

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras



Molekulinės biologijos bakalauro studijų programos IV k. studentė

Greta TAMULAITYTĖ

Bakalauro darbas

**PKVL terapinis potencialas kiaušidžių funkcijai priešlaikinio kiaušidžių  
nepakankamumo gyvūnų modelyje**

Darbo vadovas:

Dr. Veronika Viktorija Borutinskaitė

Vilnius, 2023

**PKVL terapinis potencialas kiaušidžių funkcijai priešlaikinio kiaušidžių nepakankamumo gyvūnų modelyje**

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos instituto Ląstelės molekulinės biologijos skyriuje

Greta Tamulaitytė

/parašas/

Darbo vadovas:

Leisti / neleisti gintis:

Dr. Veronika Viktorija Borutinskaitė

/parašas/

2023-05-28

## TURINYS

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>SANTRUMPOS</b> .....                                                                   | 5  |
| <b>ĮVADAS</b> .....                                                                       | 6  |
| <b>1. LITERATŪROS APŽVALGA</b> .....                                                      | 7  |
| 1.1. Priešlaikinis kiaušidžių nepakankamumas .....                                        | 7  |
| 1.1.1. Kiaušidės ir gimda .....                                                           | 7  |
| 1.1.2. Priešlaikinio kiaušidžių nepakankamumo etiologija .....                            | 8  |
| 1.1.3. Priešlaikinio kiaušidžių nepakankamumo simptomai, dignostika ir gydymas .....      | 10 |
| 1.2. Nevaisingumas.....                                                                   | 10 |
| 1.3. Ląstelėmis pagrįstos kiaušidžių atnaujinimo ir nevaisingumo gydymo strategijos ..... | 11 |
| 1.3.1. Periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės .....                                   | 12 |
| 1.3.2. Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių paviršiaus žymenys .....                | 15 |
| <b>2. MEDŽIAGOS IR METODAI</b> .....                                                      | 19 |
| 2.1. Medžiagos.....                                                                       | 19 |
| 2.2. Metodai .....                                                                        | 21 |
| 2.2.1. Ląstelių skyrimas iš periferinio kraujo .....                                      | 21 |
| 2.2.2. Periferinio kraujo vienbranduolių limpančių ląstelių auginimas .....               | 21 |
| 2.2.3. Fluorescentinė mikroskopija .....                                                  | 21 |
| 2.2.4. Giemsa dažymas .....                                                               | 22 |
| 2.2.5. $\beta$ -galaktozidazės metodas .....                                              | 22 |
| 2.2.6. Tėkmės citometrija.....                                                            | 22 |
| 2.2.7. RNR išskyrimas .....                                                               | 22 |
| 2.2.8. kDNR sintezė .....                                                                 | 22 |
| 2.2.9. Genų raiškos įvertinimas RL-kPGR metodu .....                                      | 23 |
| 2.2.10. Bandomosios pelės.....                                                            | 23 |
| 2.2.11. Baltymų analizė naudojant <i>Western blot</i> metodą.....                         | 25 |
| 2.2.12. Statistinė analizė .....                                                          | 25 |
| <b>3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS</b> .....                                                | 26 |

|                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių išskyrimas ir charakterizavimas .....                                                                                                                | 27 |
| 3.1.1. Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių skyrimas ir charakterizavimas .....                                                                                                                | 27 |
| 3.1.2. Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių augimas ir gyvybingumas <i>in vitro</i> .....                                                                                                      | 29 |
| 3.1.3 Periferinio kraujo vienbranduolių limpančių ląstelių augimas ir charakterizavimas.....                                                                                                         | 29 |
| 3.2. Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių terapinio potencialo priešlaikinio kiaušidžių<br>nepakankamumo atstatymui po chemoterapijos tyrimas.....                                             | 32 |
| 3.2.1. Genų <i>Pcna</i> , <i>Mki67</i> , <i>Ccnd1</i> , <i>Amh</i> , <i>Amhr</i> , <i>Boll</i> , <i>Fshr</i> , <i>Mvh</i> , <i>Gja</i> raiškos pokyčiai pelės<br>kiaušidžių bei gimdos audinyje..... | 33 |
| 3.2.2. Baltymų, susijusių su folikulogenezės ir ląstelės ciklo, apoptozės reguliavimu, raiškos<br>analizė <i>in vivo</i> .....                                                                       | 35 |
| <b>IŠVADOS</b> .....                                                                                                                                                                                 | 37 |
| <b>SANTRAUKA</b> .....                                                                                                                                                                               | 38 |
| <b>SUMMARY</b> .....                                                                                                                                                                                 | 39 |
| <b>LITERATŪROS SĄRAŠAS</b> .....                                                                                                                                                                     | 40 |
| <b>PRIEDAI</b> .....                                                                                                                                                                                 | 43 |

## SANTRUMPOS

AMH - (angl. *anti-müllerian hormone*)- antimiulerinis hormonas

*Amhr* - antimiulerinis hormono receptorius

Bcl-2 - (angl. *B-cell lymphoma 2*)- B ląstelių limfomos 2 genas/baltymas

CAR - chimerinis antigeno receptorius

*Ccnd1* – (angl. *cyclin D1*)- ciklinas D1

CD –(angl. *cluster of differentiation*) – diferenciacijos antigenas

DAPI - 4'-6-diamidino-2-fenilindolas

*Fshr* - (angl. *follicle-stimulating hormone receptor*)- folikulus stimuliuojančio hormono receptorius

*Gja* -(angl. *gap junction alpha-1 protein*)- tarpinės gijos genas

HKL - hematopoetinės kamieninės ląstelės

HLA - (angl. *human leukocyte antigen*)- žmogaus leukocitų antigenas

Hsp70 –(angl. *heat shock protein 70*)- šiluminio šoko baltymas 70

MHC -(angl. *major histocompatibility complex*) - didysis audinių suderinamumo kompleksas

*Mki67* - (angl. *marker Of Proliferation Ki-67*) - proliferacijos žymeklis Ki-67

MKL - mezenchiminės kamieninės ląstelės

mTOR - (angl. *the mammalian target of rapamycin*)- žinduolių rapamicino taikiny

NK ląstelės – natūralios ląstelės žudikės

p27 - (angl. *cyclin-dependent kinase inhibitor, CDKN1B* )- nuo ciklino priklausomas kinazės inhibitorius

Pcna - (angl. *proliferating cell nuclear antigen*)- proliferuojančios ląstelės branduolio antigenas

PK – periferinis kraujas

PKN – priešlaikinis kiaušidžių nepakankamumas

PKVL – periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės

PRP – (angl. *Platelet Rich Plasma*)- trombocitais praturtinta plazma

RL-kPGR – realaus laiko kiekybinė polimerazės grandininė reakcija

## IVADAS

Su nevaisingumu susiduria vis daugiau šeimų. Kas šešta pora pasaulyje yra susidūrusi su nevaisingumo problemomis (t. y. apie 10-15 % visų šeimų). Pakartotinai su nevaisingumu susiduria net 10-25% porų, nes negauna tinkamo, veiksmingo gydymo. Lietuvoje nevaisingumas taip pat didėja, yra apie 50 000 nevaisingų šeimų, o kiekvienais metais šis skaičius padidėja apie 2000. Šis spartus didėjimas rodo, jog šiuo metu esamos ir prieinamos procedūros nėra visiškai efektyvios. Nevaisingumas įtakoja daug daugiau nei galimybę pastoti, bet ir bendravimą, psichologinę, fizinę būklę. Šio sutrikimo priežastys gali būti įvairios, tačiau dažnai pasitaikanti yra prieššlaikinis kiaušidžių nepakankamumas (PKN), kuris apibūdinamas kaip kiaušidžių funkcijos ir folikulų atsargos kiaušidėse praradimas, kiaušidžių reprodukcinio potencialo sumažėjimas ir PKN paliečia ~4% moterų visame pasaulyje. Gydant nevaisingumą yra taikoma pakaitinė hormonų terapija, kuri gali palengvinti simptomus bei sumažinti ilgalaikių pasekmių riziką, bet ji galutinai neatkuria kiaušidžių funkcijos ir vaisingumo, todėl yra ieškoma naujų, perspektyvesnių gydymo būdų.

Pastaraisiais metais ląstelių terapija laikoma novatorišku įvairių ligų, ypač autoimuninių ligų, gydymo būdu. Ląstelių terapija yra ypač svarbi sergančiųjų kraujo onkologinėmis ligomis, solidinių navikų gydymui, o tai taip pat ir regeneracinėje medicinoje atstatant pažeistas įvairių organų ląsteles. Vis daugiau įrodymų rodo, kad periferinis kraujas (PK) gali būti alternatyvus kamieninių/progenitorinių ląstelių šaltinis tinkantis klinikiniam naudojimui. Periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės apima pogrupius iš limfoidinės linijos (T ląstelės, B ląstelės, NK ląstelės) ir mieloidinės linijos (monocitai, dendritinės ląstelės), taip pat galima aptikti ir kamieninių ląstelių. Tačiau iki šiol periferinio kraujo kamieninių/progenitorinių ląstelių biologinės savybės nėra visiškai suprantamos, todėl labai svarbu tirti jų savybes bei suprasti jų taikymo terapijoje galimybes.

**Darbo tikslas** - įvertinti periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių terapinį potencialą kiaušidžių funkcijai prieššlaikinio kiaušidžių nepakankamumo gyvūnų modelyje.

### **Darbo uždaviniai:**

1. Charakterizuoti periferinio kraujo vienbranduolės ląsteles, įvertinti jų augimo potencialą.
2. Įvertinti periferinio kraujo ląstelių terapinį poveikį eksperimentiniame nevaisingumo modelyje *in vivo*.
3. Nustatyti su folikulogenezės procesu susijusių genų ir baltymų raiškos pokyčius pelių kiaušidžių ir gimdos audiniuose.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1. Priešlaikinis kiaušidžių nepakankamumas

Priešlaikinis kiaušidžių nepakankamumas (PKN; sinonimai – priešlaikinis kiaušidžių išsekimas, priešlaikinė menopauzė, hipergonadotropinė amenorėja, hipergonadotropinis hipogonadizmas, pokastracinis sindromas) atsiranda, kai moters kiaušidės nustoja normaliai funkcionuoti nesulaukus 40 metų. Kai taip nutinka, kiaušidės negamina įprasto hormono estrogeno kiekio arba reguliariai neišskiria kiaušinėlių.

Yra du PKN tipai. Pirmas tipas (afolikulinis) yra visiškas kiaušidžių folikulų išsekvojimas. Ši forma randama pacientuose, sergančiuose PKN, kuri susijusi su lytinių liaukų disgeneze, chromosomų aberacijomis ir lyties vystymosi sutrikimais. Kiaušidžių folikulų trūkumas atsiranda dėl to, kad lytinės ląstelės nesugeba vystytis arba jų nėra. Antro tipo (folikulinės) PKN folikulinės struktūros išsaugomos kiaušidėse, todėl vis tiek galimas indukuotas arba spontaniškas kiaušidžių funkcijos grįžimas.

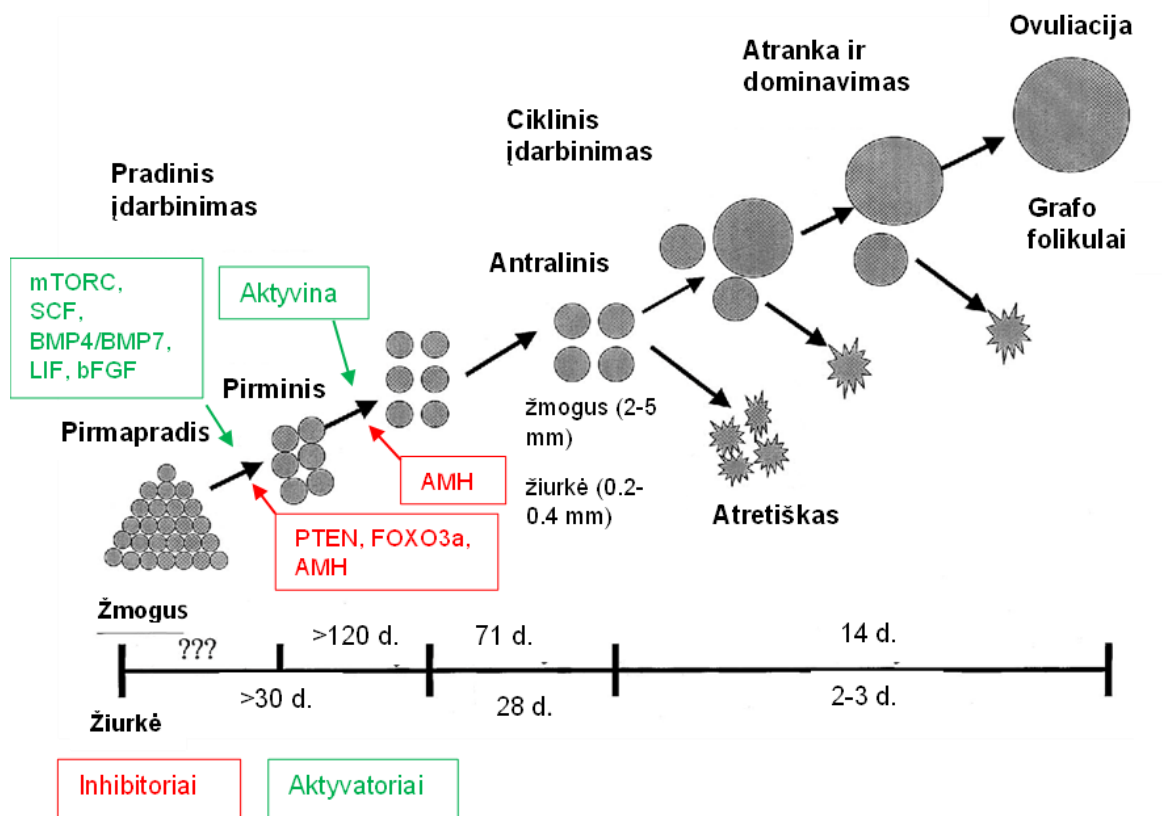
Folikulogenezė, tai yra sudėtingas ir organizuotas procesas, kai bręsta kiaušidės folikulai. Folikulogenezės pirminiai komponentai yra somatinės ląstelės bei nesubrendę ovocitai, kurie, augant folikului, palaipsniui bręsta, didėja. Šio proceso metu maži, užuomazginiai folikulai auga etapais ir pasiekia galutinį ketvirtąjį lygį, tuomet virsta pūsliniais (tretiniais) kiaušidės folikulais.

Gaužikų folikulogenezė labai panaši į žmogaus organizme vykstančią folikulogenezę, todėl jie tampa labai patraukus modelis nevaisingumo tyrime (1 pav.).

#### 1.1.1. Kiaušidės ir gimda

Kiaušidės yra mažos, ovalo formos liaukos, esančios abiejose gimdos pusėse, kurias laisvai laiko pilvaplovės raiščiai (Training.seer.cancer.gov). Jie gamina ir saugo kiaušinėlius (taip pat vadinamus kiaušialąstėmis). Kiaušidėse yra tūkstančiai folikulų, mažų, skysčio užpildytų maišelių, kuriuose yra po vieną nesubrendusį kiaušinėlį. Esamų folikulų skaičius daug pasako apie vaisingumo būklę, todėl jų tikrinimas gali padėti diagnozuoti ir gydyti nevaisingumą. Reaguojant į didėjančią gonadotropino, atpalaiduojančio hormono (GnRH), kiekį kiaušidės gamina hormonus, kaip estrogeną ir progesteroną, kurie kontroliuoja menstruacinį ciklą ir nėštumą. Taip pat kiaušidėse yra kiaušinėlių ląstelės arba oocitai, kurie pradeda vystytis gimdoje (Clevelandclinic.org, 2022). Antimiulerinis hormonas (AMH) yra glikoproteinas, kurį gamina priešantralinių ir mažųjų antralinių folikulų granulozės ląstelės. AMH priklauso peptidų augimo ir augimo diferenciacijos faktorių grupei. Jo

koncentracija mažėja su amžiumi, todėl jis yra labai svarbus vaisingumo sumažėjimo, įskaitant priešlaikinį kiaušidžių nepakankamumą, žymuo. Pacientams, sergantiems PKN, AMH lygis yra labai mažas arba nereikšmingas (Jankowska K., 2017).



**1 pav.** Kiaušidžių folikulų gyvavimo ciklas (Mcgee E.A., & Hsueh A.J., 2000).

Dar vienas svarbus reprodukcinės sistemos organas yra gimda, kurioje vyksta vieno ar kelių embrionų ir vaisiaus vystymasis iki gimimo. Gimda yra į hormonus reaguojantis lytinis organas, kurio gleivinėje yra liaukų, kurios atsakingos už embriono maitinimą. Žmogaus gimdos reprodukcinė funkcija yra priimti apvaisintą kiaušialąstę – zigotą, kuri keliauja kiaušintakiu (Clevelandclinic.org, 2022). Chemoterapiniai vaistai, radioterapija gali reikšmingai pakenkti gimdos funkcijai ir sukelti daugybę pasekmių tokių kaip nevaisingumas, persileidimas, vaisiaus augimo apribojimus, vaisiaus nepakankamumas ir kt.

