-2 expression identifies an early stage of myogenesis and promotes clonal expansion of muscle cells. *J Cell Biol* 1998; 142: 537-544.
- Dougherty, C. J., Kubasiak, L.A., Prentice, H., Andreka, P., Bischoptic, N. H., Webster, K. A. Activation of c-Jun N-terminal kinase promotes survival of cardiac myocytes after oxidative stress. *Biochem J* 2002; 362: 561-571.
- Du, L., Lyle, C. S., Obey, T. B., Gaarde, W. A., Muir, J. A., Bennett, B. L., Chambers, T. C. Inhibition of cell proliferation and cell cycle progression by specific inhibition of basal JNK activity. *J Biol Chem* 2004; 279: 11957-11966.
- Dumont, A., Hehner, S. P., Hofmann, T. G., Ueffing, M., Dröge, W., Schmitz, M. L. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-κB. *Oncogene* 1999; 18: 747-757.
- Eferl, R., Ricci, R., Kenner, L., Zenz, R., David, J.-P., Rath, M., Wagner, E. F. Liver tumor development: c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* 2003; 112: 181-192.

- El Naggar, E. A., Kanda, F., Okuda, S., Maeda, N., Nishimoto, K., Ishihara, H., Chihara, K. Direct effects of tumor necrosis factor alfa (TNF- α) on L6 myotubes. *Kobe J Med Sci* 2004; 50: 39-46.
- Elsasser, A., Suzuki, K., Lorenz-Meyer, S., Bode, C., Schaper, J. The role of apoptosis in myocardial ischemia: a critical appraisal. *Basic Res Cardiol* 2001; 96: 219-226.
- Engelbracht, A.-M., Niesler, C., Page, C., Lochner, A. p38 and JNK have distinct regulatory functions on the development of apoptosis during simulated ischaemia and reperfusion in neonatal cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol* 2004; 99: 338-350.
- Fedier, A., Erdmann, R., Boulikas, T., Fink, D. Potential of the Akt inhibitor LY294005 to antagonize the efficacy of Cisplatin against HCT116 tumor cells in a DNA mismatch repair-dependent manner. *Int J Oncol* 2006; 29: 1303-1310.
- Fernando, P., Kelly, J. F., Balazsi, K., Slack, R., Megeney, L. A. Caspase activity is required for skeletal muscle differentiation. *PNAS* 2002; 99: 11025-11030.
- Feuerstein, G. Z. Apoptosis in cardiac diseases – new opportunities for novel therapeutics for heart diseases. *Cardiovasc Drugs Ther* 1999; 13: 289-294.
- Feuerstein, G. Z. and Young, P. R. Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signalling pathways. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 560-569.
- Filippa, N., Sable, C. L., Filloux, C., Hemmings, B., Van Obberghen, E. Mechanism of protein kinase B activation by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 4989-5000.
- Foo, R. S.-Y., Mani, K., Kitsis, R. N. Death begets failure in the heart. *J Clin Invest* 2005; 115: 565-571.
- Franke, T. F. Akt-interacting proteins: attractive opposites. Focus on "Carboxy-terminal modulator protein induces Akt phosphorylation and activation, thereby enhancing antiapoptotic, glycogen synthetic, and glucose uptake pathways". *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C1768-C1770.
- Franke, T. F., Hornik, C. P., Segev, L., Shostak, G. A., Sugimoto, C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 2003; 22: 8983–8998.
- Franklin, R.A. and McCubrey, J.A. Kinases: positive and negative regulators of apoptosis. *Leukemia* 2000; 14: 219-2034.
- Fuertes, M. A., Castilla, J., Perez, J. M. Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways. *Curr Med Chem* 2003; 10: 257-266.
- Fujio, Y., Guo, K., Mano, T., Mitsuuchi, Y., Testa, J. R., Walsh, K. Cell cycle withdrawal promotes myogenic induction of Akt, a positive modulator of myocyte survival. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 5073-5082.
- Fujio, Y., Nguyen, T., Wencker, D., Kitsis, R., Walsh, K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circ J Am Heart Assoc* 2000; 101: 660.
- Fussenegger, M. and Bailey, J.E. Molecular control of cell-cycle progression and apoptosis in mammalian cells: implication for biotechnology. *Biotechnol. Prog.* 1998; 14: 807-833.
- Gagnon, V., Mathieu, I., Sexton, E., Leblanc, K., Asselin, E. AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells *Gynecol Oncol* 2004; 94: 785-795.
- Gagnon, V., Van Themsche, C., Turner, S., Leblanc, V., Asselin, E. Akt and XIAP regulate the sensitivity of human uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. *Apoptosis* 2008; 13: 259–271.
- Gardner, A. M., Xu, F. H., Fady, C., Jacoby, F. J., Duffey, D. C., Tu, Y., Lichtenstein, A. Apoptotic vs. nonapoptotic cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 73-83.
- Garrett, M. D. Cell cycle control and cancer. *Curr Sci* 2001; 81: 515-522.

- Genaro, A. M., Hortelano, S., Alvarez, A., Martinez, C., Bosca, L. Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J Clin Invest* 1995; 95: 1884–1890.
- Gewirtz, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 1999; 57: 727–741.
- Giordano, F. J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. *J Clin Invest* 2005; 115: 500-508.
- Graves, L. M., Guy, H. I., Kozlowski, P., Huang, M., Lazarowski, E., Pope, R. M., Collins, M. A., Dahlstrand, E. N., Earp, H. S. 3rd, Evans, D. R. (2000) Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase. *Nature* 2000; 403 :328-332.
- Gonzalez, I., Tripathi, G., Carter, E. J., Cobb, L. J., Salih, D. A. M., Lovett, F. A., Holding, C., Pell, J. M. Akt2, a Novel Functional Link between p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathways in Myogenesis. *Mol Cell Biol* 2004; 24: 3607–3622.
- Gonzalez, V. M., Fuertes, M. A., Alonso, C., Perez, J. M. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 2001; 59: 657-663.
- Gottlieb, R. A., Bursleson, K. O., Kloner, R. A., Babior, B. M., Engler, R. L. Reperfusion Injury Induces Apoptosis in Rabbit Cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994; 94: 1621-1628.
- Gredinger, E., Gerber, A. N., Tamir, Y., Tapscott, S. J., Bengal, E. Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Is Involved in the Differentiation of Muscle Cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 10436-10444.
- Green, D.R. and Reed, J.C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281: 1309-1312.
- Grounds, M. D., White, J. D., Rosenthal, N., Bogoyevitch, M. The role of stem cells in skeletal and cardiac muscle repair. *J Histochem Cytochem* 2002; 50(5): 589-610.
- Guan, Z., Buckman, S. Y., Pentland, A. P., Templeton, D. J., Morrison, A. R. Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 → SEK1/MKK4 → p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 1998; **273**: 12901–12908.
- Guano, G., Pourquier, P., Tinelli, S., Binaschi, M., Bigoni, M., Animati, F., Manzini, S., Zunino, F., Kohlangen, G., Pommier, Y., Capanico, G. Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracyclines. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 77-84.
- Guillen, I., Blanes, M., Gomez-Lechon, M. J., Castell, J. V. Cytokine signaling during myocardial infarction: sequential appearance of IL-1 beta and IL-6. *Am J Physiol*. 1995; 269: R229–R235.
- Gustafsson, A. B. and Gottlieb, R. A. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J Clin Immunol* 2003; 23: 447-459.
- Gwechenberger, M., Mendoza, L. H., Youker, K. A., Frangogiannis, N. G., Smith, W., Michael, L. H., Entman, M, L. Cardiac Myocytes Produce Interleukin-6 in Culture and in Viable Border Zone of Reperfused Infarctions. *Circ* 1999; 99: 546-551.
- Halawa, B., Salomon, P., Jolda-Mydlowska, B., Zysko, D. Levels of tumor necrosis factor (TNF-alpha) and interleukin 6 (IL-6) in serum of patients with acute myocardial infarction. *Pol Arch Med Wewn* 1999; 101: 197-203.
- Hampton, M. B. and Orrenius, S. Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Lett* 1997; 414: 552-556.
- Hashimoto N. Muscle satellite cells as muscle-specific adult stem cells: two models for self renewal. *J Oral Biosci* 2007; 49(3): 224-226
- Hawke, T. J. and Garry, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 2001; 91:534-551.
- Hawke, T. J., Jiang, N., Garry, D. J. Absence of p21CIP rescues myogenic progenitor cell proliferative and regenerative capacity in Foxk1 null mice. *J Bol Chem* 2003; 278: 4015-4020.

- Hengartner, M.O. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-776.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Neven, G., Schaper, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; 374: 1-20.
- Hermann, M., Lorenz, H. M., Voll, R., Grunke, M., Woith, W., Kalde, J. R. A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acid Res* 1994; 22: 5506-5507.
- Hiomura, M., Okada, F., Obata, T., Auguin, D., Shibata, T., Roumestand, C., Noguchi, M. Inhibition of Akt Kinase activity by a peptide panning the β A strand of the proto-oncogene TCL1. *J Biol Chem* 2004; 279: 53407-53418.
- Ho, F. M., Liu, S. H., Liao, C. S., Huang, P. J., Shiah, S. G., Lin-Shiau, S. Y. Nitric oxide prevents apoptosis of human endothelial cells from high glucose exposure during early stage. *J Cell Biochem* 1999; 75: 258-263.
- Hochedlinger, K., Wagner, E. F., Sabapathy, K. Differential effects of JNK1 and JNK2 on signal specific induction of apoptosis. *Oncogene* 2002; 21: 2441-2445.
- Hoidal, J. R. Reactive oxygen species and cell signalling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 25: 661-663.
- Hollnagel, A., Grund, C., Franke, W. W. Arnold H.-H. The cell adhesion molecule m-cadherin is not essential for muscle development and regeneration. *Mol Cell Biol* 2002; 22(13): 4760-4770.
- Holterman, C. E. and Rudnicki, M. A. Molecular regulation of satellite cell function. *Semin Cell Dev Biol* 2005; 16: 575-584.
- Hong, I.-S., Kim, S.-H., Koong, M. K., Jun, J. H., Kim, S.-H., Lee, Y.-S., Kang, K.-S. Roles of p38 and c-jun in the differentiation, proliferation and immortalization of normal human endometrial cells. *Hum reprod* 2004; 19: 2192-2199.
- Hsu, S. C., Gavrilin, M. A., Tsai, M. H., Han, J., Lai, M. Z. p38 mitogen-activated protein kinase is involved in Fas ligand expression. *J Biol Chem* 1999; 274: 25769-76.
- Hu, Y.-L., Li, S., Shyy, J. Y.-J., Chien, S. Sustained JNK activation induces endothelial apoptosis: studies with colchicine and shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 277: H1593-H1599.
- Huang, H.-L., Fang, L.-W., Lu, S.-P., Chou, C.-K., Lu, T.-Y., Lai, M.-Z. DNA-damaging reagents induce apoptosis through reactive oxygen species-dependent Fas aggregation. *Oncogene* 2003; 22: 8168-8177.
- Iezzi, S., Cossu, G., Nervi, C., Sartorelli, V., Puri, P. L. Stage-specific modulation of skeletal myogenesis by inhibitors of nuclear deacetylases. *PNAS* 2002; 99: 7757-7762.
- Irintchev, A., Zeschnick, M., Starzinski-Powitz, A., Wernig, A. Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscle. *Dev Dyn* 1994; 199: 326-337.
- Irintchev, A., Zweyer, M., Wernig, A. Cellular and molecular reactions in mouse muscles after myoblast implantation. *J Neurocytol* 1995; 24: 319-331.
- Irvin, M. W., Mak, S., Mann, D.L., Qu, R., Penninger, J. M., Yan, A., Dawood, F., Wen, W. H., Shou, Z., Liu, P. Tissue expression and immunolocalization of tumor necrosis factor-alpha in postinfarction dysfunctional myocardium. *Circulation* 1999; 99: 1492-1498.
- Jacobs, M., Staufenberger, S., Gergs, U., Meuter, K., Brandstätter, K., Hafner, M., Ertl, G., Schorb, W. Tumor necrosis factor-alpha at acute myocardial infarction in rats and effects on cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31(11):1949-1959.
- Jankowski, R. J., Deasy, B. M., Hyard, J. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther* 2002; 9: 642-647.
- Jochum, W., Passegue, E., Wagner, E.F. AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* 2001; 20: 2401-2412.

- Jones, N. C., Tyner, K. J., Nibarger, L., Stanley, H. M., Cornelison, D. D., Fedorov, Y. V., Olwin, B. B. The p38alpha/beta MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *J Cell Biol* 2005; 169: 105-116.
- Johnson, G. L. and Lapadat, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002; 298: 1911-1912.
- Kageyama, Y., Li, X. K., Suzuki, S., Suzuki, H., Suzuki, K., Kazui, T., Harada, Y. Apoptosis is involved in acute cardiac allograft rejection in rats. *Ann Thorac Surg* 1998; 65: 1604-1609.
- Kalyanaraman, B., Joseph, J., Kalivendi, S., Wang, S., Konorev, R., Kotaramju, S. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity. *Mol Cell Biochem* 2002; 234-235: 119-124.
- Kam, P. C. A. and Ferch, N. I. Apoptosis: mechanisms and clinical implications. *Anaesthesia* 2000; 55: 1081-1093.
- Kami, K., Noguchi, K., Senba, E. Localization of myogenin, c-fos, c-jun, and muscle-specific gene mRNA in regenerating rat skeletal muscle. *Cell Tissue Res* 1995; 280: 11-19.
- Kang, Y. J. Molecular and cellular mechanisms of cardiotoxicity. *Environ Health Perspect* 2001; 109(Suppl 1): 27-34.
- Kang, P. M. and Izumo, S. Apoptosis heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular disease. *TRENDS Mol Med* 2003; 9: 177-182.
- Kang, J.V., Zhou, Z. X., Wang, G.-W., Buridi, A., Klein, J. B. Suppression by metallothionein of doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinases. *J. Biol Chem* 2000; 275: 13690-13698.
- Karin, M., Liu, Z., Zandi, E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 40-246.
- Kayahara, M., Wang, X., Tournier, C. Selective regulation of c-jun gene expression by mitogen-activated protein kinases via the 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-responsive element and myocyte enhancer factor 2 binding sites. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 3784-3792.
- Kim, A. H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T. F., Chao, M. V. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 893-901.
- Kim, Y., Ma, A. G., Kitta, K., Fitch, S. N., Ikeda, T., Ihara, Y., Simon, A. R., Evans, T., Suzuki, Y. J. Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 368-377.
- Kim, Y.-M., de Vera, M. E., Watkins, S. C., Billar, T. R. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem* 1997; 272: 1402-1411.
- Kim, Y. K., Kim, H. J., Kwon, C. H., Kim, J. H., Woo, J. S., Jung, J. S., Kim, J. M., Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells. *J App Toxicol*, 2005; 25: 374-382.
- Kimura, N., Matsuo, R., Shibuya, H., Nakashima, K., Taga, T. BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J Biol Chem* 2000; 275: 17647-17652.
- Kitzmann, M., and Fernandez, A. Crosstalk between cell cycle regulators and the myogenic factor MyoD in skeletal myoblasts. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 571-579.
- Knauf, U., Tschopp, C., Gram, H. Negative regulation of protein translation by mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 5500-5511.