### 1.1.2. Priešlaikinio kiaušidžių nepakankamumo etiologija

Priežastys, sukeliančios PKN ar kitus kiaušidžių pažeidimus, sutrikimus:

1. Genetinės anomalijos ir veiksniai, lemiantys PKN moterims, svyruoja nuo reikšmingų chromosomų anomalijų, submikroskopinių chromosomų delecijų ir dubliavimosi bei DNR sekos

variacijų genuose, kurie kontroliuoja daugybę biologinių procesų. Priešlaikinis kiaušidžių nepakankamumas gali turėti genetinių priežasčių, tokių kaip Turnerio sindromas, trapusis X sindromas (*FMR1* genas) arba 1a tipo pseudohipoparatiroidizmas (*GNAS1* genas). PKN gali būti siejamas su kitomis ne endokrininėmis ir endokrininėmis ligomis (Rrc.com, 2019).

2. Sisteminiai sutrikimai, turintys įtakos kiaušidžių funkcijai: piktybinės hematologinės ligos; nepiktybinės hematologinės ligos; įgimtos medžiagų apykaitos klaidos (Rrc.com, 2019). Pastebėta, kad kai kurie sisteminiai sutrikimai yra susiję su ankstyvu kiaušidžių funkcijos susilpnėjimu arba vystymosi defektu.
3. Agresyvios operacijos, chemoterapija ir daugybė specifinių vaistų (skydliaukės, epilepsijos, tam tikrų receptinių nesteroidinių vaistų nuo uždegimo (NVNU), vartojamų artritui gydyti, neuroleptiniai vaistai nuo psichozės) kelia grėsmę moters vaisingumui. Folikulų skaičiaus sumažėjimas po chemoterapijos gali sukelti reprodukcinio potencialo sumažėjimą, kiaušidžių nepakankamumą ir menopauzę praėjus daugeliui metų po onkologinio gydymo net ir pacientams, kuriems kūdikystėje buvo taikoma chemoterapija (Bedoschi G, Navarro P.A., Oktay K., 2016).
4. Kita priežastis gali būti autoimuninis procesas, kurį sudaro antikūnų prieš kiaušidę gamyba. Pacientams, sergantiems PKN, gali išsivystyti gretutinės autoimuninės ligos, tokios kaip autoimuninis tiroiditas (Hashimoto liga), autoimuninis antinksčių nepakankamumas (Addisono liga), 1 tipo diabetas, celiakija, albinizmas, reumatoidinis artritas, sisteminė raudonoji vilkligė ir sunkioji miastenija. PKN gali būti autoimuninio poliglandulinio sindromo (APS) dalis (Jankowska K., 2017).
5. Greičiausiai kai kurios virusinės infekcijos yra PKN priežastis. Kitos galimos priežastys yra tuberkuliozė, maliarija ir šigeliozės infekcija. Rūkymas taip pat yra vienas iš pagrindinių veiksnių, lemiančių ankstyvą PKN. Tačiau šios konkrečios priežasties atsiradimas priklauso nuo pačios moters (Jankowska K., 2017).

PKN turi rimtų pasekmių sveikatai. Trumpalaikės pasekmės gali būti vazomotoriniai simptomai, tokie kaip karščio pylimas, naktinis prakaitavimas, širdies plakimas ar galvos skausmas. Ilgalaikė PKN rizika sveikatai yra nevaisingumas, osteoporozė, širdies ir kraujagyslių bei neurologinės ligos ir padidėjusi ankstyvos mirties rizika. Pacienčių, sergančių PKN, natūralaus pastojimo tikimybė yra 5–10 proc. Taip pat turintys šį sutrikimą patiria fizinį, psichologinį diskomfortą (Podfigurna-Stopa A et al. 2016).

### 1.1.3. Priešlaikinio kiaušidžių nepakankamumo simptomai, diagnostika ir gydymas

Pagrindinis nespecifinis PKN požymis – oligomenorėja (retos mėnesinės) arba amenorėja (mėnesinių nebuvimas). Amenorėja gali būti pirminė arba antrinė, suaugusios moterys dažniausiai skundžiasi nevaisingumu.

Klinikinėje praktikoje dažniausiai vadovaujamasi šiais PKN diagnostikos kriterijais kaip amžius, amenorėja – >4 mėnesiai, FSH kiekio kraujyje padidėjimas, estradiolio kraujyje kiekio sumažėjimas. Papildomai gali būti atlikti tyrimai kaip antimiulerinio hormono tyrimas (rodo kiaušidžių rezervą), ultragarsinė diagnostika.

Standartinių PKN gydymo metodikų nėra. Kiekvienai pacientei gydymas parenkamas individualiai ir gali būti pasiūlyta pakaitine (estrogenų ir progestinų) hormonų terapija. Jeigu kiaušidžių rezervas nėra visiškai išsekęs, galima bandyti stimuliuoti ovuliaciją ir taikyti įvairius pagalbinio apvaisinimo metodus.

Šiuo metu yra ir neįtraukų į gydymo gaires metodikų PKN gydymui. Viena iš jų yra trombocitais praturtintos plazmos (PRP) injekcijos. Procesas vyksta suleidžiant trombocitais praturtintą plazmą (PRP) tiesiai į kiaušides, kad būtų skatinamos esamos kamieninės ląstelės gaminti geresnės kokybės kiaušinėlius. Šiuo metu atliekami moksliniai tyrimai, siekiant įvertinti PRP gydymo efektyvumą ([Orthoinfo.aaos.org](http://Orthoinfo.aaos.org), 1995).

### 1.2. Nevaisingumas

Nevaisingumas yra būklė, kai vyras ar moteris negali pastoti dėl reprodukcinės sistemos problemų. Nevaisingumas gali būti pirminis arba antrinis. Pirminis nevaisingumas yra tada, kai kas nors negali pastoti. Antrinis nevaisingumas yra tada, kai kas nors anksčiau pastojo, bet dabar nebegali ([Nhs.uk](http://Nhs.uk), 1948).

Nevaisingumas yra priešlaikinio kiaušidžių nepakankamumo pasekmė, tačiau jis taip gali atsirasti ir dėl kitų priežasčių kaip:

- Policistinių kiaušidžių sindromas (PCOS).
- Skydliaukės problemos – tiek pernelyg aktyvi skydliaukė, tiek nepakankama skydliaukės veikla gali užkirsti kelią ovuliacijai.

- Gimdos kaklelio problemos - kai vyksta ovuliacija, gleivės gimdos kaklelyje tampa plonesnės, todėl spermatozoidai gali lengviau pro jį plaukti. Jei yra gleivių problemų, gali būti sunkiau pastoti.
- Miomos - ne vėžiniai augliai, vadinami fibroidais gimdoje arba aplink jį, gali turėti įtakos vaisingumui. Kai kuriais atvejais jie gali neleisti apvaisintam kiaušiniui prisitvirtinti gimdoje.
- Endometrioze - yra būklė, kai kitose vietose, pavyzdžiui, kiaušidėse, pradeda augti maži gimdos gleivinės gabalėliai (endometriumas), tai gali pažeisti kiaušides ar kiaušintakius ir sukelti vaisingumo problemų.
- Vaistai ir gydymas - kai kurių rūšių vaistai ir gydymas gali turėti įtakos vaisingumui (pvz., chemoterapija) (Nhs.uk, 1948).

Yra 3 pagrindiniai vaisingumo gydymo tipai:

- vaistai;
- chirurginės procedūros;
- pagalbinis pastojimas, įskaitant intrauterinį apvaisinimą (IUI) ir apvaisinimą *in vitro* (IVF);
- hormonų terapija (gydymas hormonais yra skirtas skatinti kiaušinėlių brendimą ir ovuliaciją) (Nhs.uk, 1948).

### 1.3. Ląstelėmis pagrįstos kiaušidžių atnaujinimo ir nevaisingumo gydymo strategijos

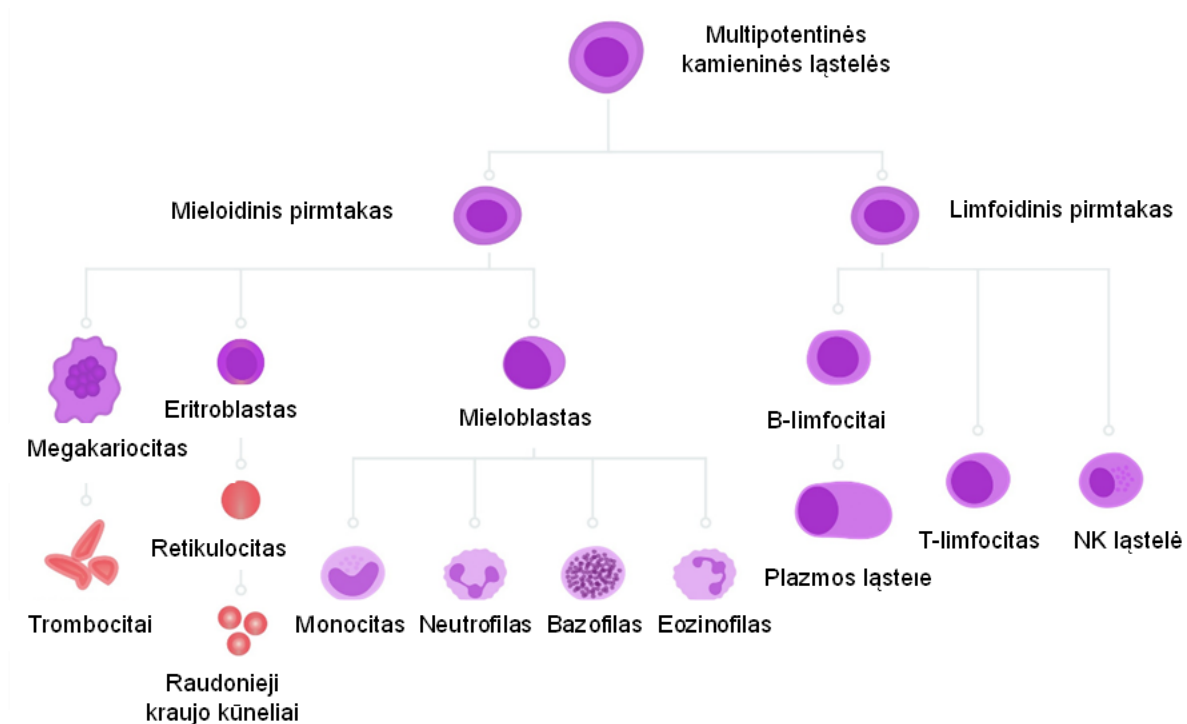
Kol kas nevaisingumo atvejų tik daugėja, tai rodo, jog nei vienas iš esamų gydymo metodų, procedūrų nėra užtikrintai efektyvus, todėl ieškoma naujų būdų kovoti su šia būkle arba bandoma pritaikyti jau esamas gydymo strategijas. Pastaraisiais metais vis daugiau dėmesio sulaukia ląstelių terapija, kuri yra žmogaus ląstelių transplantacija, siekiant pakeisti arba atstatyti pažeistus audinius ir (arba) ląsteles. Naudojant naujas technologijas, novatoriškus produktus ir neribotą vaizduotę, daug skirtingų ląstelių tipų gali būti naudojamos kaip įvairių ligų ir būklių terapijos arba gydymo dalis (Aabb.org, 2016). Pasitelkiant šią terapiją gali būti naudojamos įvairios ląstelės (hematopoetinės kamieninės ląstelės (HKL, *angl. Hematopoietic stem cells, HSC*), raumenų kamieninės ląstelės, mezenchiminės kamieninės ląstelės, limfocitai, dendritinės ląstelės) priklausomai nuo to, ką norima gydyti. Kol kas naudojamos ląstelių terapijos yra: kamieninių kraujo ląstelių transplantacija arba kaulų čiulpų transplantacija – kamieninių ląstelių infuzija po aukštų dozių chemoterapijos, taikoma gydant kai kurias onkohematologines ligas ir agresyvius solidinius navikus; T-ląstelių perkėlimo terapija (CAR T ląstelių terapija) - tai yra vėžio imunoterapijos gydymo būdas, kurio metu naudojamos imuninės ląstelės, vadinamos T ląstelėmis, kurios yra genetiškai modifikuotos laboratorijoje, kad jos galėtų veiksmingiau nustatyti vėžio ląstelių naikinimo vietą (Aabb.org, 2016).

Daugybė tyrimų su gyvūnais parodė didelę kamieninių ląstelių naudą neveiksmingų kiaušidžių atsistatymui. Kaip rodo tokie tyrimai, gydymas kamieninėmis ląstelėmis gali sukelti hormonų lygio atstatymą, folikulų aktyvavimą, kiaušidžių angiogenezę ir funkcijų atkūrimą. Tuo tarpu molekuliniai tyrimai atskleidė, kad kamieninių ląstelių funkcija daugiausia priklauso nuo jų parakrininių veiksmų, kurie gali sukelti daugybę kiaušidžių angiogenezės skatinimo ir ląstelių funkcijų reguliavimo veiksmų. Nepaisant to, tyrimai, naudoję ligų modelius, atskleidė ir tam tikrų trūkumų. Klinikiniai tyrimai parodė, kad po kamieninių ląstelių transplantacijos PKN pacientams gali pasireikšti menstruacinis ciklas ir net pastojimas, tačiau tokių atvejų skaičius yra mažas. Tik laboratoriniais eksperimentais ir klinikiniais tyrimais žymiai pagerinus kamieninių ląstelių terapijos saugumą ir poveikį, ji tikrai gali būti naudinga daugiau pacientų. Be to tam, reikalingi tinkami, standartizuoti kamieninių ląstelių transplantacijos metodai (Wang MY, Wang YX, Li-Ling J, Xie HQ., 2022), (Navakauskienė R ir kt., 2023).

#### 1.3.1. Periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės

Hematopoetinė sistema užtikrina reguliuojamą pilno subrendusių kraujo kūnelių komplemento gamybą periferinėje kraujotakoje (Fliser D., 2011). Visos kraujo ląstelės yra kilusios iš primityviausios kraujodaros ląstelės, vadinamos multipotentine hemopoetine kamienine ląstele (Jagannathan-Bogdan M, Zon LI., 2013).

Hematopoetinę sistemą sudaro organai ir audiniai, pirmiausia kaulų čiulpai, blužnis, tonzilės ir limfmazgiai, dalyvaujantys kraujo gamyboje. Kietieji kraujo komponentai susidaro hematopoezės būdu, tai yra nuolatinis, reguliuojamas kraujo ląstelių susidarymas. Yra trys pagrindinės hematopoezės funkcijos, įskaitant deguonies tiekimą, hemostazę ir šeimininko apsaugą (RN.com, 2016).



**2 pav.** Hematopoetinė sistema (Pulsenotes.com. London, UK: Pulsenotes. Adresas: <https://www.pulsenotes.com/>).

Ląstelių komponentai, kuriuos galima išskirti iš žmogaus periferinio kraujo, yra eritrocitai (raudonieji kraujo kūneliai), leukocitai (baltieji kraujo kūneliai) ir trombocitai. Taip pat galima surinkti plazmą, skystą periferinio kraujo komponentą, ir tai yra priemonė, per kurią šios kraujo ląstelės cirkuliuoja organizme. Labai dinamiška periferinio kraujo ląstelių sudėtis ir jos svarba tiriant imuninę sistemą kartu su neinvaziniais ir lengvai prieinamais baltųjų kraujo kūnelių populiacijos rinkimo metodais padarė ją plačiausiai naudojama sistema tyrimams ir terapijos kūrimui. Žmogaus periferinio kraujo populiarumas moksliniuose tyrimuose yra dėl baltųjų kraujo kūnelių populiacijos, ypač periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių (PKVL), kurios apima pogrupius iš limfoidinės linijos (T ląstelės, B ląstelės, NK ląstelės) ir mieloidinės linijos (monocitai, makrofagai, dendritinės ląstelės). Šie leukocitai yra esminiai įgimto ir adaptyvaus imuninio atsako komponentai ir yra pagrindiniai daugelio ląstelių terapijų, tokių kaip CAR-T, kūrimo blokai (Criver.com, 1947).

Periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės (PKVL) yra įvairios specializuotos imuninės ląstelės, kurios veikia kartu, kad apsaugotų mūsų kūnus nuo kenksmingų patogenų. Jų vieta periferiniame kraujyje yra reikšminga, nes jie veikia kaip apsaugos nuo infekcijų ir ligų linija. Periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės (PKVL) yra mažiau tankios nei kitos mūsų periferinėje kraujotakoje esančios ląstelės, pvz. raudonieji kraujo kūneliai ir granulocitai. Daugelis mūsų imuninių ląstelių yra PKVL, įskaitant limfocitus (T ląstelės, B ląstelės ir NK ląstelės), monocitus ir dendritines ląsteles (Puckrin Z., 2022). Tiek žmogaus B, tiek T ląstelės yra suspensinės, nors jos išreiškia keletą adhezijos

molekulių, kurias naudoja audinių nukreipimui ir chemotaksiui (Guess T., 2016). NK ląstelės taip pat suspensinės, nors gali pasižymėti adhezinėmis savybėmis, kai į kultūrą pridedama IL-2 (Lonza.com, 1897). Monocitai auga kaip suspensinių ir limpančių ląstelių mišinys, o prilipusių ląstelių dalis priklauso nuo auginimo terpės ir dirgiklių (Thermofisher.com, 1956). Dendritinės ląstelės taip pat gali būti įvairios priklausomai nuo įvairių veiksnių, bet limpančios ląstelės yra grynesnės nei suspensinės (Yi H., Lu G., 2012).

PKVL atsiranda kaulų čiulpuose iš hematopoetinių kamieninių ląstelių (HKL). HKL yra visų imuninės sistemos kraujo ląstelių statybinė medžiaga. Kai jie patiria procesą, vadinamą hematopoeze, ir diferencijuojasi į skirtingas ląsteles, jie sukuria dvi skirtingas linijas - mieloidinę ir limfoidinę. PKVL apima tam tikras mieloidines ir limfoidines ląsteles, ypač tas, kurios turi vieną apvalų branduolį. Kadangi HKL išsivysto į skirtingus limfocitus, dendritines ląsteles ir monocitus, jie padeda sustiprinti prisitaikančią ir įgimtą imuninę sistemą (Akadeum.com).