- Kojima, H., Endo, K., Moriyama, H., Tanaka, Y., Alnemri, E., Slapak, C. A., Teicher, B., Kufe, D., Datta, R. Abrogation of mitochondrial cytochrome C release and caspase-3 activation in acquired multidrug resistance. *J Biol Chem* 1998; 273: 16647–16650.
- Kolbus, A., Herr, I., Schreiber, M., Debatin, K.-M., Wagner, E.F., Angel P. c-Jun-dependent CD95-L expression is a rate-limiting step in the induction of apoptosis by alkylating agents. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 575-582.
- Koller, A. and Haid, C. Is restoring regenerative potential a way to prevent anthracycline cardiotoxicity? A hypothesis. *Med Sci Monit* 2005; 11: HY21-HY23.
- Konorev, E. A., Vanamala, S., Kalyanaraman, B. Differences in doxorubicin-induced apoptotic signaling in adult and immature cardiomyocytes. *Free Rad Biol Med* 2008; 45: 1723-1728.
- Koo, M. S., Kwon, Y. G., Park, J. H., Choi, W. J., Billiar, T.R., Kim, Y. M. Signaling and function of caspase and c-Jun N-terminal kinase in cisplatin-induced apoptosis. *Mol Cells* 2002; 13: 194-201.
- Kotamraju S., Konorev E., Joseph J., Kalyanarama B. Doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and cardiomyocytes is ameliorated by nitron spin traps and ebselen. *J Biol Chem* 2000; 275: 33585-33592.
- Krauss, G. Biochemistr of signal transduction and regulation. WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, Weinheim 2008; 4th Ed: 441-455.
- Kubota, T., Miyagishima, M., Frye, C. S., Alber, S. M., Bounoutas, G. S., Kadokami, T., Watkins, S. C., McTiernan, C. F., Feldman, A. M. Overexpression of tumor necrosis factor-alpha activates both anti- and pro-apoptotic pathways in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 1331-1344.
- Kueng, W., Silber, E., Eppenberger, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 1989; 182: 16-19.
- Kumakura, S., Ishikura, H., Maniwa, Y., Munemassa, S., Tsumura, H., Masuda, J., Kobayashi, S. Activation of protein kinase C enhances TNF-alpha induced differentiation by preventing apoptosis via rapid up-regulation of c-Myc protein expression in HL-60 cells. *Leuk Lymphoma* 2003; 44: 497-503.
- Kurabayashi, M., Jeyasselan, R., Kedes, L. Antineoplastic agent doxorubicin inhibits myogenic differentiation of C2 myoblasts. *J Biol Chem* 1993; 268: 5524-5529.
- Laken, H.A. and Leonard, M.W. Understanding abd modulating apoptosis in industrial cell culture. *Cur Opin Biotech* 2001; 12: 175-179.
- Langen, R. C. J., Schols, A. M. W. J., Kelders, M. C. J. M., Wouters, E. F. M., Janssen-Heininger, Y, M. W. Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through activation of nuclear factor- κ B. *FASEB J* 2001; 15: 1169-1180.
- Lawen, A. Apoptosis – an introduction. *BioEssays* 2003; 25: 888-896.
- Lawlor, M. A. and Alessi, D. R. PKB/Akt, a key mediator of cell proliferation, survival and insulin responses? *J Cell Sci* 2001; 114: 2903-2910.
- Lazo, J. S., Kuo, S. M., Woo, E. S., Pitt, B. R. The protein metallothionein as an antioxidant and protectant against antineoplastic drugs. *Chem Biol Interact* 1998; 111-112: 255-262.
- Lee, J. Y., Qu-Petersen, Z., Cao, B., Kimura, S., Jankowski, R., Cummins, J., Usas, A., Gates, C., Robbins, P., Wernig, A., Huard, J. Clonal isolation of muscle-derived cells capable of enhancing muscle regeneration and bone healing. *J Cell Biol* 2000; 150:1085-1100.
- Lee, M.-H., Jang, M.-H., Kim, E.-K., Han, S.-W., Cho, S.-Y., Kim, C.-J. Nitric oxide induces apoptosis in mouse C2C12 myoblas cells. *J Pharmacol Sci* 2005; 97: 369-376.
- Lee, P., Sata, M., Lefer, D. J., Factor, S. M., Walsh, K., Kitsis, R. N. Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart circ Physiol* 2003a; 284: H456-H463.