Per pastaruosius 50 metų PKVL tapo vis svarbesni klinikiniuose tyrimuose. PKVL turi būti aukštos kokybės, grynumo ir gyvybingumo, kad būtų galima naudoti klinikinių tyrimų aplinkoje, tačiau jie yra trapūs ir gali būti paveikti kelių veiksnių. Viena iš jų augančio populiarumo priežasčių yra ta, kad PKVL reikalingi norint sukurti genetiškai modifikuotas ląsteles (CAR-T, CAR-NK ir t.t.), naudojamas ląstelių ir genų terapijoje (Puckrin Z., 2022).

Kiekviena iš PKVL ląstelių populiacijų atlieka svarbų vaidmenį kuriant ir palaikant veiksmingą imuninį atsaką. Dėl šios priežasties mokslininkai gali jas panaudoti tirdami imuninių ląstelių elgseną, kai jos yra veikiamos kenksmingų patogenų, ligos progresavimą žmogaus organizme ir veiksnius, turinčius įtakos ilgalaikiam imunitetui. PKVL naudojamos daugybėje sričių, įskaitant: užkrečiamos ligos; vakcinų, vaistų kūrimas; imunologija; individualizuota medicina; tiriant pirminį kraujo ir su krauju susijusių organų vėžį; toksikologija; transplantacijos terapija; ligos modeliavimas (Akadeum.com).

Be vertės, kurią jos teikia mokslo pažangai, šios ląstelės taip pat naudojamos medicinos reikmėms. PKVL nuo senų laikų naudojamos medicinoje perpilant donorinį kraują ligoniams. Tačiau pastaruoju metu buvo pradėtos naudoti ir pacientams, kuriems gali prireikti pagalbos, kurios negalima suteikti tradiciniais metodais. Tai apima genomo redagavimo technologijos naudojimą imuninėms ląstelėms pritaikyti individualiai medicinai ir vėžio gydymui. Mokslininkai pradėjo taikyti genų ir baltymų terapiją tam tikriems pacientams, kurie jau išnaudojo kitas galimybes, gydyti (Akadeum.com).

### 1.3.2. Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių paviršiaus žymenys

Ląstelės paviršiaus žymuo (CD antigenas, angl. *cluster of differentiation*, *CD*) yra baltymai ląstelės membranoje, būdingi tam tikrai ląstelių subpopuliacijai, jų diferenciacijos stadijai ar aktyvacijos būsenai. CD antigenai yra molekulės, iš pradžių apibrėžtos kaip esančios leukocitų ląstelės paviršiuje ir atpažįstamos specifinių antikūnų molekulėmis, tačiau dabar apimančios kai kurias tarpląstelines molekules ir molekules, esančias kitose nei leukocitų ląstelėse (Creativebiomart.net).

CD3 antigenas susideda iš penkių skirtingų polipeptidinių grandinių, kurių molekulinė masė svyruoja nuo 16 iki 28 kD. CD3 turi keturias skirtingas nekintamas grandines: CD3 gama, CD3 delta, CD3 epsilon ir CD3 zeta. Imunologijoje CD3 būdingas T-ląstelėms ir veikia kaip koreceptorius, kuris padeda suaktyvinti citotoksinę T-ląstelę veikdamas paviršiaus baltymą, antigenų receptorių (angl. *T-cell receptor*, *TCR*). OKT3, anti-CD ir antikūnas, nukreiptas prieš CD3  $\epsilon$ , buvo kliniškai patvirtintas naudoti žmonėms imunosupresijai sukelti solidinių organų transplantacijoje atmetimo prevencijai ir gydymui (Norman 1995). CD3 genų defektai yra viena iš sunkaus kombinuoto imunodeficito (SCID), kuris yra autosominis recesyvinis sutrikimas, kuriam būdingas sunkus T ląstelių gamybos arba funkcijos defektas, priežasčių (Sinobiological.com, 2016).

CD4 antigenas yra T limfocitų antigeno receptoriaus komponentas ir žmogaus imunodeficito viruso koreceptorius, glikoproteinas, randamas ląstelių, tokių kaip T ląstelės, monocitai, makrofagai ir dendritinės ląstelės, paviršiuje. CD4 yra koreceptorius, padedantis T ląstelių receptoriui (TCR). TCR kompleksas ir CD4 jungiasi prie skirtingų antigenų pateikiančios MHC II klasės molekulės sričių. CD4 ekstraląstelinis D1 domenas jungiasi prie II klasės MHC  $\beta 2$  srities (Sinobiological.com, 2016).

CD5 baltymas yra I tipo transmembraninis glikoproteinas, randamas timocitų, T limfocitų ir B limfocitų pogrupio paviršiuje. Užkoduotame baltyme yra trys SRCR domenai ir jis gali veikti kaip receptorių, reguliuojantis T-ląstelių proliferaciją. Alternatyvus sujungimas lemia kelis transkripto variantus, koduojančius skirtingas izoformas. Reguliuoja T-ląstelę/B-ląstelių sąveiką, slopina TCR tarpininkaujamą signalizaciją (Elisa-kits.de, 1993).

CD7 yra transmembraninis baltymas, kuris yra imunoglobulinų superšeimos narys. Šis baltymas randamas ant timocitų ir subrendusių T ląstelių. Jis vaidina esminį vaidmenį T-ląstelių sąveikoje ir T-ląstelių/B-ląstelių sąveikoje ankstyvojo limfoidinio vystymosi metu (Elisa-kits.de, 1993).

CD8 yra transmembraninis glikoproteinas, kuris tarnauja kaip T-ląstelių receptoriaus (TCR) koreceptorius. Kartu su TCR, CD8 bendras receptorių vaidina T ląstelių signalizaciją ir padeda

citotoksinei T ląstelių ir antigenų sąveikai. Kaip ir TCR, CD8 jungiasi prie pagrindinės histokompatibilumo komplekso (MHC) molekulės, tačiau yra specifinis MHC I klasės baltymui (Elisa-kits.de, 1993).

CD9 antigenas koduoja transmembraninės ketvirtos superšeimos narį, dar žinomą kaip tetraspaninų šeimą. Tetraspaninai yra ląstelės paviršiaus glikoproteinai su keturiais transmembraniniais domenais, kurie sudaro multimerinius kompleksus su kitais ląstelės paviršiaus baltymais. Užkoduotas baltymas veikia daugelyje ląstelių procesų, įskaitant diferenciaciją, adheziją ir signalo perdavimą, o šio antigeno ekspresija vaidina lemiamą vaidmenį slopinant vėžio ląstelių judrumą ir metastazes (Elisa-kits.de, 1993).

CD16 yra diferenciacijos molekulių sanauja, randama natūralių ląstelių žudikų, neutrofilų, polimorfonuklearinių leukocitų, monocitų ir makrofagų paviršiuje. Jis gali būti naudojamas šių ląstelių populiacijoms izoliuoti naudojant antikūnus, nukreiptus prieš CD16, naudojant fluorescenciniu būdu aktyvintą ląstelių rūšiavimą arba magnetiniu būdu aktyvintą ląstelių rūšiavimą. CD16 ekspresuojamas ant NK ląstelių, aktyvuotų monocitų/makrofagų ir natūralių žudikų, T ląstelių (Elisa-kits.de, 1993).

CD31 taip pat žinoma kaip trombocitų endotelio ląstelių adhezijos molekulė (PECAM-1), yra baltymas, kurį žmogaus organizme koduoja *PECAM1* genas, randamas 17 chromosomoje. PECAM-1 randamas trombocitų, monocitų, neutrofilų ir kai kurių tipų T ląstelių paviršiuje ir sudaro didelę endotelio ląstelių tarpląstelinį jungčių dalį. Užkoduotas baltymas yra imunoglobulinų superšeimos narys ir greičiausiai dalyvauja leukocitų transmigracijoje, angiogenezeje ir integrino aktyvavime (Elisa-kits.de, 1993).

CD34 antigenas gali turėti įtakos kamieninių ląstelių prijungimui prie kaulų čiulpų tarpląstelinės matricos arba stromos ląstelių. CD34 yra įprastai naudojamas žmogaus kraujodaros kamieninėms/pirmtakinėms ląstelėms identifikuoti ir išskirti, kad būtų galima kliniškai naudoti kaulų čiulpų transplantacijai, tačiau jo funkcija šiose ląstelėse lieka sunkiai suprantama (Elisa-kits.de, 1993).

CD44 antigenas yra ląstelės paviršiaus glikoproteinas, dalyvaujantis ląstelių sąveikoje, ląstelių adhezijoje ir migracijoje. Tai yra hialurono rūgšties (HA) receptorių ir taip pat gali sąveikauti su kitais ligandais, tokiais kaip osteopontinas, kolagenai ir matricos metaloproteinazės (MMP). Šis baltymas dalyvauja įvairiose ląstelių funkcijose, įskaitant limfocitų aktyvavimą, recirkuliaciją ir nukreipimą, hematopoezę ir naviko metastazes. CD44 ekspresuojamas daugelio tipų limfohematopoetinės kilmės ląstelėse, įskaitant eritrocitus, T ir B limfocitus, natūralias žudikes ląsteles, makrofagus, Kupferio ląsteles, dendritines ląsteles ir granulocitus (Elisa-kits.de, 1993).

CD45 baltymų tirozino fosfatazė, receptorių tipas, C, taip pat žinomas kaip PTPRC, yra fermentas, kurį žmonėse koduoja *PTPRC* genas, kuris iš pradžių buvo vadinamas leukocitų bendroju antigenu (LCA). CD45 antigenas yra unikalus ir visur esantis membranos glikoproteinas, ekspresuojamas beveik visose kraujodaros ląstelėse, išskyrus brandžius eritrocitus (Elisa-kits.de, 1993).

CD56 antigenas koduoja ląstelių adhezijos baltymą, kuris yra imunoglobulinų superšeimos narys. Užkoduotas baltymas dalyvauja ląstelių sąveikoje, taip pat ląstelės ir matricos sąveikoje vystymosi ir diferenciacijos metu. Įrodyta, kad užkoduotas baltymas dalyvauja nervų sistemos vystyme ir ląstelėse, dalyvaujančiose T ląstelių ir dendritinių ląstelių, kurios atlieka svarbų vaidmenį imuninės sistemos stebėjime, plėtrai (Elisa-kits.de, 1993).

CD73 antigenas ekspresuojamas ne tik T limfocituose, bet ir B ląstelėse, makrofaguose ir granulocituose. Jis taip pat išreiškiamas tam tikruose smegenų regionuose. Baltymas inicijuoja arba padidina ankstyvą T-ląstelių aktyvacijos fazę ir gali veikti kaip svarbus netiesioginio neuronų pažeidimo tarpininkas sergant infekcinėmis ir imuninėmis centrinės nervų sistemos ligomis. CD73 ekspresuoja daugelis ląstelių: stromos ląstelės ir endotelio ląstelės, taip pat infiltruojančios imuninės ląstelės (Elisa-kits.de, 1993).

CD90 antigenas koduoja ląstelės paviršiaus glikoproteiną ir yra imunoglobulinų superšeimos baltymų narys. Užkoduotas baltymas dalyvauja ląstelių adhezijoje ir ląstelių komunikacijoje daugelyje ląstelių tipų, bet ypač imuninės ir nervų sistemos ląstelėse. Užkoduotas baltymas plačiai naudojamas kaip hematopoetinių kamieninių ląstelių žymeklis. CD90 ekspresuojamas kamieninėse ląstelėse, įskaitant mezenchimines kamienines ląsteles, hematopoetines kamienines ląsteles ir keratinocitines kamienines ląsteles, ir įvairiu lygiu ne limfoidiniuose audiniuose, tokiuose kaip fibroblastai, neuronai ir aktyvuotos endotelio ląstelės (Elisa-kits.de, 1993).

CD106 antigenas yra Ig superšeimos narys ir koduoja ląstelės paviršiaus glikoproteiną, ekspresuojamą citokinų aktyvuoto endotelio. Šis I tipo membraninis baltymas tarpininkauja leukocitų ir endotelio ląstelių adhezijai bei signalo perdavimui ir gali turėti įtakos arterosklerozės ir reumatoidinio artrito vystymuisi. CD106 antigeno yra ant aktyvuotų endotelio ląstelių, audinių makrofagų, dendritinių ląstelių ir kaulų čiulpų fibroblastų. Jis dalyvauja limfocitų, monocitų ir eozinofilų sukibime su aktyvuotu endotelium (Elisa-kits.de, 1993).

CD116 yra granulocitų-makrofagų kolonijas stimuliuojančio faktoriaus, kuris skatina baltųjų kraujo kūnelių gamybą, receptorių. CD116 pirmiausia yra ant neutrofilų, eozinofilų ir monocitų/makrofagų, taip pat yra ant CD34+ progenitorinių ląstelių (mieloblastų) ir eritroidinių bei megakariocitų linijų pirmtakų, tačiau tik jų vystymosi pradžioje (Elisa-kits.de, 1993).

CD146, taip pat žinomas kaip melanomos ląstelių adhezijos molekulė (MCAM) arba ląstelės paviršiaus glikoproteinas MUC18, yra ląstelių adhezijos molekulė, šiuo metu naudojama kaip endotelio ląstelių linijos žymeklis. CD146 buvo aptiktas daugumoje ląstelių tipų, įskaitant kraujagysles sudarančias ląsteles (endotelio, pericitų ir lygiųjų raumenų ląsteles), epitelį, fibroblastus, mezenchimines kamienines ląsteles ir limfocitus, išskyrus eritrocitus (Elisa-kits.de, 1993).

CD166 antigenas koduoja aktyvuotą leukocitų ląstelių adhezijos molekulę (ALCAM), taip pat žinomą kaip CD166, kuri yra imunoglobulino receptorių šeimos narys. Šis baltymas jungiasi prie T ląstelių diferenciacijos antigeno CD6 ir yra susijęs su ląstelių adhezijos ir migracijos procesais (Elisa-kits.de, 1993).

CD184 yra septynių transmembraninių domenų G baltymo susietas paviršiaus receptorių. CD184 iš pradžių buvo apibūdintas kaip žmogaus imunodeficito viruso-1 (ŽIV-1) patekimo koreceptorių, susietas su paviršiniu CD4-gp120 kompleksu prieš ŽIV-1 patenkant į tikslines ląsteles. Kraujyje CD184 yra labai ekspresuojamas neutrofiluose, monocituose, dendritinėse ląstelėse, NK ląstelėse, B ląstelėse ir T ląstelėse, taip pat trombocituose (Beckman.com, 2011).

HLA-ABC yra pagrindiniai histokompatibilumo komplekso (MHC) I klasės antigenai. MHC I klasės molekulės (MHC-I) yra ląstelės paviršiaus atpažinimo elementai, išreikšti beveik visose somatinėse ląstelėse. Šios molekulės ima peptidų, susidarančių ląstelėje, mėginius ir signalizuoja apie ląstelės fiziologinę būseną imuninės sistemos efektorinėms ląstelėms – tiek T limfocitams, tiek natūralioms žudikėms (NK) ląstelėms. Visos MHC I klasės molekulės turi konservuotus monomorfinius domenus, tačiau joms taip pat būdingas didelis alelinio polimorfizmo laipsnis. MHC molekulės vaidina pagrindinį vaidmenį imuniniame atsake. Jie dalyvauja T ląstelių brendime, T limfocitų aktyvavime pateikiant ksenogeninius peptidus arba alogeniniame atsake. HLA-ABC yra „klasikinės“ MHC I klasės molekulės ir yra išreikštos daugumos branduolinių žmogaus ląstelių tipų paviršiuje (Beckman.com, 2011).

HLA-DRA yra vienas iš MHC II klasės alfa grandinės paralogų. Pagrindinė II klasės histokompatibilumo komplekso (MHC) molekulių funkcija yra CD4(+) T-limfocitams pateikti apdorotus antigenus, kurie daugiausia gaunami iš egzogeninių šaltinių. Taigi MHC II klasės molekulės yra labai svarbios antigenui specifinio imuninio atsako inicijavimui. Ši MHC II klasės molekulė yra heterodimeras, susidedantis iš alfa ir beta grandinės, kurios abi yra pritvirtintos prie membranos. Ši molekulė ekspresuojama įvairių antigeną pristatančių ląstelių, tokių kaip B limfocitai, dendritinės ląstelės ir monocitai/makrofagai, paviršiuje ir atlieka pagrindinį vaidmenį imuninėje sistemoje ir atsake, pateikdama peptidus, gautus iš ekstraląstelinų baltymų, ypač iš patogenų, į T ląsteles (Genecards.org, 1997).

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Medžiagos

Bandomosios pelės: NOD.CB17-Prkdc scid/Rj pelės ( JANVIER LABS, Prancūzija), busulfanas (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Vokietija); ciklofosfamidą (Baxter Oncology GmbH, Vokietija); 1–3% izofluranas (Isoflurin, Vetpharma, Ispanija); PKVL; PBS tirpalas (paruošti naudotos tabletės (Life technologies, Jungtinė Karalystė)).

Ląstelių skyrimas iš kraujo: PBS tirpalas (paruošti naudotos tabletės (Life technologies, Jungtinė Karalystė)); Ficoll-Paque PREMIUM (Cytiva, Uppsala, Švedija).

Ląstelių auginimas: StemSpan™ SFEM II (StemSpan™ Serum-Free Expansion Medium II, STEMCELL Technologies, Vankuveris, Kanada); Mesenchymal Stem Cell Growth medium (ATCC, Manassas, Virdžinija); antibiotikai pencilinas ir streptomocinas (Gibco, Life Technologies, JAV)

Tėkmės citometrija: PBS tirpalas (paruošti naudotos tabletės (Life technologies, Jungtinė Karalystė)); galvijų serumo albuminas (BSA, Gibco, Life Technologies, JAV); monokloniniai antikūnai (Biolegend, JAV ir Exbio, Czechia)(1 lentelė).

RNR išskyrimas: Quick-DNA/RNA™ Miniprep rinkinys (Zymo Research, Irvine, CA, Jungtinės Valstijos).

kDNR sintezė: LunaScript® RT SuperMix rinkinys (New England Biolabs, Ipswich, MA, Jungtinės Valstijos).

Genų raiškos įvertinimas RL-kPGR metodu: Luna® Universal qPCR Master Mix rinkinys (New England Biolabs, Ipswich, MA, JAV); pradmenų sekos (2 lentelė).

Baltymų analizė naudojant Western blot: RIPA buferis (Biocompare, Pietų San Franciskas, JAV); NaF, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, PIC, PMSF (Sigma-Aldrich, Sent Luisas, Misūris, JAV); benzonazė (Sigma-Aldrich, Sent Luisas, Misūris, JAV); SDS lizės buferis (Sigma-Aldrich, Sent Luisas, Misūris, JAV); EveryBlot Blocking buferis (BIO-RAD, Japonija); antikūnai (Santa Cruz Biotechnology, JAV; Cell Signaling Technology, JAV; Abcam, UK; Advansta, JAV)(3 lentelė); tween (PBST gamybai) (BIO-RAD, Japonija); Clarity Western ECL substratą (BIO-RAD, Japonija).

Fluorescentinė mikroskopija: 4% paraformaldehidą, Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich, Sent Luisas, Misūris, JAV); galvijų serumo albuminas (BSA, Gibco, Life Technologies, JAV); anti-pelės IgG (H + L) (Advansta, JAV); Alexa Fluor® 594 antikūnai (1:400) (Invitrogen); DAPI tirpalas (Invitrogen).

Giemsas dažymas: naudotas Giemsa Stain Kit (Abcam, Kembridžas, Jungtinė Karalystė).

$\beta$ -galaktozidazės metodas:  $\beta$ -Galactosidase Assay Kit (Agilent Technologies, La Jolla, Kalifornija), PBS tirpalas (paruošti naudotos tabletės (Life technologies, Jungtinė Karalystė)).

**1 lentelė.** Monokloniniai antikūnai.

| mAk pagal CD klasifikaciją | Konjuguotas fluorochromas | mAk pagal CD klasifikaciją | Konjuguotas fluorochromas |
|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| BMSC (Biolegend, JAV)      | APC                       | CD5 (Biolegend, JAV)       | FITC                      |
| CD106 (Biolegend, JAV)     | APC                       | CD56 (Biolegend, JAV)      | APC                       |
| CD116 (Biolegend, JAV)     | PE                        | CD56(Biolegend, JAV)       | PE                        |
| CD146 (Exbio, Czechia)     | PE                        | CD7 (Biolegend, JAV)       | FITC                      |
| CD16 (Biolegend, JAV)      | APC                       | CD73 (Biolegend, JAV)      | FITC                      |
| CD166 (Biolegend, JAV)     | APC                       | CD8 (Exbio, Czechia)       | APC                       |
| CD184 (Exbio, Czechia)     | PE                        | CD9 (Biolegend, JAV)       | FITC                      |
| CD3 (Biolegend, JAV)       | PE                        | CD90 (Biolegend, JAV)      | APC                       |
| CD31 (Biolegend, JAV)      | 488                       | HLA ABC (Biolegend, JAV)   | 488                       |
| CD34 (Biolegend, JAV)      | FITC                      | HLADR (Biolegend, JAV)     | 488                       |
| CD4 (Exbio, Czechia)       | APC                       | CD45(Biolegend, JAV)       | FITC                      |
| CD44(Exbio, Czechia)       | FITC                      |                            |                           |

**2 lentelė.** Pradmenų sekos.

| Genas        | Pradmenų seka (5' → 3')                                | Produkto ilgis (bp) | Pradmenų prilydymo temperatūra (°C) |
|--------------|--------------------------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|
| <i>Pcna</i>  | F: TTGCACGTATATGCCGAGACC<br>R: GGTGAACAGGCTCATTCATCTCT | 183                 | 60 °C                               |
| <i>Mki67</i> | F: ATCATTGACCGCTCCTTTAGGT<br>R: GCTCGCCTTGATGGTTCCT    | 104                 | 60 °C                               |
| <i>Ccnd1</i> | F: GCGTACCCTGACACCAATCTC<br>R: CTCCTCTTCGCACTTCTGCTC   | 183                 | 60 °C                               |
| <i>Amh</i>   | F: GCAGTTGCTAGTCCTACATC<br>R: TCATCCGCGTGAAACAGCG      | 353                 | 60 °C                               |
| <i>Amhr</i>  | F: GTATCCGCTGCCTCTACAGC<br>R: AGCCTGGCTCATCACTGTCT     | 105                 | 60 °C                               |
| <i>Boll</i>  | F: TTGTCAATCCGGCCATTTCG<br>R: CCGTATCTTGGGCCACTTGT     | 178                 | 60 °C                               |
| <i>Fshr</i>  | F: AGTTGCATGGCATGTGTGAT<br>R: CATCACTGGGAACACCACG      | 303                 | 60 °C                               |
| <i>Mvh</i>   | F: GAGAACACATCTACAACCTGGTGG<br>R: CCTCGCTTGAAAACCTCT   | 164                 | 60 °C                               |
| <i>Gja</i>   | F: AACCTTGACTTCCGAGCAGA<br>R: CTTGGGGAACAAAGGAATCA     | 178                 | 60 °C                               |

### 3 lentelė. Specifinių baltymų atpažinimui naudoti antikūnai.

| Antikūnai                                   |                                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Pirminiai                                   | Antriniai                                                                                                                                                                     |
| PCNA (Santa Cruz Biotechnology, JAV)        | Goat- $\alpha$ -mouse IgG(H+L) HRP Conjugate<br>Secondary Antibody (Advansta, JAV)<br><br>Goat- $\alpha$ -rabbit IgG(H+L) HRP Conjugate<br>Secondary Antibody (Advansta, JAV) |
| BCL2 (Cell Signaling Technology, JAV)       |                                                                                                                                                                               |
| mTOR (Cell Signaling Technology, JAV)       |                                                                                                                                                                               |
| Fosfo-mTOR (Cell Signaling Technology, JAV) |                                                                                                                                                                               |
| FOXO3a (Cell Signaling Technology, JAV)     |                                                                                                                                                                               |
| Fosfo-PTEN (Cell Signaling Technology, JAV) |                                                                                                                                                                               |
| Tubulinas (Cell Signaling Technology, JAV)  |                                                                                                                                                                               |
| p27 (Santa Cruz Biotechnology, JAV)         |                                                                                                                                                                               |
| Hsp70 (Cell Signaling Technology, JAV)      |                                                                                                                                                                               |
| H2AX (Abcam, UK)                            |                                                                                                                                                                               |

## 2.2. Metodai

### 2.2.1. Ląstelių skyrimas iš periferinio kraujo

Periferinis kraujas skiedžiamas su 1x PBS santykiu 1:1 ir švelniai pilamas ant Ficoll-Paque PREMIUM gradiento tirpalo, centrifuguojama 400xg, 30 min., 4°C. Vienbranduolių ląstelių frakcija (vidurinė) švelniai perkeliama į kitą mėgintuvėlį. Ląstelės plaunamos kelis kartus 1x PBS ir toliau naudojamos eksperimentuose.

Darbai su žmogaus hematopoetinėmis ląstelėmis yra gautas bioetikos leidimą (VRBTEK, No 158200-16-824-356). Donorų biologinė medžiaga yra gauta juos informavus apie kraujo panaudojimą ir gavus jų sutikimą. Darbai buvo panaudotas 8 donorų kraujas.

### 2.2.2. Periferinio kraujo vienbranduolių limpančių ląstelių auginimas

Periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės auginamos StemSpan™ SFEM II terpėje (StemSpan™ Serum-Free Expansion Medium II, STEMCELL Technologies) ir Mesenchymal Stem Cell Growth terpėje (ATCC) su antibiotikais (100 U/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino) termostate esant +37°C ir 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.2.3. Fluorescentinė mikroskopija

Ląstelės buvo fiksuotos 4% paraformaldehidu 10 minučių, 15 minučių 0,1% Triton™ X-100 membranos pralaidumui padidinti ir 1 valandą kambario temperatūroje blokuojamos 1% BSA. Ląstelės buvo paženklintos pelės monokloniniu antikūnu (CD56, CD63, CD68) µg/ml 0,1 % BSA, inkubuojamos 4°C temperatūroje per naktį, o po to pažymėtos anti-pelės IgG (H + L) Alexa Fluor® 488 antikūnais (1:400) (Invitrogen) 45 minutes kambario temperatūroje. Branduoliai buvo nudažyti 300 nM DAPI tirpalu (Invitrogen). Nuotraukos buvo užfiksuotos 63 kartų didinimu.

#### 2.2.4. Giemsa dažymas

Ląstelės 3 min. laikomos metanolyje, tuomet 20 min. praskiestame Giemsa tirpale (25 mL Giemsa tirpalo sumaišyta su 275 mL buferinio tirpalo), po to 1 min. buferiniame tirpale, tada 2 min. plaunamos bėgančiu vandeniu ir 3 min. džiovinamos.

#### 2.2.5. $\beta$ -galaktozidazės metodas

Nuimama terpė, tuomet plaunama 2 kartus su PBS tirpalu. Tuomet užpilama 200  $\mu$ L fiksacijos buferio ir inkubuojama 6-7 min. (RT°). Po inkubacijos vėl plaunama 3 kartus su PBS tirpalu. Tada įdedama 200  $\mu$ L staining mix ir inkubuojama per naktį be CO<sub>2</sub>.

#### 2.2.6. Tėkmės citometrija

Vienam tyrimui buvo surinkta apie  $0,05 \times 10^6$  ląstelių. Ląstelės du kartus plaunamos 1X PBS su 1% galvijų serumo albuminu (BSA) ir centrifuguojama 500 g, 5 min. +4°C. Ląstelės resuspenduojamos 50  $\mu$ L PBS + 1% BSA tirpale, pridedamas atitinkamas kiekis antikūnų prieš specifinį paviršiaus žymenį (visi antikūnai pateikti 1 lentelėje) ir mėginiai laikomi 30 minučių tamsoje +4°C temperatūroje. Ląstelės du kartus plaunamos PBS + 1% BSA ir galiausiai analizuojamos naudojant Guava®easyCyte™ 8HT tėkmės citometrijos prietaisą (Millipore, Burlington, MA, Jungtinės Valstijos), gauti duomenys analizuojami InCyte 2.2.2 kompiuterine programa.

#### 2.2.7. RNR išskyrimas

RNR buvo išgauta iš pelių gimdos ir kiaušidžių audinių naudojant Quick-DNA/RNA™ Miniprep rinkinį (Zymo Research, Irvine, CA, Jungtinės Valstijos), o RNR grynumas ir koncentracija buvo išmatuoti naudojant spektrofotometrą NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Jungtinės Valstijos).

#### 2.2.8. kDNR sintezė

kDNR sintezė atlikta naudojant komercinį LunaScript® RT SuperMix rinkinį (New England Biolabs, Ipswich, MA, Jungtinės Valstijos) pagal gamintojo parengtą naudojimo instrukciją. Reakcijai buvo imta 1  $\mu$ g išskirtos RNR. Kiekvienam mėginiui paruošta neigiama kDNR kontrolė, į kurią buvo nedėta atvirkštinės transkriptazės fermento.

## 2.2.9. Genų raiškos įvertinimas RL-kPGR metodu

RL-kPGR atliktas naudojant Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, JAV) rinkinį pagal gamintojo parengtą naudojimo instrukciją. Pirmiausia paruoštas bendras reakcijos mišinys be matricos, kuris sudarytas iš 0,25 µM specifinių tiesioginių ir 0,25 µM atvirkštinių pradmenų (pradmenų sekos pateiktos 2 lentelėje), 5 µL „Luna Universal qPCR Master Mix“ ir vandens be nukleazų iki 10 µL. Mišinys išpilstytas į mėgintuvėlius po 8 µl ir pridėta ankstesniame etape (2.2.6. skyrius) susintetintos po 2 µL 10 kartų skiestos kDNR, po 2 µL 10 kartų skiestos neigiamos kDNR kontrolės arba po 2 µL vandens be nukleazų (tai neigiama kontrolė be matricinės DNR, skirta pradmenų ir kitų reagentų švarumo įvertinimui). Mėgintuvėliai sudėti į Rotor-Gene 6000 termociklerį (Corbett Life Science, QIAGEN, Hilden, Vokietija). Naudojant Rotor-Gene 6000 programą nustatytos atitinkamos reakcijos sąlygos (4 lentelė).

**4 lentelė.** RL-kPGR reakcijos sąlygos.

| Reakcijos etapai           | Temperatūra | Laikas  | Ciklų skaičius |
|----------------------------|-------------|---------|----------------|
| Pradinė denatūracija       | +95°C       | 60 sek. | 1              |
| DNR matricos denatūravimas | +95°C       | 15 sek. | 40-45          |
| Kopijos ilginimas          | +60°C       | 30 sek. |                |
| Išlydymas                  | +60-95°C*   | įvairus | 1              |

\* Lydymosi kreivių nustatymui; temperatūra kyla palaipsniui.

**Kiekybinis genų raiškos pokyčių įvertinimas taikant  $\Delta\Delta C_t$  metodą.** Genų raiškos duomenys, gauti po RT-kPGR, apskaičiuoti normalizuojant gautus rezultatus ( $C_t$  vertes) pagal kontrolinių genų raišką:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{tiriamo geno}) - \Delta C_t (\text{kontrolinio geno})$$

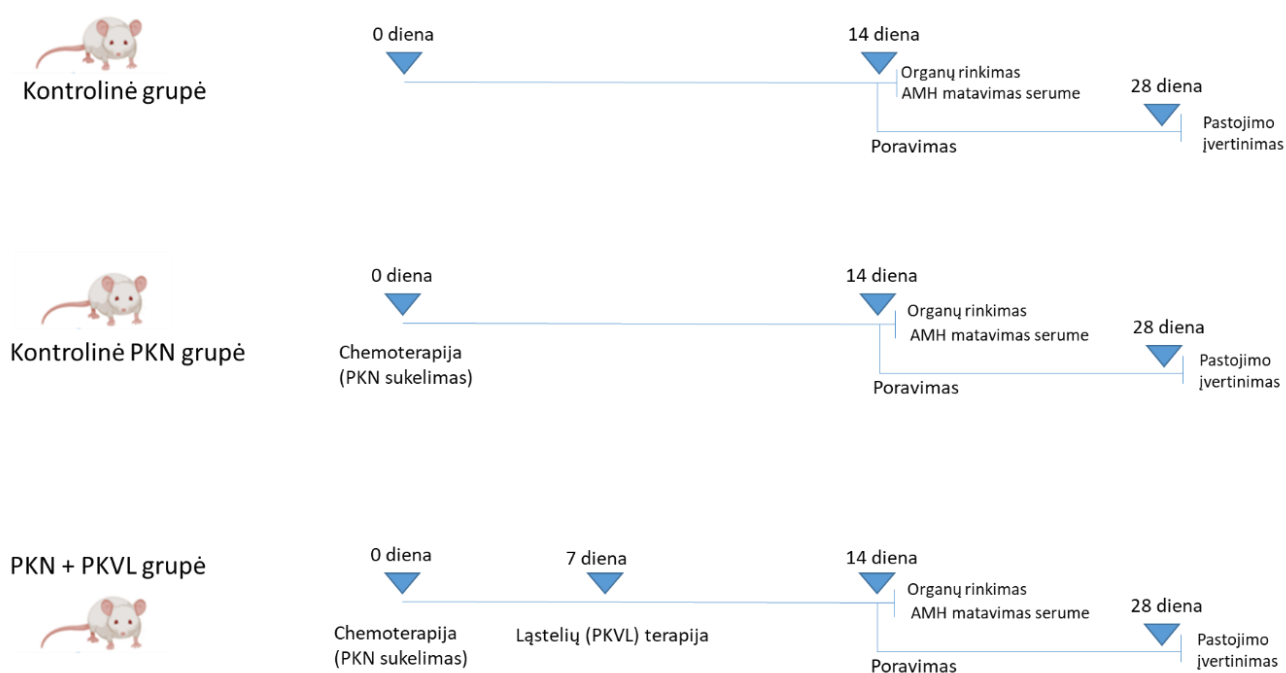
$$RQ (\text{santykinė geno raiška}) = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Skaičiavimai atlikti naudojant kompiuterinę programą Microsoft Office Excel 2023.