- Lee, Y. J., Cho, H. N., Soh, J. W., Jhon, G. J., Cho, C. K., Chung, H. Y., Bae, S., Lee, S. J., Lee, Y. S. Oxidative stress-induced apoptosis is mediated by ERK1/2 phosphorylation. *Exp Cell Res* 2003b; 291: 251-266.
- Le Grand, F. and Rudnicki, M. Satellite and stem cells in muscle growth and repair. *Development* 2007; 134: 3953-3957
- Lenassi, M. and Plemenitaš, A. The role of p38 MAP kinase in cancer cell apoptosis. *Radiol Oncol* 2006; 40: 51-56.
- Li, C.-Q. and Wogan, G. N. Nitric oxide as a modulator of apoptosis. *Cancer Lett* 2005; 226: 1-15.
- Li, D., Zhao, L., Liu, M., Du, X., Ding, W., Zhang, J., Mehta, J. L. Kinetics of tumor necrosis factor alpha in plasma and the cardioprotective effect of a monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1999; 137: 1145-1152.
- Li, D. Y., Tao, L., Liu, H., Christopher, T. A., Lopez, B. L., Ma, X. L. Role of ERK1/2 in the anti-apoptotic and cardioprotective effects of nitric oxide after myocardial ischemia and reperfusion. *Apoptosis* 2006; 11: 923-930.
- Li, J. and Billar, T. R. The anti-apoptotic actions of nitric oxide in hepatocytes. *Cell Death Differ* 1999; 6: 952-955.
- Li, S.-P., Junttila, M. R., Han, J., Kähäri, V.-M., Westermarck, J. p38 mitogen-activated protein kinase pathway suppresses cell survival by inducing dephosphorylation of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase1/2. *Cancer Res* 2003a; 63: 3473-3477.
- Li, Y.-P. TNF- α is a mitogen in skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003b; 285: C370-C376.
- Liu, J., and Lin, A. Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. *Cell Research* 2005; 15: 36-42.
- Liu, J., Li, H., de Tribolet, N., Jaufeerally, R., Hamou, M. F., Van Meir, E. G. IL-6 stimulates growth and inhibits constitutive, protein synthesis-independent apoptosis of murine B-cell hybridoma 7TD1. *Cell Immunol.* 1994; 155: 428-35.
- Lou, H., Danelisen, I., Singal, P. K. Involvement of mitogen-activated protein kinases in adriamycin-induced cardiomyopathy. *Am J Physiol* 2005; 288: H1925-1930.
- MacFarlane, M. and Williams, A. C. Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Rep* 2004; 5: 674-678.
- Maejima, Y., Adachi, S., Morikawa, K., Ito, H., Isobe, M. Nitric oxide inhibits myocardial apoptosis by preventing caspase-3 activity via S-nitrosylation. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38:163-174.
- Makin, G. Targeting apoptosis in cancer chemotherapy. *Exp Opin Ther Targ* 2002; 6: 73-84.
- Mannick, J. B., Asano, K., Izumi, K., Kieff, E., Stamler, J. S. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 1994; 79: 1137-1146.
- Mansouri, A., Ridgway, L. D., Korapati, A. L., Zhang, Q., Tian, L., Wang, Y., Siddik, Z. H., Mills, G. B., Claret, F. X. Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathways in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 19245-19256.
- Marshall, C. J. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995; 80: 179-185.
- Matés, J. M., Segura, J. A., Alonso, F. J., Márquez, J. Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Archiv Toxicol* 2008; 82: 273-299.
- Matsui, T., Nagoshi, T., Rosenzweig, A. Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival. *Cell Cycle* 2003; 2: 220-223.

- Matsushita, K., Iwanaga, S., Oda, T., Kimura, K., Shimada, M. Sano, M., Umezawa, A., Hata, J., Ogawa, S. Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis. *Lab Invest* 2005; 85: 1210-1223.
- Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J. Biophys Biochem Cytol* 1961; 9: 493-494.
- Maury, C. P., and Teppo, A. M. Circulating tumour necrosis factor-alpha (cachectin) in myocardial infarction. *J Intern Med* 1989; 225:333-336.
- Meldrum, D. R. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol* 1998; 43: R577-R595.
- Mercille S. and Massie B. Induction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells. *Biotech. Bioeng.* 1994; 44: 1140-1154.
- Mermelstein, C.S., Andrade, L.R., Portilho, D.M., Costa, M.L. Desmin filaments are stably associated with the outer nuclear surface in chick myoblasts. *Cell Tissue Res* 2006; 323(2):351-7.
- Meloche, S. and Pouyssegur, J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene* 2007; 26: 3227–3239.
- Minamino, T., Yujiri, T., Papst, P. J., Chan, E. D., Johnson, G. L., Terada, N. MEKK1 suppresses oxidative stress-induced apoptosis of embryonic stem cell-derived cardiac myocytes. *PNAS* 1999; 96: 15127-15132.
- Minden, A. and Karin, M. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1333: F85-F104.
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol Rev* 2004; 56: 185-229.
- Molofsky, A. V., Pardal, R, Morrison, S. J. Diverse mechanisms regulate stem cell self renewal. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 700-707.
- Mooradian, D. L., Hutsell, T. C., Keefer, L. K. Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 1995; 25: 674-678.
- Morgan, J. E. and Partridge, T. A. Muscle stem cells. *Int J Biochem* 2003; 35: 1151-1156.
- Munemasa, Y., Ohtani-kaneko, R., Kitaoka, Y., Kumai, T., Kitaoka, Y., Hayashi, Y., Watanabe, M., Takeda, H., Hirata, K., Ueno, S. Pro-apoptotic role of c-Jun in NMDA-induced neurotoxicity in the rat retina. *J Neurosci Res* 2006; 83: 907-918.
- Nair, V. D. and Olanow, C. W. Differential modulation of Akt/glycogen synthase kinase-3 β pathway regulates apoptotic and cytoprotective signaling responses. *J Biol Chem* 2008; 283: 15469-15478.
- Negoro, S., Oh, H., Tone, E., Kunisada, K., Fujio, Y., Walsh, K., Kishimoto, T., Yamauchi-Takahara, K. Glycoprotein 130 regulates cardiac myocyte survival in doxorubicin-induced apoptosis through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt phosphorylation and Bcl-xL/caspase-3 interaction. *Circ* 2001; 103: 555-561.
- Nelson, D.P., Setser, E., Hall, D.G., Schwartz, S.M., Hewitt, T., Klevitsky, R., Osinska, H., Bellgrau, D., Duke, R.C., Robbins, J., Proinflammatory consequences of ransgenic Fas ligand expression in the heart. *J Clin Invest* 2000; 105, 1199– 1208.
- Niedbala, W., Wei, X., Campbell, C., Thomson, D., Komai-Koma, M., Liew, F. Y. Nitric oxide preferentially induces type 1 T cell differentiation by selectively up-regulating IL-12 receptor β 2 expression via cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 16186–16191.
- Nishio, E., Fukushima, K., Shiozaki, M., Watanabe, Y. Nitric oxide donor SNAP induces apoptosis in smooth muscle cells through cGMP-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221: 163–168.
- Nitiss, J.L. A copper connection to the uptake of platinum anticancer drugs *PNAS* 2002; 99: 13963-13965.

- Nobori, K., Ito, H., Tamamori-Adachi, M., Adachi, S., Ono, Y., Kawachi, J., Kitajima, S., marumo, F., Isobe, M. ATF3 inhibits doxorubicin-induced apoptosis in cardiac myocytes: a novel cardioprotective role of ATF3. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 1387-1397.
- O'Brien, K., Muskiewicz, K., Gussoni, E. Recent advances in and therapeutic potential of muscle-derived stem cells. *J Cell Biochem Suppl* 2002; 38: 80-87.
- Oh, H., Bradute, S. B., Gallardo, T. D., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishinag, Y., Pocius, J., Michaelb, L. H., Behringer, R. R., Garrye, D. J., Entman, M. L., Schneider, M. D. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12313-12318.
- Oren, M. Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 2003; 10: 431-442.
- Ormerod, M.G. *Flow cytometry a practical approach*. Second ed. Oxford University Press, Inc., New York, NY. 1992.
- Ortiz, A., Cuadrado, S.G., Lorz, C., Egido, J. Apoptosis in renal diseases. *Front Biosci* 1996; 1: d30-47.
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., Donner, D. B. NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 1999; 401: 82-85.
- Panaretakis, T., Laane, E., Pokrovskaja, K., Björklund, A.-C. Moustakas, A., Zhivotovsky, B., Heyman, M., Shoshan, M. C., Grandér, D. Doxorubicin Requires the Sequential Activation of Caspase-2, Protein Kinase C δ , and c-Jun NH₂-terminal Kinase to Induce Apoptosis. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 3821-3831.
- Panaretakis, T., Pokrovskaja, K., Shoshan, M. C., Grandér, D. Activation of Bak, Bax, and BH3-only proteins in the apoptotic response to doxorubicin. *J Biol Chem* 2002; 277: 44317-44326.
- Pandya, N., Santini, D., Jain, S. Role of mitogen-activated protein (MAP) kinases in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Drug Rev* 2005; 23: 247-254.
- Pasic, J., Levy, W. C., Sullivan, M. D. Cytokines in depression and heart failure. *Psychosom Med* 2003; 65:181-193.
- Pastorino, J. G., Tafani, M., Farber, J. L. Tumor necrosis factor induces phosphorylation and translocation of BAD through a phosphatidylinositol-3-OH kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* 1999; 274:19411-19416.
- Paulin, D. and Li, Z. Desmin: a major intermediate filament protein essential for the structural integrity and function of muscle. *Exp Cell Res* 2004; 301 (1):1-7.
- Pavlat, G. K. and Horsley, V. Cell fusion in skeletal muscle--central role of NFATC2 in regulating muscle cell size. *Cell Cycle* 2003; 2: 420-423.
- Pearson, G., Robinson, F., Gibson, T.B., Xu, B.-E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M. H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and Physiological functions. *Endocrine Rev.* 2001; 22(2):153-183.
- Péault, B., Rudnicki, M., Torrente, M., Cossu, G., Tremblay, J. P., Partridge, T., Gussoni, E., Kunkel, L. M., Huard, J. Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther* 2007; 15 (5): 867-877.
- Pedersen, B. K. and Febbraio, M. A. Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiol. Rev.* 2008; 88: 1379-1406.
- Perez, R. P. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1535-1544.
- Persons, D. L., Yazlovitskaya, E. M., Cui, W., Pelling, J. C. Cisplatin-induced activation of mitogen-activated protein kinases in ovarian carcinoma cells: inhibition of extracellular signal-regulated kinase activity increases sensitivity to cisplatin. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1007-1014.

- Pestka, J. J., Uzarski, R.L., Islam, Z. Induction of apoptosis and cytokine production in the Jurkat human T cells by deoxynivalenol: role of mitogen-activated protein kinases and comparison to other 8-ketotrichothecenes. *Toxicol* 2005; 206: 207-219.
- Pill, P. and Lippard, S.J. *Encyclopedia of cancer*, J.R. Bertino, Ed. Academic Press: San Diego, CA 1997; 1: 392-410.
- Pinsky, D. J., Aji, W., Szabolcs, M., Athan, e. S., Liu, Y., Yang, Y. M., Kline, R. P., Olson, K. E., Cannon, P. J. Nitric oxide triggers programmed cell death (apoptosis) of adult rat ventricular myocytes in culture *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1999; 277: H1189-H1199.
- Poizat, C., Puri, P. L., Bai, Y., Kedes, L. Phosphorylation-dependent degradation of p300 by doxorubicin-activated p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac cells. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 2673-2687.
- Pouzet, B., Vilquin, J. T., Hagege, A. A., Scorsin, M., Messas, E., Fiszman, M., Schwartz, K., Menasche, P. Intramyocardial transplantation of autologous myoblasts: can tissue processing be optimized? *Circulation* 2000; 102: III210-215.
- Pozzolini, M., Scarfi, S., Benatti, U., Giovine, M. Interference in MTT viability assay in activated macrophage cell line. *Anal Biochem* 2003; 313: 338-341.
- Pulkki, K. J. Cytokines and cardiomyocyte death. *Ann Med.* 1997; 29: 339-343.
- Qin, F., Shite, J. Liang, C.S. Antioxidants attenuate myocyte apoptosis and improve cardiac function in CHF: association with changes in MAPK pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H822-H832.
- Ravingerova, T., Barancik, M., Strniskova, M. Mitogen-activated protein kinases: A new therapeutic target in cardiac pathology. *Mol Cell Biochem* 2003; 247: 127-138.
- Reedijk J. New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA. *PNAS* 2003; 100: 3611-3616.
- Relaix, F., Rocancourt, D., Mansouri, A., Buckingham, M. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature* 2005; 435: 948-953.
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumano, A., Buckingham, M. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitors cells. *J Cell Biol* 2006; 172: 91-102.
- Robinson, M. J. and Cobb, M. H. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 180-186.
- Roovers, K. and Assoian, R.K. Integrating the Map kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *Bioessays* 2000; 22: 818-826.
- Sack, M. N. Tumor necrosisfactor- α in cardiovascular biology and the potential role for anti-tumor necrosis factor- α therapy in heart diseases. *Pharmacol Ther* 2002; 94: 123-135.
- Sanchez-Cordon, P. J., Nunez, A., Salguero, F.J., Pedreea, M., Fernandez de Marco, M., Gomez-Villamandos, J. C. Lymphocyte apoptosis and thrombocytopenia in spleen during classical swine fever: role of macrophages and cytokines. *Vet Pathol* 2005; 42: 477-488.
- Sato, M., Bagchi, D., Tosaki, A., Das, D. K. Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and c-Jun. *Free Rad Biol Med* 2001; 31: 729-737.
- Sauer, H. and Wartenberg, M. Reactive oxygen species as signalling molecules in cardiovascular differentiation of embryonic stem cellsand tumor-induced angiogenesis. *Antioxid Redox Signal* 2005; 7:1423-1434.
- Sawyer, D. B., Fukazawa, R., Arstall, M. A., Kelly, R. A. Daunorubicin-induced apoptosis in rat cardiac myocytes is inhibited by dexrazoxane. *Circ Res.* 1999; 84: 257-265.
- Saurin, A. T., Martin, J. L., Heads, R. J., Foley, C., Mockridge, J. W., Wright, M. J., Wang, Y., Marber, M. S. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *FASEB J* 2000; 14: 2237-2246.