## 2.2.10. Bandomosios pelės

NOD.CB17-Prkdc scid/Rj pelės buvo įsigytos iš JANVIER LABS, Prancūzija. Visi gyvūnai turėjo laisvą prieigą prie maisto (Scobis Uno, Mucedola) ir vandens (sterilaus). Litinio ciklo etapų stebėjimui buvo daromi makšties tepinėliai. Tyrimo su gyvūnais eksperimento planas apibendrintas 3 pav. Gyvūnai buvo suskirstyti į dvi grupes. Viena grupė buvo kontrolinė: viena kontrolinių pelių dalis buvo veisiama su pelių patiniais 2–3 savaites, ir buvo stebimas gebėjimas pastoti. Kitai

kontrolinių pelių daliai eksperimento pabaigoje buvo renkamas kraujas antimiulerinio hormono (AMH) matavimui, organai tolimesniems molekuliniams tyrimams (genų ir baltymų raiška). Kitai grupei buvo sukeltas priešlaikinis kiaušidžių nepakankamumas (PKN) naudojant 30 mg/kg busulfano (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Vokietija) ir 120 mg/kg ciklofosfamido (Baxter Oncology GmbH, Vokietija) injekcijas į pilvaplėvę. Tokios pelės laikomos sterilizuotomis kadangi negali pastoti. Ši grupė buvo pavadinta kontroline PKN grupe (suleista tik fiziologinio tirpalo), iš kurių viena dalis pelių buvo veisiama su pelių patiniais 2–3 savaites ir stebėtas nėštumo dažnis, o kita dalis buvo panaudota tolimesniems molekuliniams tyrimams. Trečia grupė-sukėlus PKN buvo atlikta PKVL injekcija į kiaušidę, kaip nurodyta toliau. Pelės buvo anestezuotos įkvėpus 1–3% izoflurano (Isoflurin, Vetpharma, Ispanija), buvo padarytas nedidelis odos pjūvis, kad per pilvo ertmę būtų galima patekti į kiaušidę. Tada maždaug 20 µL ląstelių suspensijos, turinčios  $0,5 \times 10^6$  PKVL PBS tirpale, buvo švirkščiami į kairę kiaušidę. Praėjus savaitei po ląstelių injekcijos, gyvūnai buvo suskirstyti į dvi grupes: vienos pelės buvo poruotos su pelių patiniais 2–3 savaites, o kita dalis pelių buvo panaudota molekuliniams tyrimams.



**3 pav.** Bandomųjų pelių tyrimo schema. Pirmą pelių grupę - kontrolinę (nieko nedaryta); antrą grupę kontrolinę PKN (priešlaikinis kiaušidžių nepakankamumas) grupę - sukeltas PKN naudojant chemoterapinius vaistus, trečią grupę - PKN+PKVL grupę, kuriai po PKN sukėlimo buvo atlikta PKVL ląstelių terapija į kiaušidę.

Tyrimai su bandomosiomis pelėmis atlikti Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos instituto Biologinių modelių skyriuje (gavus Lietuvos Respublikos Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimus kodas Nr. G2-173, patvirtinimo data 2019-05-20), suteikiančius teisę vykdyti eksperimentus su gyvūnais. Visi eksperimentai ir reikalingos procedūros atliktos

laikantis bandomųjų gyvūnų gerovės rekomendacijų, nurodytų Direktyvoje 2010/63/ES, ir darbo su bandomaisiais gyvūnais reikalavimų, reglamentuotų VMVT direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866.

#### 2.2.11. Baltymų analizė naudojant *Western blot* metodą

Pelės audiniai sutrinami grustuvėje šaldant juos skystu azotu. Sutrintas audinio gabaliukas lizuojamas RIPA buferiu (150 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8, 10 mM Tris pH 7,4, 0,1 % SDS, 1% DOC (deoxycholate), 1 % NP-40) su proteazių slopikliais (1 ml RIPA buferio - 10  $\mu$ l slopiklių: 0,5 M NaF, 0,1 M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100X PIC, 0,1 M PMSF). Audinių lizatas perkeliamas į mėgintuvėlį ir kelis kartus prašvirkščiamas pro insulininį švirkštą. Lizatas inkubuojamas 2h +4 °C ant vartyklės. Po inkubacijos į audinių lizatus pridedama po 1  $\mu$ l benzonazės, vėl kelis kartus prašvirkščiamas pro insulininį švirkštą, inkubuota lede 10 min. Audinių lizatai centrifuguojami 16 000 x g 20 min. +4 °C. Supernatantas surenkamas, baltymų koncentracija matuojama naudodant Pierce™ Detergent Compatible Bradford Assay Kit (Thermo Fisher Scientific), matavimai atlikti pagal gamintojo rekomendacijas. Paruošti baltymų mėginiai sumaišomi su 2x SDS lizės buferiu (125 mM Tris, pH 6,8, 4% SDS, 200 mM DTT, 20% glicerolio ir bromfenolio mėlynos pėdsakų) santykiu 1:1. Baltymų mėginiai kaitinami 5 min. 95 °C, centrifuguojami 16 000 x g 5 min. +4°C.

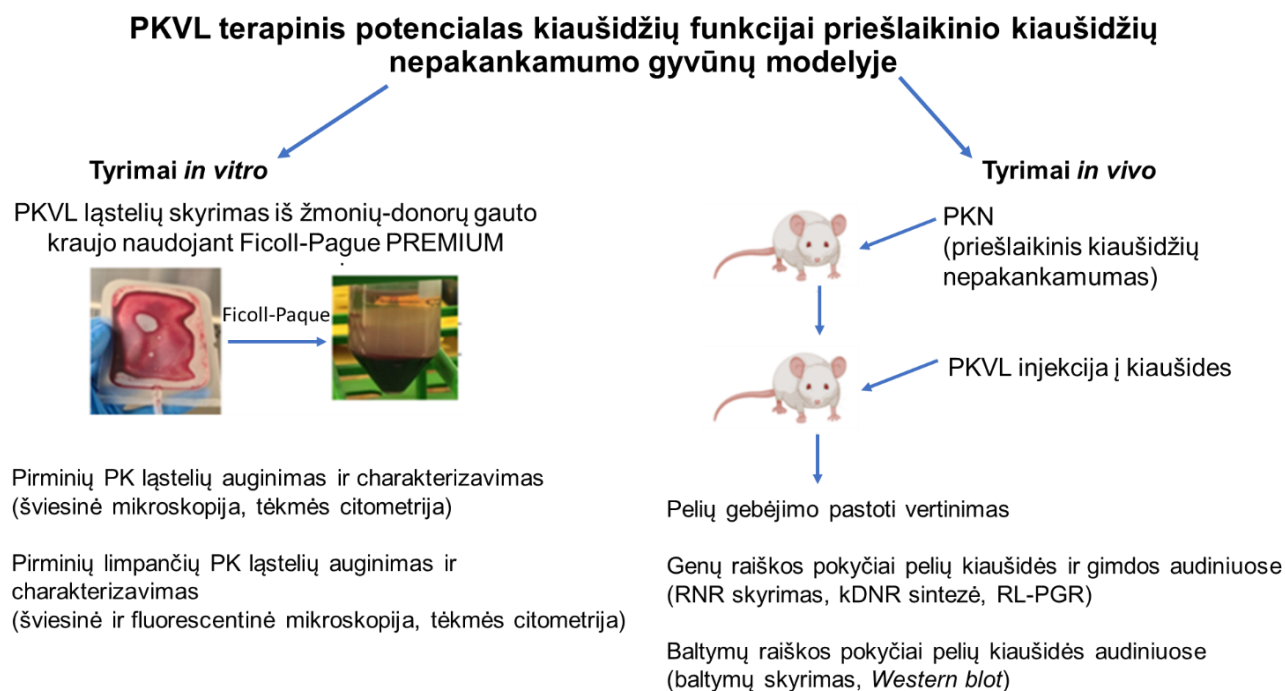
Baltymų mėginiai skirstomi 7, 5–15% gradiento poliakrilamido SDS / PAGE gelyje. Vėliau baltymai buvo perkelti ant PVDF membranų ir buvo atliktas Western blot. Pirmiausia membrana buvo inkubuojama su EveryBlot Blocking Buffer (BIO-RAD, Japan), o po to su pirminiais antikūnais per naktį 4 °C temperatūroje. Specifinių baltymų atpažinimui naudoti antikūnai pateikti 3 lentelėje. Po inkubacijos membrana tris kartus plaunama 10 minučių su PBS-Tween 0,1% tirpalu ir 1 valandą kambario temperatūroje inkubuojama su antriniais antikūnais pateiktais 3 lentelėje. Tuomet membrana tris kartus plaunama 10 minučių su PBS-Tween 0,1% tirpalu ir vieną kartą su PBS tirpalu. Po plovimo chemiliuminescencinis signalas aptiktas naudojant Clarity Western ECL substratą (BIO-RAD, Japan) ir Chemi-Doc XRS + sistemą su Image Lab programine įranga (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Jungtinės Valstijos). Kiti skaičiavimai buvo atlikti naudojant „ImageJ“ programinę įrangą (NIH, JAV).

#### 2.2.12. Statistinė analizė

Naudojantis Microsoft Office Excel 2023 programa apskaičiuoti gautų rezultatų vidurkiai ir standartiniai nuokrypiai ( $\pm$ SD). Duomenų kitimo patikimumas įvertintas lyginant dviejų, nesuporuotų imčių Stjudento t-testą. Tyrimo metu pasirinkta, kad duomenys statistškai patikimais laikomi, kai jų  $P \leq 0,05$  (\*).

### 3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šiuo metu daugelis tyrimų, susijusių su mezenchiminių kamieninių ląstelių terapija uždegiminių ir audinių pažeidimų atvejais, buvo orientuota į iš kaulų čiulpų arba riebalinio audinio išskirtas MKL, daugiausia dėl to, kad šie du MKL šaltiniai gerai žinomi ir pasižymi imunomoduliuojančiomis savybėmis. Savo laboratorijoje parodėme placentos kamieninių ląstelių efektyvumą atstatant nevaisingumą pelėse po transplantacijos (Navakauskienė R ir kt., 2023). Remiantis turimais duomenimis manome, kad yra tikslinga tęsti tyrimus ištiriant teigiamo ląstelių, išskirtų iš įvairių šaltinių, poveikio kiaušidžių ir gimdos audiniui molekulinis mechanizmus ir nustatyti su folikulogenezės procesu susijusių genų/baltymų pokyčius. Šiame darbe pasirinkome periferinio kraujo ląsteles, nes jos pastaraisiais metais yra sparčiai naudojamos kaip inovatyvus (imunoterapijos) gydymo metodas.



#### 4 pav. *In vitro* ir *in vivo* eksperimentų eiga.

Šiame darbe buvo tirtas iš periferinio kraujo išskirtų vienbrnduolių ląstelių poveikis pelių priešlaikinio kiaušidžių nepakankamumo (angl. premature ovarian insufficiency, toliau – PKN) modeliui. Tyrimo metu buvo charakterizuotos iš periferinio kraujo išskirtos ląstelės. Vėliau ląstelės buvo injekuotos į pelių, kurioms buvo sukeltas PKN, kiaušides. Buvo nustatyti su folikulogenezės procesu susijusių genų bei baltymų raiškos pokyčiai *in vivo* po ląstelių transplantacijos. Taip pat nustatytas terapinis ląstelių poveikis atstatyti nevaisingumą (4 pav.).

Šis tyrimas svarbus ląstelių terapijos PKN atvejų išsiaiškinimui ir prisidėjimui prie tolimesnių PKN gydymo strategijų kūrimo.

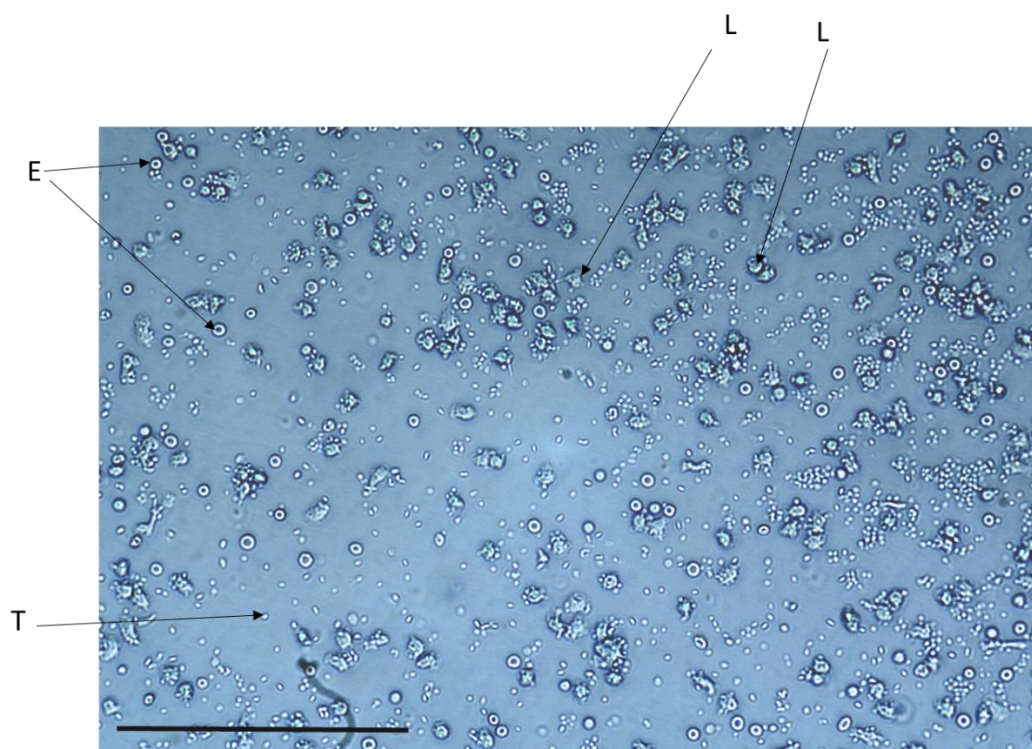
### 3.1. Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių išskyrimas ir charakterizavimas

Periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės buvo išskirtos iš donorų periferinio kraujo panaudojant Ficoll-Paque PREMIUM gradiento tirpalą. Toliau tyrimo eiga buvo suskirstyta keliais etapais (4 pav.): pirmo etapo uždavinys - išskirti ir charakterizuoti žmogaus pirmines periferinio kraujo ląsteles, antro etapo uždavinys - auginti limpančias PKVL ir jas charakterizuoti. Išanalizavus rezultatus bus pasirinktas vienas tinkamiausias ląstelių tipas kuris bus naudojamas tolimesniems *in vivo* tyrimams.

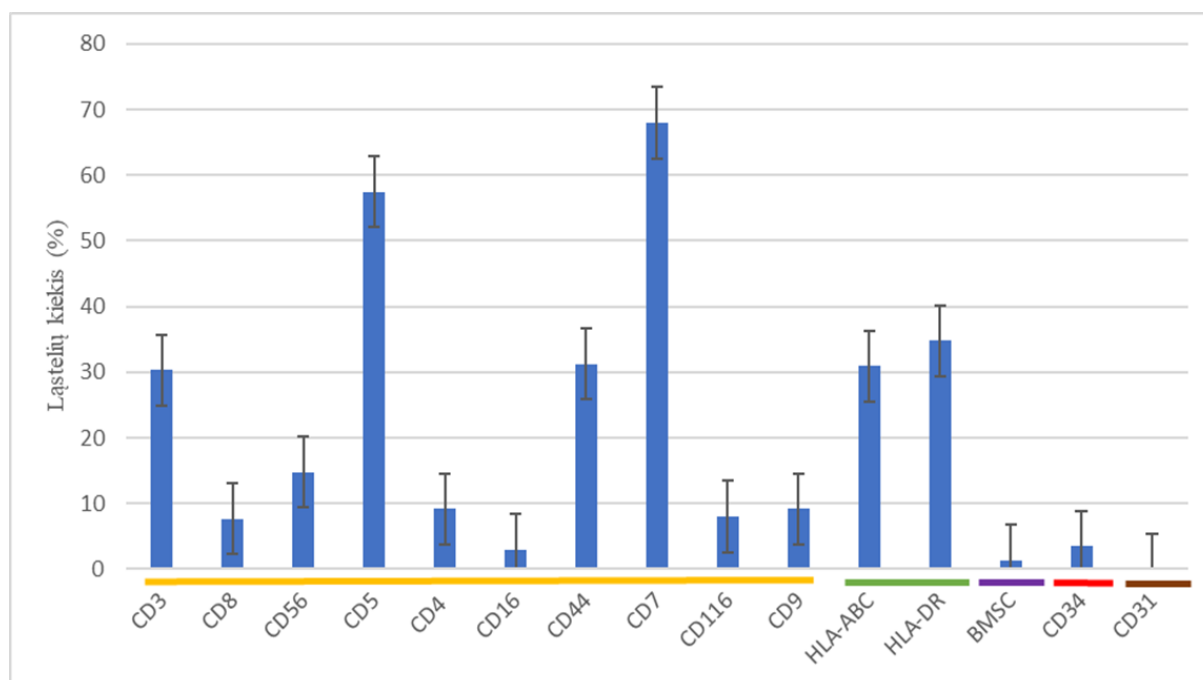
#### 3.1.1. Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių skyrimas ir charakterizavimas

Periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės buvo mikroskopuojamos šviesinių mikroskopu. PKVL pasižymi būdinga morfologija ir mėginyje galime pamatyti eritrocitus, leukocitus bei trombocitus (5 pav.). Vėliau ląstelės buvo charakterizuotos pagal paviršiaus žymenis. Tėkmės citometrijos pagalba buvo analizuoti paviršiaus žymenys: limfocitai (CD3, CD8, CD5, CD4, CD16, CD44, CD7, CD116, CD9); imuninio atsako ląstelės (HLA-ABC, HLA-DR); mezenchiminės kamieninės ląstelės (MKL); hematopoetinės kamieninės ląstelės (CD34); endotelinės/hematopoetinės ląstelės (CD31) (6 pav.).