- Schenk, P. W. and Snaar-Jagalska, B.E. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1449: 1-24.
- Schramek, H. MAP kinases: from intracellular signals to physiology and disease. *News Physiol Sci* 2002; 17: 62-67.
- Schultz, E. Satellite cell proliferative compartments in growing skeletal muscles. *Dev Biol* 1996; 175: 84-94.
- Schultz, E. and McCormick K. M. Skeletal muscle satellite cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1994; 123:213-257.
- Schulz, R., Aker, S., Belosjorow, S., Heusch, G. TNF- α in ischemia/reperfusion injury and heart failure. *Basic Res Cardiol* 2004; 99: 8-11.
- Sciorati, C., Rovere, P., Ferrarini, M., Heltai, S., Manfredi, A. A. Clementi, E. Autocrine nitric oxide modulates CD95-induced apoptosis in $\gamma\delta$ T lymphocytes. *J Biol Chem* 1997; 272: 23211-23215.
- Seale, P. and Rudnicki, M. A. A new look at the origin, function, and „stem-cell“ status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 2000; 218: 115-124.
- Seale, P., Asakura, A., Rudnicki, M. A. The potential of muscle stem cells. *Develop Cell* 2001; 1: 333-342.
- Seale, P., Ishibashi, J., Holterman, C., Rudnicki, M. A. Muscle satellite cell-specific genes identified by genetic profiling of MyoD-deficient myogenic cell. *Dev Biol* 2004; 275: 287-300.
- Seger, R. and Krebs, E. G. The MAPK signalling cascade. *FASEB* 1995; 9: 726-735.
- Seidel, M., Rozwadowska, N., Tomczak, K., Kurpisz, M. Myoblasts preparation for transplantation into injured myocardium. *Eur Heart J Suppl* 2006; 8: H8-H15.
- Selvendiran, K., Tong, L., Vishwanath, S., Bratasz, A., Trigg, N. J., Kutala, V. K., Hideg, K. H., Kuppusamy, P. EF24 induces G₂/M arrest and apoptosis in cisplatin-resistant human ovarian cancer cells by increasing PTEN expression. *J Biol Chem* 2007; 282: 28609-28618.
- Shaulian, E. and Karin, M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001; 20: 2390-2400.
- Shen, H.-M. and Liu, Z.-g. JNK signalling pathway is a key modulator in cell death mediated by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 928-939.
- Shi, X. and Garry, D. J. Muscle stem cells in development, regeneration, and disease. *Gene Dev* 2006; 20: 1692-1708.
- Shimaoka, M., Iida, T., Ohara, A., Taenka, N., Mashimo, T., Honda, T., Yoshiya, I. NOC, a nitric-oxide-releasing compound, induces dose-dependent apoptosis in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1995 209: 519–526.
- Shiraishi, I., Sussman, M. A., Hamaoka, K. Cellular and molecular aspects of cardiomyocyte survival and possible therapeutic application for heart failure pediatric cardiology and cardiac surgery. *Pediatr Cardiol Cardiac Surg* 2002; 18: 466-474.
- Siddik, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22: 7265-7279.
- Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997; 82: 291-295.
- Smith, A., Ramos-Morales, F., Ashworth, A., Collins, M. A role for JNK/SAPK in proliferation, but not apoptosis, of IL-3-dependent cells. *Curr Biol* 1997; 7: 893-896.
- Smythe, G.M., Davies, M.J., Paulin, D., Grounds, M.D. Absence of desmin slightly prolongs myoblast proliferation and delays fusion *in vivo* in regenerating grafts of skeletal muscle. *Cell Tissue Res* 2001; 304(2):287-94.
- Song, G., Ouyang, G., Bao, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 59-71.

- Song, Z. F., Ji, X. P., Li, X. X., Wang, S. J., Wang, S. H., Zhang, Y. Inhibition of the activity of Poly(ADP-Ribose) Polymerase reduces heart ischemia/reperfusion injury via suppressing JNK mediated AIF translocation *J Cell Mol Med* 2008; 12: 1220-1228.
- Stefanelli, C., Pignatti, C., Tantini, B., Stanić, I., Bonavita, F., Muscari, C., Guarnieri, C., Clo, C., Caldarera, C. M. Nitric oxide can function as either a killer molecule or an antiapoptotic effector in cardiomyocytes. *Bioshim Biophys Acta Mol Cell Res* 1999; 1450: 406-413.
- Steinmüller, L., Cibelli, G., Moll, J.R., Vinson, C., Thiel, G. Regulation and composition of activator protein (AP-1) transcription factors controlling collagenase and c-Jun promoter activities. *Biochem J* 2001; 360: 599-607.
- Stewart, C. E. H., Newcomb, P. V., Holly, J. M. P. Multifaceted roles of TNF- α in myoblasts destruction: a multitude of signal transduction pathways. *J Cell Physiol* 2004; 198: 237-247.
- Sudgen, P. H. and Clerk, A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res* 1998; 83: 345-352.
- Suhara, T., Kim, H.-S., Kirshenbaum, L. A., Walsh, K. Suppression of Akt signaling induces Fas ligand expression: involvement of caspase and Jun kinase activation in Akt-mediated Fas ligand regulation. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 680-691.
- Suzuki, K., Murtuza, B., Beauchamp, J. R., Smolencki, R. T., Varela-Carver, A., Fukushima, S., Coppen, A. R., Partridge, T. A., Yacoub, M.H. Dynamics and mediators of acute graft attrition after myoblast transplantation to the heart. *FASEB J* 2004 18: 1153-1155
- Swift, L. P., Rephaeli, A., Nudelman, A., Phillips, D. R., Cutts, S. M. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res* 2006; 66: 4863-4871.
- Szabadkai, G. and Rizzuto, R. Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Lett* 2004; 567: 111-115.
- Širmenis, R., Baltriukienė, D., Kalvelytė, A., Balčiūnas, M., Malickaitė, R., Žurauskas, E., Bukelskienė, V. Laštelinė kardiomioplastika naudojant autologines miogenines ląsteles. *Lietuvos chirurgija* 2007; 5: 260-67.
- Taimor, G., Rakow, A., Piper, H. M. Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes. *FASEB J* 2001; 15: 2518-2520.
- Tassinari, D., Sartori, S., Drudi, G., Panzini, I., Gianni, L., Pasquini, F., Abbasciano, V., Ravaioli, A., Iorio, D. Cardiac arrhythmias after cisplatin infusion: Three case reports and a review of the literature. *Ann Oncol* 1997; 8: 1263-1267.
- Thannickal, V. J. and Fanburg, B. L. Reactive oxygen species in cell signalling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279: L1005-L1028.
- Tidball, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R345-R353.
- Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T., Ichijo, H. ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep* 2001; 2: 222-228.
- Tong, H., Imahashi, K., Steenbergen, C., Murphy, E. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res* 2002; 90: 377-379.
- Tohrnberry, N.A. and Lezebnik, Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
- Tournier, C., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Barrett, T., Davis, R. Mitogen-activated protein kinase 7 is an activator of the c-Jun NH₂terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 7337-7342.