Nustatėme, kad 68% PKVL turi savo paviršiuje CD7 antigeną, kuris yra randamas ant timocitų ir subrendusių T ląstelių bei vaidina esminį vaidmenį T-ląstelių sąveikoje, T-ląstelių/B-ląstelių sąveikoje ankstyvojo limfoidinio vystymosi metu. Taip pat 57,5% PKVL turi CD5, kuris, randamas timocitų, T limfocitų ir B limfocitų pogrupio paviršiuje, reguliuoja T-ląstelių proliferaciją ir T-ląstelę/B-ląstelių sąveiką. Pirminės PKVL pasižymėjo CD3 30,34%, HLA-ABC 30,95%, HLA-DR 34,79% ir CD44 31,24%. taip pat nustatėme, kad mūsų skirtos ląstelės pasižymi CD56 14,78%, CD8 7,68%, CD4 9,15%, CD116 8,01% ir CD9 9,21% raiška. Nustatėme, kad BMSC, CD8a, CD16, CD34, CD31 žymenų raiška buvo silpna ir siekė tik 5%. Mūsų rezultatai rodo, kad mūsų skirtoje PKVL populiacijoje yra didžiausia dalis T limfocitų, timocitų turinčių CD antigeną ir B limfocitų. Žymenų kiekis gali priklausyti nuo kraujo rūšies, bet taip pat ir nuo donoro. Mes naudojome kraują iš 8 donorų ir juose skiriasi tų pačių paviršinių žymenų raiška, tai galima matyti iš priedų 1 lentelės, kur pateikti nesuvidurkinti tėkmės citometrijos rezultatai.



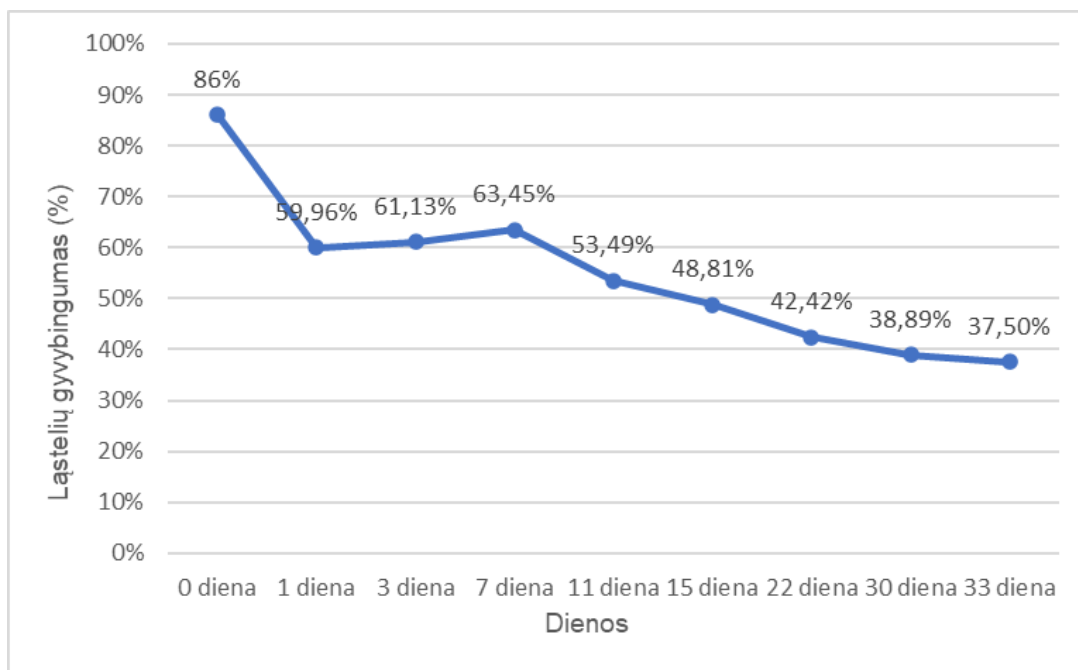
**5 pav.** Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių mikroskopinis vaizdas naudojant šviesinį mikroskopą: matome eritrocitus (E), leukocitus (L) ir trombocitus (T). Padidinimas 20x, mastelis - 1000  $\mu\text{m}$ .



**6 pav.** Periferinio kraujo pirminių ląstelių paviršiaus žymenų raiška. Paviršiaus žymenys suskirstyti pagal ląstelių tipą: limfocitai (CD3, CD8, CD56, CD5, CD4, CD16, CD44, CD7, CD116, CD9); imuninio atsako ląstelės (HLA-ABC, HLA-DR); mezenchiminės kamieninės ląstelės (BMSC); hematopoetinės kamieninės ląstelės (CD34); endotelinės/hematopoetinės ląstelės (CD31). Rezultatai pateikiami kaip vidurkis  $\pm$  S.D.

### 3.1.2. Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių augimas ir gyvybingumas *in vitro*

Periferinio kraujo vienbranduolės ląsteles auginome StemSpan™ SFEM II terpėje auginimo flakonuose termostate esant +37°C ir 5% CO<sub>2</sub>, fiksuodami gyvybingas ir negyvybingas ląsteles (7 pav.).



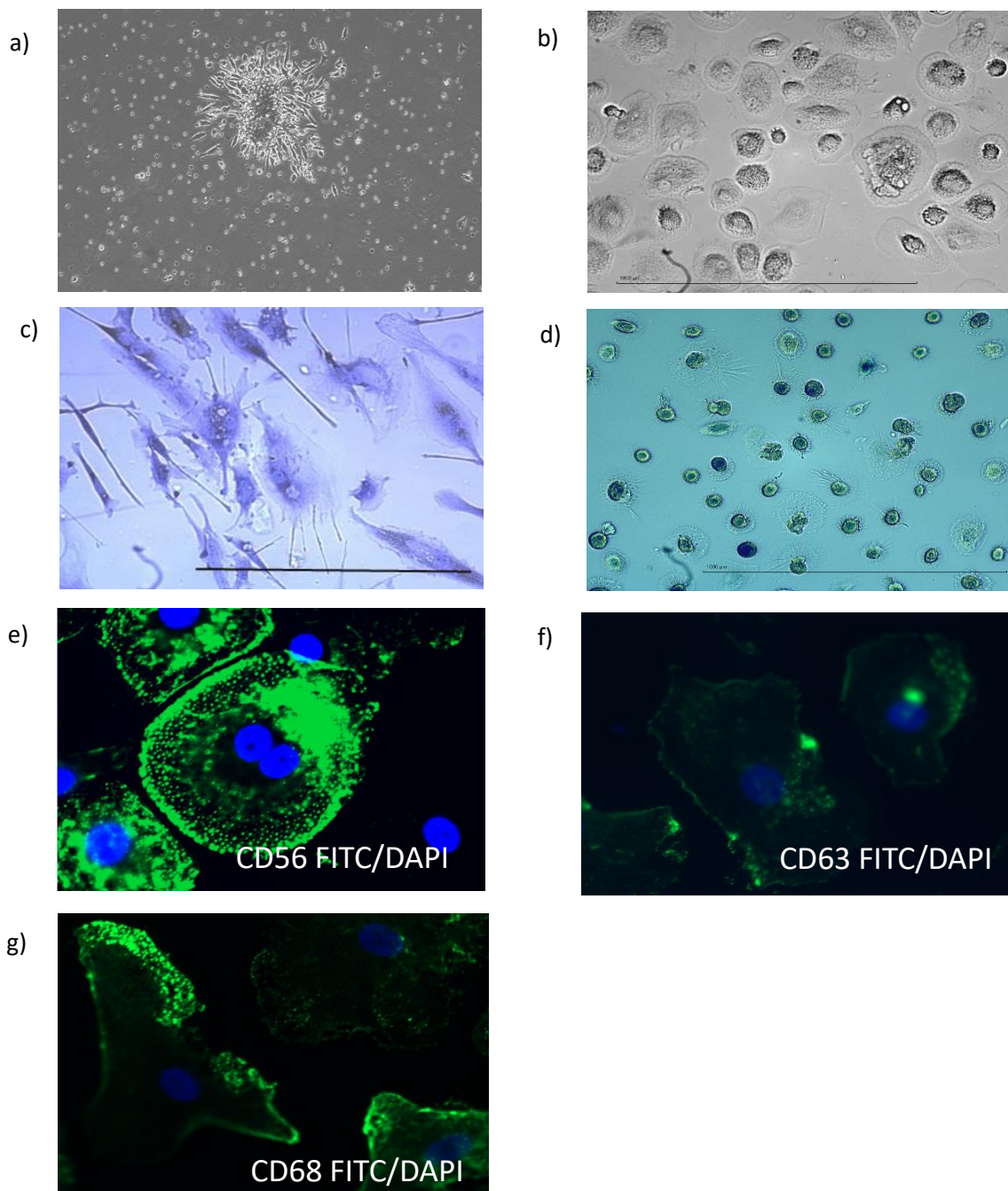
**7 pav.** Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių gyvybingumo grafikas. Gyvų ląstelių kiekis nustatytas ląsteles nudažius 0,2 % tripano mėliu ir nusidažiusių ląstelių skaičių įvertinus hematocitometru.

Nustatėme kad ląstelių gyvybingumas palaipsniui mažėjo: išskyrimo dieną gyvybingumas buvo 86-92 %, o po mėnesio auginimo gyvybingumas sumažėjo iki 37,50 %. Kadangi auginimo metu nebuvo į mitybinę terpę pridėta jokių papildomų medžiagų (pvz., interleukinų, augimo faktorių), manome kad bendrą ląstelių skaičiaus mažėjimą gali lemti ir tai, kad įvairios periferinio kraujo ląstelės turi skirtingą gyvenimo trukmę, pvz. granulocitai (30 min.-7 d.), monocitai (5-7 d.) ir trombocitai (3-5 d.).

### 3.1.3 Periferinio kraujo vienbranduolių limpančių ląstelių augimas ir charakterizavimas

Pastebėjome, kad kai kurios PKVL limpa prie plastiko ir sudaro kolonijas (8 pav. a), todėl nusprendėme šias limpančias (adhezinės) ląsteles auginti, stebėti jų augimo greitį ir vėliau charakterizuoti tėkmės citometrijos metodo pagalba. Prilipusias prie paviršiaus ląsteles 3 savaites auginome Mesenchymal Stem Cell Growth terpėje flakonuose termostate esant +37°C, 5% CO<sub>2</sub> ir

stebėjome jų augimą bei morfologiją (8 pav. b). Tik po 3 savaičių buvo pasiektas 80 % konfluencijos lygis.

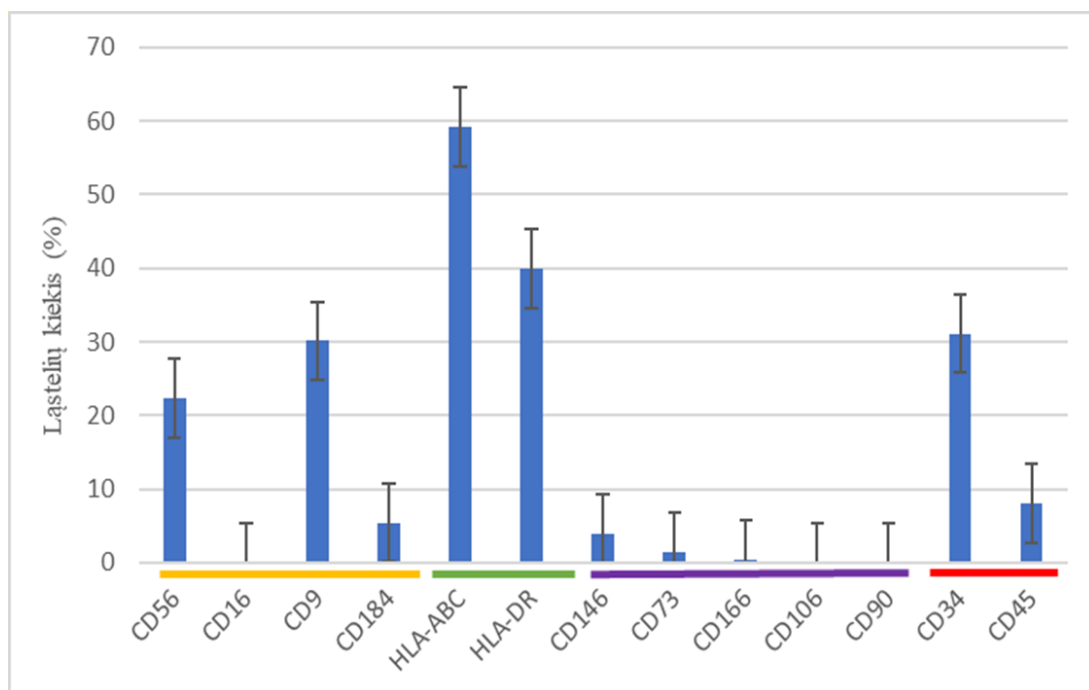


**8 pav.** Periferinio kraujo vienbranduolių limpančių ląstelių morfologija. a-c ląstelių nuotraukos darytos naudojant šviesinį mikroskopą (20x padidinimas): a) ląstelės 1-ame pasaže (3 dienos po auginimo pradžios); b) ląstelės 1-ame pasaže (3 savaitės po auginimo pradžios); c) – 1-o pasažo ląstelės dažytos Giemsa dažais; d- 2-o pasažo ląstelės dažytos  $\beta$ -galaktozidaze; e-g - ląstelių fluorescentinė mikroskopija (63x padidinimas) naudojant įvairius pirminius antikūnus (e - CD56 žalia spalva; f - CD63 žalia spalva, g - CD68 žalia spalva; branduoliai dažyti DAPI-mėlyna spalva).

Morfologiškai ląstelės buvo heterogeniškos, daug ląstelių turi makrofagams būdingą formą, tačiau buvo ir į fibroblastus panašių ląstelių (8 pav. a-c). Po 3 savaičių auginimo ir pasiekus 80%

konfluencijos, ląsteles tripsinizavome ir išsėjome į auginimo flakonus. Pastebėjome kad persėtos ląstelės auga labai vangiai, jų morfologija pasikeitė: ląstelės smulkios ir apvalios, daug ląstelių atkibo nuo paviršiaus. Nudažius ląsteles  $\beta$ -galaktozidazės nustatymo metodu, pastebėjome kad šios ląstelės turi senėjimo požymius ir dažosi mėlynai (8 pav. d). Pasitelkiant fluorescentinę mikroskopiją buvo vizualizuoti kelių paviršinių molekulių buvimo vietos (8 pav. e-g). CD56 žymuo, kuris būdingas natūralioms žudikėms (ang. Natural killer) ir taip pat nervinės kilmės ląstelėms, yra lokalizuotas ne tik ląstelės paviršiuje, bet ir ląstelės citoplazmoje. CD63 yra lizosomų membranos glikoproteinas, kuris po trombocitų aktyvacijos perkeltas į plazmos membraną, jo taip pat yra monocituose, makrofaguose ir silpnai ekspresuojamas granulocituose, B ir T ląstelėse. CD68 yra membraninis glikoproteinas, daugiausia ekspresuojamas monocitų ir makrofagų tarpląstelinėse lizomomose ir mažiau ekspresuojamas dendritinėse ląstelėse bei granulocituose.

Tėkmės citometrijos metodo pagalba charakterizavome limpančias ląsteles pagal paviršiaus žymenis: limfocitai (CD56, CD16, CD9, CD184); imuninis atsako ląstelės (HLA-ABC, HLA-DR); mezenchiminės kamieninės ląstelės (CD146, CD73, CD166, CD106, CD90); hematopoetinės kamieninės ląstelės (CD34, CD45) (9 pav.). Nustatėme, kad 59,27 % limpančių ląstelių turi savo paviršiuje HLA-ABC antigeną ir 40,01 % ląstelių turi HLA-DR antigeną. HLA yra būtini imunoterapijai, jie padeda imuninei sistemai atskirti savo organizmo baltymus nuo baltymų, kuriuos gamina svetimi įsibrovėliai, pavyzdžiui, virusai ir bakterijos. Kitų paviršiaus žymenų raiška siekė iki 30% (CD34, CD9, CD56, CD4) ir iki 10 % (CD45, CD184, CD146, CD73).



**9 pav.** Periferinio kraujo limpančių ląstelių paviršiaus žymenų raiška. Paviršiaus žymenys suskirstyti pagal ląstelių tipą: limfocitai (CD56, CD16, CD9, CD184); imuninis atsako ląstelės

(HLA-ABC, HLA-DR); mezenchiminės kamieninės ląstelės (CD146, CD73, CD166, CD106, CD90); hematopoetinės kamieninės ląstelės (CD34, CD45). Rezultatai pateikiami kaip vidurkis  $\pm$  S.D.

Apibendrinant galima teigti, jog ką tik išskirtos periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės pasižymėjo būdinga morfologija ir turėjo limfocitams būdingus paviršiaus žymenis pvz. CD5, CD7. Auginimas *in vitro* mažina ląstelių gyvybingumą ir tam, kad ląstelės dauginėtųsi reikalingi papildomi faktoriai kaip interleukinai ir kt.

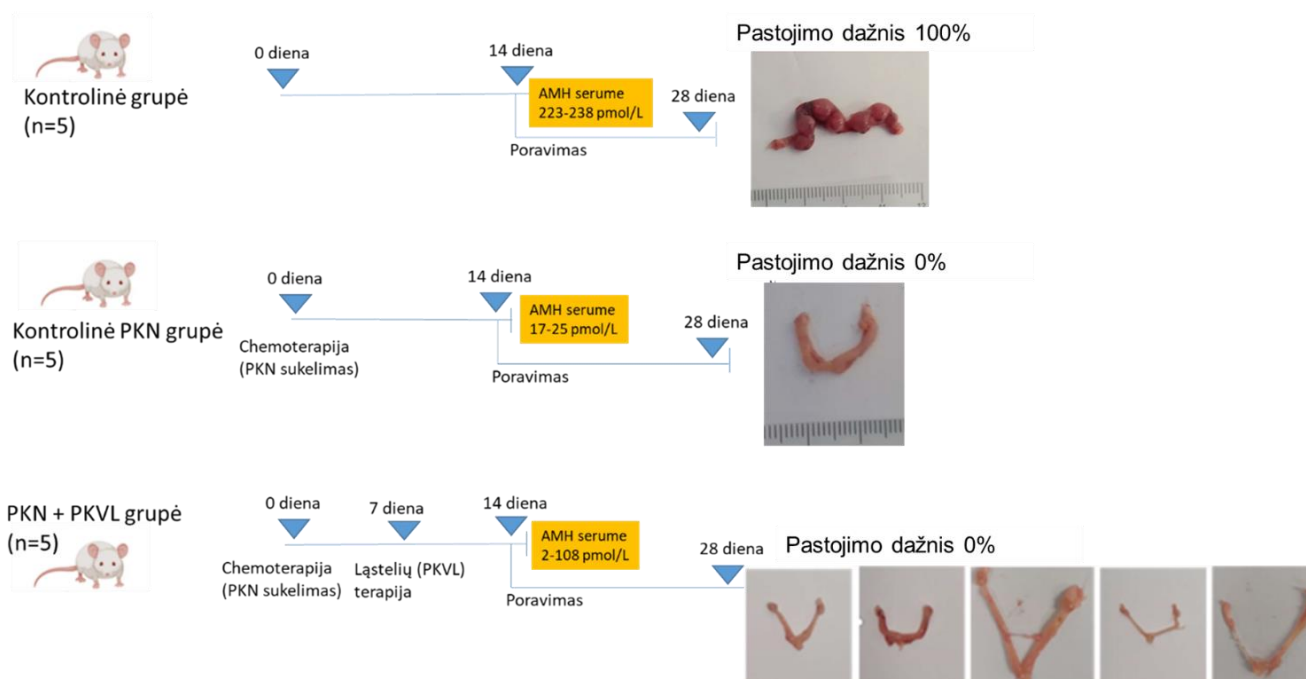
Kadangi augimo potencialas yra ribotas, tolimesniame darbe naudojome ką tik išskirtas ir ne augintas periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles.

### 3.2. Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių terapinio potencialo priešlaikinio kiaušidžių nepakankamumo atstatymui po chemoterapijos tyrimas

Atsižvelgiant į tai, kad dažna moterų nevaisingumo priežastimi yra priešlaikinis kiaušidžių nepakankamumas (angl. premature ovarian insufficiency, toliau – PKN), kuris charakterizuojamas kaip kiaušidžių funkcijos ir folikulų atsargos kiaušidėse praradimas ir pasireiškia ~4% moterų iki 40 metų visame pasaulyje bei įvairių pirminių ar kamieninių ląstelių panaudojimo galimybes regeneracinėje medicinoje, šiame darbe buvo tirta ar pirminės periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės gali būti naudojamos priešlaikinio kiaušidžių nepakankamumo atstatymui.

Vykdydami tyrimus esame sukėlę imunodeficitinėms NOD.CB17-Prkdc scid/Rj pelėms nevaisingumą panaudojant chemoterapijai skirtus vaistus ir parodėme, kad kiaušidžių funkcija yra sutrikdyta (sumažėjęs antiimiulinio hormono (AMH) kiekis serume, pelių reprodukcija nefunkcionuoja). Nustatėme, kad kontrolinių pelių grupėje AMH lygis buvo aukščiausias (223-2380 pmol/L), pelės pastodavo jau pirmos savaitės eigoje nuo poravimo pradžios ir jų vada buvo 6-12 peliukai. Sukėlus pelėms priešlaikinį kiaušidžių nepakankamumą naudojant chemoterapinius vaistus, buvo nustatyta kad AMH pelių serume ženkliai sumažėjo iki 17-25 pmol/L ( $p = 0.03$ ) ir šios pelės negalėjo pastoti 2 mėnesius (vėliau eksperimento netęsėme). Pastebėjome, jog periferinio kraujo limpančios ląstelės auga silpnai, ko priežastys gali būti įvairios. Pagrindinis terapijos patrauklumas turi būti jos prieinamumas. Kadangi limpančių ląstelių proliferacijos potencialas nėra didelis, todėl šios ląstelės nebuvo tinkamos *in vivo* tyrimams ir nebuvo naudojamos. Pelėms po chemoterapijos į kiaušides buvo injekuotos pirminės periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės (PKVL). AMH lygis labai skyrėsi tarp pelių ir svyravo tarp 2 ir 108 pmol/L. Tačiau poravimosi testo metu nustatėme, kad šios pelės negalėjo pastoti.

Tolimesniame tyrimo etape buvo tirtas pirminių periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių poveikis kiaušidžių/gimdos audiniui ir nustatyti su folikulogenezės bei apoptozės procesais susijusių baltymų ir genų pokyčiai (10 pav.).



**10 pav.** Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių terapinio potencialo priešlaikinių kiaušidžių nepakankamumo atstatymui po chemoterapijos tyrimas.

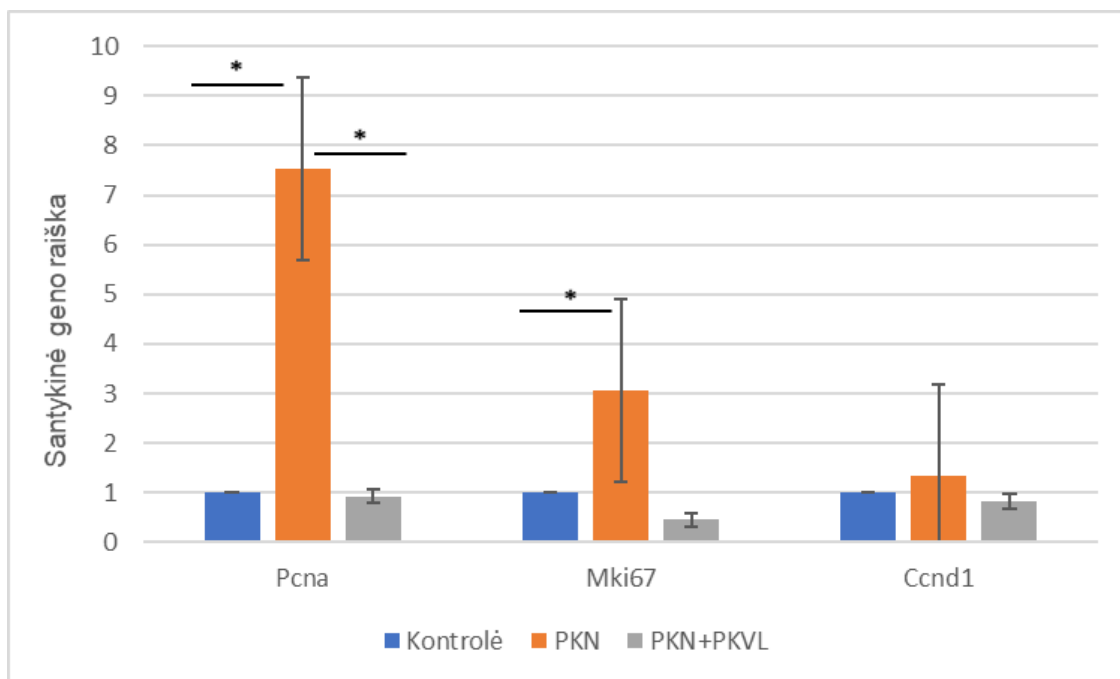
### 3.2.1. Genų *Pcna*, *Mki67*, *Ccnd1*, *Amh*, *Amhr*, *Boll*, *Fshr*, *Mvh*, *Gja* raiškos pokyčiai pelės kiaušidžių bei gimdos audinyje

Chemoterapijos procesas turi didelį toksiškumą reprodukinei sistemai, nes jis turi žalingą poveikį folikulogenezei, dėl kurios atsiranda negrįžtamas priešlaikinis kiaušidžių nepakankamumas (PKN). Tyrimo metu RNR buvo išskirta iš kiaušidžių ir gimdos audinių (kontrolinių, PKN, PKN+PKVL grupės). Santykiniai genų raiškos pokyčiai buvo įvertinti RL-kPGR metodu. Gauti rezultatai apibendrinti ir pateikti 11 ir 12 paveiksluose.

Kadangi yra žinoma, kad ir žmogaus ir kituose organizmuose PCNA, Ki67, CCND1 baltymai yra susiję su ląstelių proliferacija, nustatėme palyginti genų *Pcna*, *Mki67*, *Ccnd1* raišką pelės gimdos audinyje.

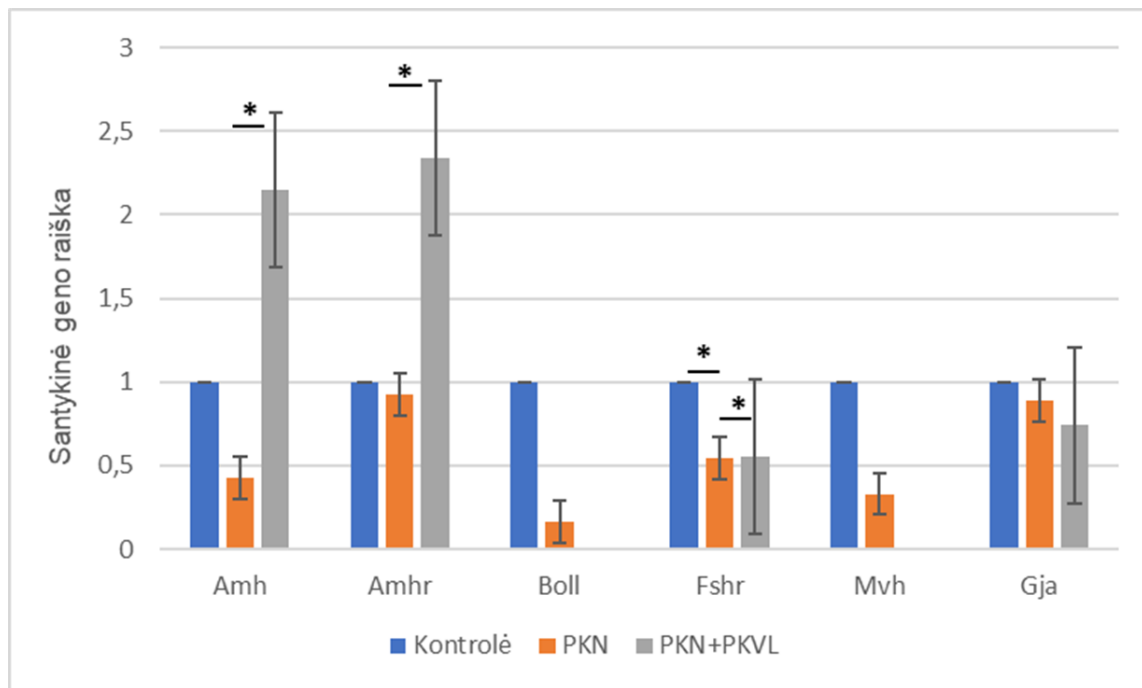
11 paveiksle pateiktos gimdos audinio santykinės *Pcna*, *Mki67*, *Ccnd1* genų raiškos vertės. Iš rezultatų galima matyti, jog gimdos mėginyje po chemoterapijos (PKN grupė) visų trijų *Pcna*, *Mki67*, *Ccnd1* genų raiška padidėjo lyginant su kontrole (neveikta). O gimdos audinyje PKN+PKVL grupėje PCNA geno raiška beveik nepakito lyginant su kontrole, bet sumažėjo lyginant su PKN grupės

mėginiais (11 pav.). *Mki67* ir *Ccnd1* sumažėjo lyginant su gimdos kontrole, neveiktomis gimdos ląstelėmis (11 pav.).



**11 pav.** *Pcna*, *Mki67*, *Ccnd1* genų raiškos pokyčiai pelių gimdos audinyje: kontrolinė grupė – sveikos, neveiktos pelės; PKN – pelės su priešlaikiniu kiaušidžių nepakankamumu; PKN+PKVL – PKN pelės po ląstelių terapijos. Genų raiškos pokyčiai buvo nustatyti atvirkštinės transkripcijos kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos (RT-qPCR) metodu ir rezultatai apskaičiuoti naudojant  $\Delta\Delta C_t$  metodą. (\* $p \leq 0,05$ ), rezultatai pateikiami kaip vidurkis  $\pm$  S.D.

Toliau yra analizuojama genų susijusių su folikulų ar oocitų vystymuisi raiška kiaušidžių audiniuose (12 pav.). Nustatyta, jog kiaušidžių audiniuose po chemoterapijos keturių genų *Amh*, *Boll*, *Fshr*, *Mvh* raiška sumažėjo, o *Amhr* ir *Gja* genų raiškos pokyčiai buvo nežymūs. Kiaušidžių mėginiuose po taikytos ląstelių terapijos *Amh* ir *Amhr* genų raiška padidėjo, *Fshr* ir *Gja* genų raiška liko nepakitusi lyginant su PKN grupe. *Boll* ir *Mvh* raiškos nepavyko nustatyti PKN+PKVL grupėje.



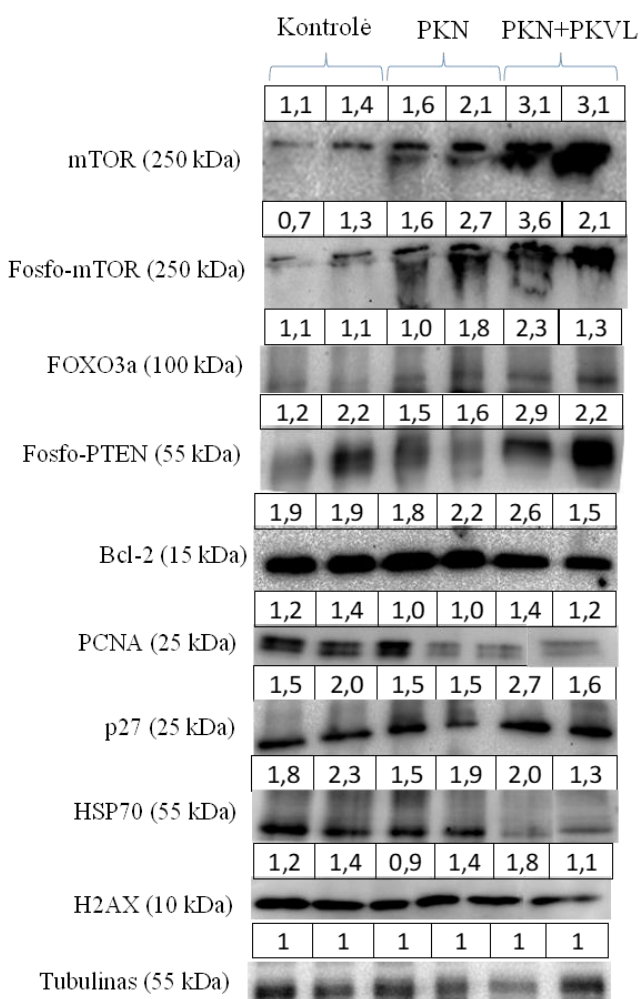
**12 pav.** *Amh, Amhr, Boll, Fshr, Mvh, Gja* genų raiškos pokyčiai pelių kiaušidės audinyje: kontrolinė grupė-sveikos, neveiktos pelės; PKN-pelės su priešlaikiniu kiaušidžių nepakankamumu; PKN+PKVL-PKN pelės po ląstelių terapijos. Genų raiškos pokyčiai buvo nustatyti atvirkštinės transkripcijos kiekybinės polimerazės grandininės reakcijos (RT-qPCR) metodu ir rezultatai apskaičiuoti naudojant  $\Delta\Delta C_t$  metodą. (\* $p \leq 0.05$ ), rezultatai pateikiami kaip vidurkis  $\pm$  S.D.

Apibendrinus galima teigti kad gimdos audiniuose po chemoterapijos visų trijų tirtų *Pcna*, *Mki67*, *Ccnd1* genų raiška padidėjo, didžiausias pokytis buvo *Pcna* geno raiška, kuris vaidina esminį vaidmenį ląstelių proliferacijoje. Taip pat nustatėme ir *Mki67* geno raiškos padidėjimą PKN grupėje. Šio geno raiška yra stipriai susijusi su naviko ląstelių proliferacija ir augimu bei apsaugo nuo mitozinių chromosomų agregacijos. Kiaušidžių audiniuose po naudotos chemoterapijos *Amh*, *Boll*, *Fshr*, *Mvh* genų raiška sumažėjo. Visi šie tirti genai dalyvauja formuojant pirminius folikulus ir yra svarbūs kiaušidžių funkcijos palaikyme.