- Uchiyama, T., Otani, H., Okada, T., Ninomiya, H., Kido, M., Imamura, H., Nogi, S., Kobayashi, Y. Nitric oxide induces caspase-dependent apoptosis and necrosis in neonatal rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 1049-1061.
- Van de Sande, T., De Schrijver, E., Heyns, W., Verhoeven, G., Swinnen, J. V. Role of the phosphatidylinositol 3'-kinase/PTEN/Akt kinase pathway in the overexpression of fatty acid synthase in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62: 642-646.
- van Gorp, A. G. M., Pomeranz, K. M., Birkenkamp, K. U., Hui, R. C.-Y., Lam, E. W.-F., Coffey, P. J. Chronic protein kinase B (PKB/c-akt) activation leads to apoptosis induced by oxidative stress-mediated Foxo3a transcriptional up-regulation. *Cancer Res* 2006; 22: 10760-10769.
- Vogt, P.K. Jun, the oncoprotein. *Oncogene* 2001; 20: 2365-2377.
- von Gise, A., Lorenz, P., Wellbrock, C., Hemmings, B., Berberich-siebelt, F., Rapp, U. R., Troppmair, J. Apoptosis suppression by Raf-1 and MEK1 requires MEK- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signals. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 2324-2336.
- Wallace, K. B. Doxorubicin-induced cardiac mitochondriopathy. *Pharmacol Toxicol* 2003; 93: 105-115.
- Wang, N., Verna, L., Hardy, St., Zhu, Y., Ma, K-S., Birrer, M. J., Stemerman, M. B. c-Jun triggers apoptosis in human vascular endothelial cells. *Circ Res* 1999; 85:387-393.
- Wang, S., and Yim, A. P. C. Cytokines in myocardial injury: impact on cardiac surgical approach. *Eur J Cardio-thorac surg* 1999; 16: S107-S111.
- Wang, S., Konorev, E., Kotamraju, S., Joseph, J., Kalivendi, S., Kalyanaraman, B. Doxorubicin induces apoptosis in normal and tumor cells via distinctly different mechanisms: Intermediacy of H₂O₂- and p53-dependent pathways. *J Biol Chem* 2004; 279: 25535-25543.
- Wang, S., Kotamraju S., Konorev E., Kalivendi S., Joseph, Kalyanaraman, B. Activation of nuclear faktor- κB during doxorubicin-induced apoptosis in endothelial cells and myocytes is pro-apoptotic: the role of hydrogen peroxide. *Biochem J* 2002; 367: 729-740.
- Wang, X., Martindale, J. L., Holbrook, N. J. Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275 :39435-39443.
- Wang, X., McGowan, C. H., Zhao, M., He, L., Downey, J. S., Fearn, C., Wang, Y., Huang, S., Han, J. Involvement of the MKK6-p38gamma cascade in gamma-radiation- induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 2000b; 20: 4543-4552.
- Wang, Y. Mitogen-activated protein kinases in heart development and diseases. *Circulation* 2007; 116: 1412-1423.
- Werlen, G., Hausmann, B., Naeher, D., Palmer, E. Signaling life and death in the thymus: timing is everything. *Science* 2003; 299: 1859-1863.
- Wernig, A., Bone, M., Irintchev, A., Schäfer, R., Cullen, M.J. M-cadherin is a reliable marker of quiescent satellite cells in mouse skeletal muscle. *Basic Appl Myol* 2004; 14(3): 161-168.
- Weston, C. R. and Davis, R. J. The JNK signal transduction pathway *Curr. Opin. Cell Biol.* 2007; 19: 142-149.
- Widlak, P. The DFF40/CAD endonuclease and its role in apoptosis. *Acta Biochim Polon* 2000; 47: 1037-1044.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., Johnson, G. L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 1999; 79: 143-180.
- Wisdom, R., Johnson, R.S., Moore, C. c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO J* 1999; 18:188-197.
- Wollert, K. C., and Drexler, H. The Role of Interleukin-6 in the Failing Heart. *Heart Fail Rev* 2001; 6: 95-103.

- Wozniak, A. C., Kong, J., Bock, E., Pilipowicz, O., Anderson, J. E. Signaling satellite-cell activation in skeletal muscle: Markers, models, stretch, and potential alternate pathways. *Muscle Nerve* 2005; 31: 283-300.
- Woodgett, J. R. Recent advances in the protein kinase B signaling pathway. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 150-157.
- Wu, G. S. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 156-161.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J., and Greenberg, M.E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 1995; 270: 1326-1331.
- Yablonka-Reuveni, Z., Day, K., Vine, A., Shefer, G. Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. *J Anim Sci* 2008; 86: E207-E216.
- Yablonka-Reuveni, Z., Rudnicki, M. A., Rivera, A. J., Primig, M., Anderson, J. E., Natanson, P. The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD. *Dev Biol* 1999; 210: 440-455.
- Yamaguchi, H. and Wang, H.-G. The protein kinase PKB/Akt regulates cell survival and apoptosis by inhibiting Bax conformational change. *Oncogene* 2001; 20: 7779-7786.
- Yamagishi, S., Yamada, M., Ishikawa, Y., Matsumoto, T., Ikeuchi, T., Hatanaka, H. p38 mitogen-activated protein kinase regulates low potassium-induced c-Jun phosphorylation and apoptosis in cultured cerebellar granule neurons. *J Biol Chem* 2001; 276: 5129-5133.
- Yamaoka, M., Yamaguchi, S., Suzuki, T., Okuyama, M., Nitobe, J., Nakamura, N., Mitsui, Y., Tomoike, H. Apoptosis in rat cardiac myocytes induced by Fas ligand: priming for Fas-mediated apoptosis with doxorubicin. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 881-889.
- Yaniv, G., Shilkrut, M., Larisch, S., Binah, O. Hydrogen peroxide predispose neonatal rat ventricular myocytes to Fas-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336: 740-746.
- Yano, S., Tokumitsu, H., Soderling, T. R. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* 1998; 396: 584-587.
- Yu, C., Minemoto, Y., Zhang, J., Liu, J., Tang, F., Bui, T. N., Xiang, J., Lin, A. JNK suppresses apoptosis via phosphorylation of the proapoptotic Bcl-2 family protein BAD. *Mol Cell* 2004; 13: 329-340.
- Yue, T. L., Wang, C., Gu, J. L., Ma, X. L., Kumar, S., Lee, J. C., Feuerstein, G. Z., Thomas, H., Maleeff, B., Ohlstein, E. H. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances ischemia/reoxygenation-induced apoptosis in cultured myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circ Res* 2000; 86: 692-699.
- Zammit, P. S. and Beauchamp, J. R. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation* 2001; 68: 193-204.
- Zammit, P.S., Partridge, T.A., and Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J. Histochem Cytochem* 2006a; 54(11): 1177-1191.
- Zammit, P. S., Relaix, F., Nagata, Y., Ruiz, A. P., Collins, C. A., Partridge, T. A., Beauchamp, J. R. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. *J Cell Sc* 2006b; 119: 1824-1832.
- Zarubin, T. and Han, J. Activation and signalling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 2005; 15: 11-18.
- Zechner, D., Craig, R., Hanford, D. S., McDonough, P. M., Sabbadini, R. A., Glembotski, C. C. MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. *J Biol Chem* 1998; 273: 8232-8239.

- Zhang, J., Li, X.-X., Bian, H.-J., Liu, X.-B., Ji, X.-P., Zhang, Y. Inhibition of the activity of Rho-kinase reduces cardiomyocyte apoptosis in heart ischemia/reperfusion via suppressing JNK-mediated AIF translocation. *Clin Chim Acta* 2009; 401: 76-80.
- Zhang, S., Yan, Y., Daubert, R. A., Han, J., Rick, Schnellmann, R. ERK promotes hydrogen peroxide-induced apoptosis through caspase-3 activation and inhibition of Akt in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F440-F447.
- Zhang, W. and Liu, H. T. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res* 2002; 12: 9-18.
- Zhao, W., Lin, Z. X., Zhang, Z. Q. Cisplatin-induced premature senescence with concomitant reduction of gap junction in human fibroblasts. *Cell Res* 2004; 14: 60-66.
- Zhou, H. R., Islam, Z., Pestka, J. J. Induction of competing apoptotic and survival signaling pathways in the macrophage by the ribotoxic trichothecene deoxynivalenol. *Toxicol Sci* 2005; 87: 113-122.
- Zhou, H., Summers, S., Birnbaum, M. J., Pittman, R. N. Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273: 16568-16575.
- Zhou, H. Z., Karliner, J. S., Gray, M. O. Moderate alcohol consumption induces sustained cardiac protection by activating PKC-epsilon and Akt. *Am J Hear Circ Physiol* 2002; 283: H165-174.
- Zhou, J., Schmid, T., Brune, B. HIF-1alpha and p53as targets of NO in affecting cell proliferation, death and adaptation. *Curr. Mol Med* 2004; 4:741-751.
- Zhuang, S., Demirs, J.T., Kochevar, I.E. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 2000; 275: 25939-25948.
- Zhuang, S., Yan, Y., Daubert, R. A., Han, J., Schnellmann, R. G. ERK promotes hydrogen peroxide-induced apoptosis through caspase-3 activation and inhibition of Akt in renal epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F440-F447.