### 3.2.2. Baltymų, susijusių su folikulogenezės ir ląstelės ciklo, apoptozės reguliavimu, raiškos analizė *in vivo*

Baltymai buvo išskirti iš kiaušidžių audinių ir analizuojama jų raiškos pokyčiai kontrolinėse, PKN ir PKN+PKVL grupėse, naudojant imuninį tyrimą (*Western blot*). Nustatėme, kad mTOR ir fosfo-mTOR (Ser2448) baltymų raiška padidėjo PKN ir PKN+PKVL mėginiuose. TOR baltymai (kinazės) vaidina lemiamą vaidmenį reguliuojant ląstelių išgyvenamumą, metabolizmą, augimą ir baltymų sintezę, taip pat labai svarbūs folikulų brandimo metu kiaušidėse. Mūsų rezultatai parodo, kad baltymas mTOR bei jo fosforilinimas didėja PKN modelyje. Literatūroje yra pateikiami

rezultatai, kai naudojant chemoterapinius vaistus pelės kiaušidžių audiniuose mTOR sumažėdavo, bet kiti darbai rodo kad ir padidėdavo mTOR raiška (Zaixin Yu, 2019). Rezultatai yra labai kontroversiški ir nėra iki galo aiškūs mTOR vaidmuo kiaušidėse nevaisingumo atvejais. Toliau tyrėme baltymų svarbių apoptozės, ląstelės ciklo ir kt. reguliavime. PCNA yra daugelio esminių ląstelinių procesų, tokių kaip DNR replikacija, DNR pažeidimo atstatymas, chromatinio struktūros palaikymas, chromosomų segregacija ir ląstelių ciklo progresavimas, pagrindas. Mes nustatėmė, kad PCNA baltymo raiška kontrolinėje grupėje buvo didesnė nei PKN grupėje ir ji išliko tokia pati maža PKN+ PKVL grupėje. Kitas baltymas svarbus apoptozės, ląstelės ciklo bei oksidacinio streso atsparumo reguliavime yra FOXO3a. Nustatėmė, kad baltymo raiška padidėja esant kiaušidžių nepakankamumui ir toliau išliko žema taikant ląstelių tarapiją (PKN+ PKVL grupė). Visose grupėse ekspresija beveik vienoda ir didelė buvo Bcl-2, p27 ir H2AX baltymų. Kitų baltymų fosfo-PTEN, tubulino, HSP70 raiškos statistiškai patikimų pokyčių neradome lyginant skirtingas pelių grupes.



**13 pav.** Baltymų raiškos pokyčiai pelių kiaušidžių audiniuose. Santykinis baltymų raiškos lygis buvo įvertintas naudojant ImageJ programą: kontrolinė grupė; PKN grupė - pelės kurioms yra sukeltas kiaušidžių nepakankamumas; PKN+PKVL - PKN pelėms buvo injekuotos PKVL į kiaušides. Referentinis baltymas - tubulinas.

## IŠVADOS

1. Nustatyta, kad periferinio kraujo pirminės ląstelės pasižymi limfocitams (CD5, CD7, CD4, CD8, CD56, CD16) būdingais paviršiaus žymenimis, tačiau auginant *in vitro* turi ribotą proliferacinį potencialą.
2. Parodyta, kad sukėlus pelėms priešlaikinį kiaušidžių nepakankamumą, pelės prarado gebėjimą pastoti ir kiaušidžių audinio mėginiuose sumažėjo su folikulogenezės procesu susijusių genų raiška. *Amh* ir *Amhr* genų, atliekančių svarbų vaidmenį kiaušidžių funkcionavime, raiška padidėjo taikant periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių terapiją priešlaikinio kiaušidžių nepakankamumo modelyje.
3. Pastebėta, kad periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių terapija nežymiai sąlygojo AMH padidėjimą pelių kraujo serume, tačiau neturėjo teigiamo terapinio poveikio eksperimentiniame nevaisingumo (priešlaikinio kiaušidžių nepakankamumo) modelyje *in vivo*.

Apibendrinant, parodėme kad nors ir daugėja literatūroje duomenų apie periferinio kraujo ląstelių naudą regeneracinėje medicinoje, nustatėme kad šios ląstelės turi įtakos genų susijusių su kiaušidės funkcionalumu, bet neturi teigiamo terapinio poveikio kiaušidžių nepakankamumui atstatyti *in vivo*.

Greta Tamulaitytė

Bakalauro baigiamasis darbas

**PKVL terapinis potencialas kiaušidžių funkcijai priešlaikinio kiaušidžių  
nepakankamumo gyvūnų modelyje**

**SANTRAUKA**

Su nevaisingumu susiduria vis daugiau šeimų. Lietuvoje nevaisingumas taip pat didėja, kiekvienais metais atvejų padaugėja apie 2000. Šio sutrikimo priežastys gali būti įvairios, tačiau dažnai pasitaikanti yra priešlaikinis kiaušidžių nepakankamumas kuris apibūdinamas kaip kiaušidžių funkcijos ir folikulų atsargos kiaušidėse praradimas. Gydant nevaisingumą yra taikoma pakaitinė hormonų terapija, bet ji galutinai neatkuria kiaušidžių funkcijos ir vaisingumo, todėl yra ieškoma naujų, perspektyvesnių gydymo būdų. Pastaraisiais metais ląstelių terapija laikoma novatorišku įvairių ligų, ypač autoimuninių ligų, gydymo būdu. Vis daugiau įrodymų rodo, kad periferinis kraujas gali būti alternatyvus kamieninių/progenitorinių ląstelių šaltinis tinkantis klinikiniam naudojimui.

Šiame tyrime siekėme įvertinti periferinio kraujo ląstelių augimą, charakteristiką bei panaudojimo galimybes ląstelių terapijoje gydant nevaisingumą. Siekiant įgyvendinti mūsų išsikeltus uždavinius iš periferinio kraujo buvo išskirtos suspensinės ir limpančios ląstelės. Atlikę charakteriavimą su paviršiaus žymenimis nustatėme, jog periferinio kraujo pirminės ląstelės pasižymi limfocitams (CD5, CD7, CD4, CD8, CD56, CD16) būdingais paviršiaus žymenimis, tačiau auginant *in vitro* turi ribotą proliferacinį potencialą. Taip pat pastebėjome, kad sukėlus pelėms priešlaikinį kiaušidžių nepakankamumą, pelės prarado gebėjimą pastoti ir kiaušidžių audinio mėginiuose sumažėjo su folikulogenezės procesu susijusių genų raiška. *Amh* ir *Amhr* genų, atliekančių svarbų vaidmenį kiaušidžių funkcionavime, raiška padidėjo taikant periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių terapiją priešlaikinio kiaušidžių nepakankamumo modelyje. Padarėme išvadas, kad periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių terapija nežymiai sąlygoja AMH padidėjimą pelių kraujo serume, tačiau neturi teigiamo terapinio poveikio eksperimentiniame nevaisingumo (priešlaikinio kiaušidžių nepakankamumo) modelyje *in vivo*.

VILNIUS UNIVERSITY

LIFE SCIENCES CENTER

Greta Tamulaitytė

Bachelor thesis

**Therapeutic potency of PBMC's on ovarian function in an animal model of  
premature ovarian failure**

**SUMMARY**

More and more families are facing infertility. In Lithuania, infertility is also increasing, the number of cases increases by about 2000 every year. The causes of this disorder can be various, but the most common is premature ovarian failure, which is defined as the loss of ovarian function and follicle reserve in the ovaries. Hormone therapy is used to treat infertility, but it does not definitively restore ovarian function and fertility, so new, more promising treatments are being sought. In recent years, cell therapy has been considered an innovative way of treating various diseases, especially autoimmune diseases. Increasing evidence suggests that peripheral blood may be an alternative source of stem/progenitor cells suitable for clinical use.

In this study, we aimed to evaluate the growth, characteristics and possibilities of use of peripheral blood cells in cell therapy in the treatment of infertility. In order to achieve our goals, suspensive and adherent cells were isolated from donor peripheral blood. After characterization with surface markers, we found that peripheral blood primary cells have surface markers typical of lymphocytes (CD5, CD7, CD4, CD8, CD56, CD16), but have limited proliferative potential when cultured *in vitro*. We also observed that after inducing premature ovarian failure in mice, the mice lost the ability to conceive and the expression of genes related to the process of folliculogenesis was reduced in ovarian tissue samples. The expression of *Amh* and *Amhr* genes, which play an important role in ovarian function, was increased by peripheral blood mononuclear cell therapy in a model of premature ovarian failure. We concluded that peripheral blood mononuclear cell therapy causes a slight increase in AMH in the blood serum of mice, but does not have a positive therapeutic effect in an experimental model of infertility (premature ovarian failure) *in vivo*.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Aabb.org. USA: Association for the Advancement of Blood & Biotherapies.; sukurta 2016.  
Adresas: <https://www.aabb.org/>
2. Akadeum.com. Michigan, USA: Akadeum Life Sciences. Adresas: <https://www.akadeum.com/>
3. Amanvermez R, Tosun M., 2016. An Update on Ovarian Aging and Ovarian Reserve Tests. International journal of fertility & sterility, 9(4):411-5.  
Adresas: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4793161/>
4. Beckman.com. Brea, California: Beckman Coulter Diagnostics.; sukurta 2011.  
Adresas: <https://www.beckman.com/>
5. Bedoschi G, Navarro P.A., Oktay K., 2016. Chemotherapy-induced damage to ovary: mechanisms and clinical impact. Future Oncol, Oct;12(20):2333-44.  
Adresas: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5066134/>
6. Clevelandclinic.org. Cleveland, Ohio: Cleveland Clinic.; sukurta 2022.  
Adresas: <https://my.clevelandclinic.org/>
7. Columbiadoctors.org. New York: ColumbiaDoctors|Columbia University Irving Medical Center.; sukurta 2018. Adresas: <https://www.columbiadoctors.org/>
8. Creativebiomart.net. New York, USA: Creative BioMart.  
Adresas: <https://www.creativebiomart.net/>
9. Criver.com. Wilmington, Massachusetts, US: Charles River Laboratories; sukurta 1947.  
Adresas: <https://www.criver.com/products-services/cell-sourcing/research-use-only-human-cells/human-peripheral-blood?region=3696>
10. Elisa-kits.de. Cologne, Germany: ELISA Kits; sukurta 1993. Adresas: <https://elisa-kits.de/en/>
11. Fertility.womenandinfants.org. Rhode Island, JAV: Women & Infants Fertility Center.  
Adresas: <https://fertility.womenandinfants.org/>
12. Fliser D., 2011. Chapter 5 - Tissue Protection and Regeneration Aided by Erythropoietin and Erythropoietin-derived Peptides. Kn.: Goligorsky M.S., Regenerative Nephrology: 93-101. Cambridge, Massachusetts, USA: Leidykla „Academic Press“.  
Adresas: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/hematopoietic-system>
13. Genecards.org. Rehovot, Israel: GeneCards; sukurta 1997. Adresas: <https://www.genecards.org/>
14. Gibson E, Mahdy H. Anatomy, Abdomen and Pelvis, Ovary. Michigan, United States: Michigan State University [Updated 2022 Jul 25].  
Adresas: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545187/#\\_NBK545187\\_pubdet](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545187/#_NBK545187_pubdet)
15. Guess T., 2016. Researchgate.net. Berlin, Germany: ResearchGate; sukurta 2018.

- Adresas: <https://www.researchgate.net/>
16. Guo Z., Yu Q., 2019. Role of mTOR Signaling in Female Reproduction. *Frontiers in endocrinology*. Adresas: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6794368/>
  17. Hellicar L., 2022. What is diminished ovarian reserve?  
Adresas: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/diminished-ovarian-reserve>
  18. Jagannathan-Bogdan M, Zon LI., 2013. Hematopoiesis. *Development*, Jun;140(12):2463-7.  
Adresas: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3666375/>
  19. Jankowska K., 2017. Premature ovarian failure, Jun;16(2):51-56.  
Adresas: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5509972/>
  20. Lonza.com. Basel, Switzerland: Lonza Group AG; sukurta 1897.  
Adresas: <https://knowledge.lonza.com/>
  21. Manley N., Spink K., 2019. Best Practices In Preclinical Development Of Cell Therapy Products. Dark Horse Consulting Group, Inc.  
Adresas: <https://www.cellandgene.com/doc/best-practices-in-preclinical-development-of-cell-therapy-products-0001>
  22. Mcgee E.A., & Hsueh A.J., 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine reviews*, 21 2, 200-14.  
Adresas: <https://www.semanticscholar.org/paper/Initial-and-cyclic-recruitment-of-ovarian-Mcgee-Hsueh/1dede8c48276e75786127f51326ad9cf2909cfae>
  23. Navakauskienė R, Žukauskaitė D, Borutinskaitė VV, Bukreieva T, Skliutė G, Valatkaitė E, Zentelytė A, Piešinienė L and Shablii V., 2023. Effects of human placenta cryopreservation on molecular characteristics of placental mesenchymal stromal cells. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 11:1140781. Adresas: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2023.1140781/full>
  24. Nhs.uk. UK: United Kingdom National Health Service; sukurta 1948.  
Adresas: <https://www.nhs.uk/>
  25. Orthoinfo.aaos.org. USA: American Academy of Orthopaedic Surgeons; sukurta 1995.  
Adresas: <https://orthoinfo.aaos.org/>
  26. Plante B.J., Cooper G.S., Baird D.D., Steiner A.Z., 2010. The impact of smoking on antimüllerian hormone levels in women aged 38 to 50 years. *Menopause*, 17(3):571-576.  
Adresas: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2866786/>
  27. Podfigurna-Stopa A., Czyzyk A., Grymowicz M., Smolarczyk R., Katulski K., Czajkowski K., Meczekalski B., 2016. Premature ovarian insufficiency: the context of long-term effects. *Journal of endocrinological investigation*, 39(9), 983–990.  
Adresas: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4987394/>
  28. Puckrin Z., 2022. Reprocell.com. Japan: REPROCELL Inc.; sukurta 2003.

- Adresas: <https://www.reprocell.com/blog/cls/what-is-pbmc>
29. Pulsenotes.com. London, UK: Pulsenotes. Adresas: <https://www.pulsenotes.com/>
30. RN.com. US: AMN Healthcare Education Services; sukurta 2016. Adresas: <https://www.rn.com/>
31. Rrc.com. Overland Park, United States: Reproductive Resource Center.; sukurta 2019.  
Adresas: <https://www.rrc.com/>
32. Sinobiological.com. China: Sino Biological; sukurta 2016.  
Adresas: <https://www.sinobiological.com/>
33. ThermoFisher.com. Waltham, Massachusetts, USA: Thermo Fisher Scientific; sukurta 1956.  
Adresas: <https://www.thermofisher.com/lt/en/home.html>
34. Training.seer.cancer.gov. USA: Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program.  
Adresas: <https://training.seer.cancer.gov/index.html>
35. Wang MY, Wang YX, Li-Ling J, Xie HQ., 2022. Adult Stem Cell Therapy for Premature Ovarian Failure: From Bench to Bedside. Tissue Eng Part B Rev. 28(1):63-78.  
Adresas: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33427039/>
36. Yi H., Lu G., 2012. Adherent and non-adherent dendritic cells are equivalently qualified in GM-CSF, IL-4 and TNF- $\alpha$  culture system. Kn.: Yi H., Lu G., Cellular Immunology: 44-48. Amsterdam, Netherlands: Leidykla „Elsevier“.  
Adresas: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0008874912001116>

## PRIEDAI

**1 lentelė.** Periferinio kraujo pirminių ląstelių charakterizavimo tėkmės citometrijos metodu.

| CD žymuo                                   | Donoras Nr. 1 | Donoras Nr. 2 | Donoras Nr. 3 | Donoras Nr. 4 | Donoras Nr. 5 | Donoras Nr. 6 | Donoras Nr. 7 | Donoras Nr. 8 |
|--------------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Limfocitai</b>                          |               |               |               |               |               |               |               |               |
| CD3                                        | 5,08%         | nenustatyta   | nenustatyta   | 64%           | 62%           | 50%           | 36%           | 37,96%        |
| CD8                                        | 2,41%         | nenustatyta   | 1,8%          | 18%           | 7%            | 16%           | 12%           | nematuota     |
| CD56                                       | 0,83%         | nenustatyta   | nenustatyta   | 45%           | 20%           | 26%           | nematuota     | nematuota     |
| CD5                                        | nematuota     | nematuota     | nematuota     | 80%           | 33%           | 36%           | 81%           | nematuota     |
| CD4                                        | 2,23%         | nenustatyta   | 0,62%         | 29%           | 14%           | 18%           | 11%           | 2,54%         |
| CD16                                       | 4,08%         | 0,59%         | 1,39%         | nematuota     | nematuota     | 4%            | 5%            | nematuota     |
| CD44                                       | nenustatyta   | 41,4%         | 5,72%         | 17%           | 52%           | 31%           | 53%           | 51,49%        |
| CD7                                        | nematuota     | nematuota     | nematuota     | 61%           | 47%           | 79%           | 85%           | nematuota     |
| CD116                                      | nematuota     | nematuota     | nematuota     | 8%            | 7%            | 10%           | nematuota     | 7,04%         |
| CD9                                        | 17,37%        | 5,34%         | 4,92%         | nematuota     | nematuota     | nematuota     | nematuota     | 3,49%         |
| <b>Imuninio atsako ląstelės</b>            |               |               |               |               |               |               |               |               |
| HLA-ABC                                    | 76,72%        | 1,69%         | 14,44%        | nematuota     | nematuota     | nematuota     | nematuota     | nematuota     |
| HLA-DR                                     | 56,82%        | nenustatyta   | nenustatyta   | nematuota     | nematuota     | 88%           | 80%           | 8,69%         |
| <b>Mezenchiminės kamieninės ląstelės</b>   |               |               |               |               |               |               |               |               |
| BMSC                                       | 2,97%         | 0,19%         | 0,72%         | nematuota     | nematuota     | nematuota     | nematuota     | nematuota     |
| <b>Hematopoetinės kamieninės ląstelės</b>  |               |               |               |               |               |               |               |               |
| CD34                                       | 1,52%         | 4,56%         | nenustatyta   | 4%            | 5%            | 7%            | 3%            | nematuota     |
| <b>Endotelinės/hematopoetinės ląstelės</b> |               |               |               |               |               |               |               |               |
| CD31                                       | nematuota     | nematuota     | nematuota     | nematuota     | nematuota     | nematuota     | nematuota     | nenustatyta   |