Publikacijų disertacijos tema sąrašas

1. Bironaitė D, **Baltriukienė D**, Uralova N, Stulpinas A, Bukelskienė V., Imbrasaitė A, Kalvelytė A. (2009) Role of MAP kinases in nitric oxide induced muscle-derived adult stem cell apoptosis. Cell Biology International (Epub ahead of print)
2. **Baltriukienė, D.**, Bironaitė, D., Imbrasaitė, A., Bukelskienė, V., Kalvelytė, A. (2008) The role of mitogen-activated protein kinases in hydrogen peroxide-induced myogenic cell apoptosis. Biologija 54(3): 213-216.
3. Širmenis, R., **Baltriukienė, D.**, Kalvelytė, A., Balčiūnas, M., Malickaitė, R., Žurauskas, E., Bukelskienė, V. (2007) Ląstelinė kardiomioplastika naudojant autologines miogenines ląsteles. Lietuvos chirurgija 5(3): 260-67.
4. **Baltriukiene D.**, Kalvelyte A., Bukelskiene V. (2007) Induction of apoptosis and activation of JNK and p38 MAPK pathways in the deoxynivalenol-treated model cell lines. ATLA-Alternatives To Laboratory Animals 35(1):53-59.
5. Bukelskienė, V., **Baltriukienė, D.**, Bironaitė, D., Imbrasaitė, A., Širmenis, R., Balčiūnas, M., Žurauskas, E., Kalvelytė A. (2005) Muscle-derived primary stem cell lines for heart repair. Seminars in Cardiology 11(3):99-105.

Pristatymai konferencijose

1. **D. Baltriukienė**, D. Bironaitė, A. Stulpinas, A. Imbrasaitė, V. Bukelskienė, A. Kalvelytė. Mitogenų aktyvinamų kinazių vaidmuo miogeninių ląstelių išgyvenimo/žūties reguliacijoje. Lietuvos Biochemikų Draugijos X suvažiavimas-konferencija. 2008.
2. **D. Baltriukienė**, A. Stulpinas, D. Bironaitė, A. Imbrasaitė, V. Bukelskienė, A. Kalvelytė. JNK signaling pathway in cisplatin and doxorubicin-induced myogenic cell apoptosis. MOLEDA Summer School “Non-viral gene transfer into muscle and skin“, France, 2007
3. Bironaitė D., **D. Baltriukienė**, N. Uralova, V. Bukelskienė, A. Stulpinas, A. Imbrasaitė, A. Kalvelytė. Role of MAP Kinases in Nitric Oxide Induced Muscle-Derived Adult Stem Cell Apoptosis. MOLEDA Summer School “Non-viral gene transfer into muscle and skin“France, 2007
4. **D. Baltriukienė**, V. Bukelskienė, A. Stulpinas, N. Uralova, D. Bironaitė, A. Imbrasaitė, A. Kalvelytė. Role of JNK in muscle-derived stem cell proliferation and apoptosis. Intertanional conference “Stem cells and cell therapy”, Latvia, 2007.

5. A. Kalvelytė, D. Bironaitė, **D. Baltriukienė**, A. Stulpinas, A. Imbrasaitė, V. Bukelskienė, N. Uralova, J. Šmigelskaitė. Pro-apoptotic Role of Survival PI3K/AKT Signaling Pathway in Muscle-derived Stem Cell Lines. Tarptautinė mokslinė konferencija “Šiuolaikinės Biochemijos iššūkiai ir galimybės”, 2007.
6. **D. Baltriukienė**, A.V. Kalvelytė, A. Packevičienė, R. Jarašienė, D. Bironaitė, A. Stulpinas, A. Imbrasaitė, N. Uralova, V. Bukelskienė. Myogenic Stem Cell Therapeutic Potential for Myocardium Repair. Tarptautinė mokslinė konferencija “Šiuolaikinės Biochemijos iššūkiai ir galimybės”, 2007.
7. Bironaitė, D., Bukelskienė, V., **Baltriukienė, D.**, Šmigelskaitė, J., Imbrasaitė, A., Stulpinas, A., Kalvelytė, A. Search of possible of PI3K/Akt pro-apoptotic signaling in muscle-derived primary cell lines after cisplatin treatment. *3rd Focused Meeting on PI3K signaling and disease*, UK, 2006.
8. Bukelskienė, V., **Baltriukienė, D.**, Bironaitė, D., Širmenis, R., Balčiūnas, M., Kalvelytė A. (2005) Development of muscle-derived primary cell lines for heart repair. *Journal of cardiovascular surgery*. Abstracts 46(3) Suppl.1 p.85.

Padėka

Norėčiau padėkoti visiems parėmusiems mane šio darbo metu. Ypatingai norėčiau padėkoti

- darbo vadovei dr. Audronei V. Kalvelytei už paramą, pagrindines idėjas, kritines pastabas bei vertingus patarimus. Esu dėkinga už vadovavimą bei neišsenkantį mokslinį entuziazmą
- dr. Virginijai Bukelskienei už vertingus patarimus ir visokeriopą pagalbą
- dr. Daivai Bironaitei už pagalbą atliekant tēmės citometrijos tyrimus
- Marijai Ger ir dr. Mindaugui Valiui už galimybę pasinaudoti konfokaliniu mikroskopu
- kolegoms dr. Aušrai Imbrasaitei, Natalijai Uralovai, Jolantai Bukauskaitei, Aurimui Stulpinui ir visiems Vystymosi biologijos skyriaus bei Vivariumo darbuotojams už kasdieninį bendradarbiavimą bei draugišką darbo atmosferą.
- Raimondui Širmeniui už chirurginę pagalbą atliekant ekperimentus su gyvūnais
- dr. Edvardui Žurauskui už pagalbą atliekant histologinę analizę
- šeimai ir draugams už supratimą, paramą ir palaikymą

Finansinė parama

- LVMSF inicijuota programa “Kamieninių ląstelių integracija, jų išgyvenimas ir funkcinis pajėgumas patologiniame židinyje. Ikiklinikiniai tyrimai”, reg. Nr. U-04001, 2004-2006.
- LVMSF Prioritetinių Lietuvos mokslinių tyrimų ir eksperimentinės plėtros krypties programos projektas „Fundamentiniai kamieninių ląstelių funkcionavimo mechanizmų tyrimai“, reg. Nr. C-07023, 2007-2009.
- LVMSF Aukštųjų technologijų plėtros projektas „Širdies struktūrų regeneracijos modelių kūrimas, naudojant kamienines ir specializuotas ląsteles bei biologinius audinius“, reg. Nr. B-07041, 2007-2009.
- LVMSF stipendija 2007-2008.