

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Biofizikos magistro studijų programos II kurso studentė

Jogilė MAČYTĖ

Magistro baigiamasis darbas

Kamieninių ląstelių elektrofiziologinių savybių tyrimas

Darbo vadovas:

Prof. dr. Aidas Alaburda

VILNIUS

2021

Kamieninių ląstelių elektrofiziologinių savybių tyrimas

Darbas atliktas

Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre, Biomokslų institute.

Jogilė MAČYTĖ

Darbo vadovas:

Prof. dr. Aidis ALABURDA

TURINYS

Santrumpos	4
ĮVADAS	5
1. LITERATŪROS APŽVALGA	6
1.1. Kamieninės ląstelės ir jų savybės	6
1.2. Kamieninių ląstelių šaltiniai	7
1.3. Mesenchiminės kamieninės ląstelės	8
1.4. Elektros stimuliacija	9
1.5. Transformuojantis augimo faktorius	10
1.6. Interleukinas	10
1.7. Nifedipinas	11
1.8. Ramybės potencialas	11
1.9. L-tipo įtampos valdomi kalcio joniniai kanalai	11
1.10. Jonų kanalai kamieninėse ląstelėse	13
2. METODIKA	14
2.1. Tiriamasis objektas	14
2.2. Ląstelių paruošimas	14
2.3. Registravimas	14
2.4. Naudoti protokolai	16
2.5. Duomenų analizė ir pateikimas	17
3. REZULTATAI	20
TYRIMO REZULTATŲ APTARIMAS	29
IŠVADOS	32
SANTRAUKA	33
SUMMARY	34
LITERATŪROS SĄRAŠAS	35

Santrumpos

DHP - 1,4-dihidropiridinas

hMSC – žmogaus mesenchiminės kamieninės ląstelės

IL-1 β – interleukinas-1beta

MSC- mesenchiminės kamieninės ląstelės

NIF – nifedipinas

TGF-1 β 3 – transformuojantis augimo faktorius-1beta3

TRP – trumpalaikis receptoriaus potencialas

IVADAS

Kamieninės ląstelės sulaukė mokslinio, klinikinio ir visuomenės susidomėjimo, dėl savo savybės atsinaujinti ir galimybės išsivystyti į specifinius ląstelių tipus, priklausomai nuo jų šaltinio ir biologinio plastiškumo. Tikimasi, kad kamieninės ląstelės galės būti panaudojamos regeneracinėje medicinoje pažeistoms ląstelėms ar audiniams pakeisti (Berger et al., 2016).

Per joninius kanalus tekančios srovės svarbios kamieninių ląstelių funkcionavimui. Be to, atskirų joninių kanalų eksresija gali priklausyti ir nuo diferenciacijos pobūdžio. Informacija apie aukštos įtampos valdomus L-tipo kalcio kanalus prieštaringa, vieni autoriai teigia, kad jie yra ląstelėse, kiti jog ne. L-tipo kalcio kanalai, priklausantys įtampos valdomiems kanalams yra svarbūs įvairiuose fiziologiniuose procesuose organizme, įskaitant ir neurotransmisiją, ląstelių ciklą, raumenų susitraukimą, širdies veikimo potencialą ir genų raišką. Netinkamas kalcio kanalų reguliavimas yra susijęs su neurologiniais, širdies ir kraujagyslių, psichikos ir raumenų sutrikimais (Xu et al., 2021). Nagrinėjant kamieninių ląstelių potencialą regeneracinėje medicinoje svarbu išsiaiškinti ar ir kaip šių joninių kanalų eksresija kinta kaulų čiulpų kamieninėse ląstelėse diferenciacijos metu (Li et al., 2005).

Šiame darbe žmogaus kaulų čiulpų kamieninėse ląstelėse buvo tiriama, ar paveikus skirtingais faktoriais, skatinančiais chondrogeninę diferenciaciją, tokiais, kaip elektrinė stimuliacija, transformuojančiu augimo faktoriumi-1 β , interleukinu-1 β , turi įtakos per L-tipo kalcio kanalus tekančioms srovėms, ląstelės ramybės potencialui ir įėjimo varžai.

Šio **darbo tikslas** – nustatyti kaip chondrogeninės diferenciacijos metu keičiasi kaulų čiulpų kamieninių ląstelių elektrofiziologinės savybės.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti ar elektrinė stimuliacija, interleukinas-1 β , transformuojantis augimo faktorius-1 β įtakoja L-tipo įtekančias kalcio sroves kamieninėse ląstelėse.
2. Nustatyti ar elektrinė stimuliacija, interleukinas-1 β , transformuojantis augimo faktorius-1 β įtakoja kaulų čiulpų kamieninių ląstelių ramybės potencialą.
3. Nustatyti ar elektrinė stimuliacija, interleukinas-1 β , transformuojantis augimo faktorius-1 β įtakoja kaulų čiulpų kamieninių ląstelių įėjimo varžą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

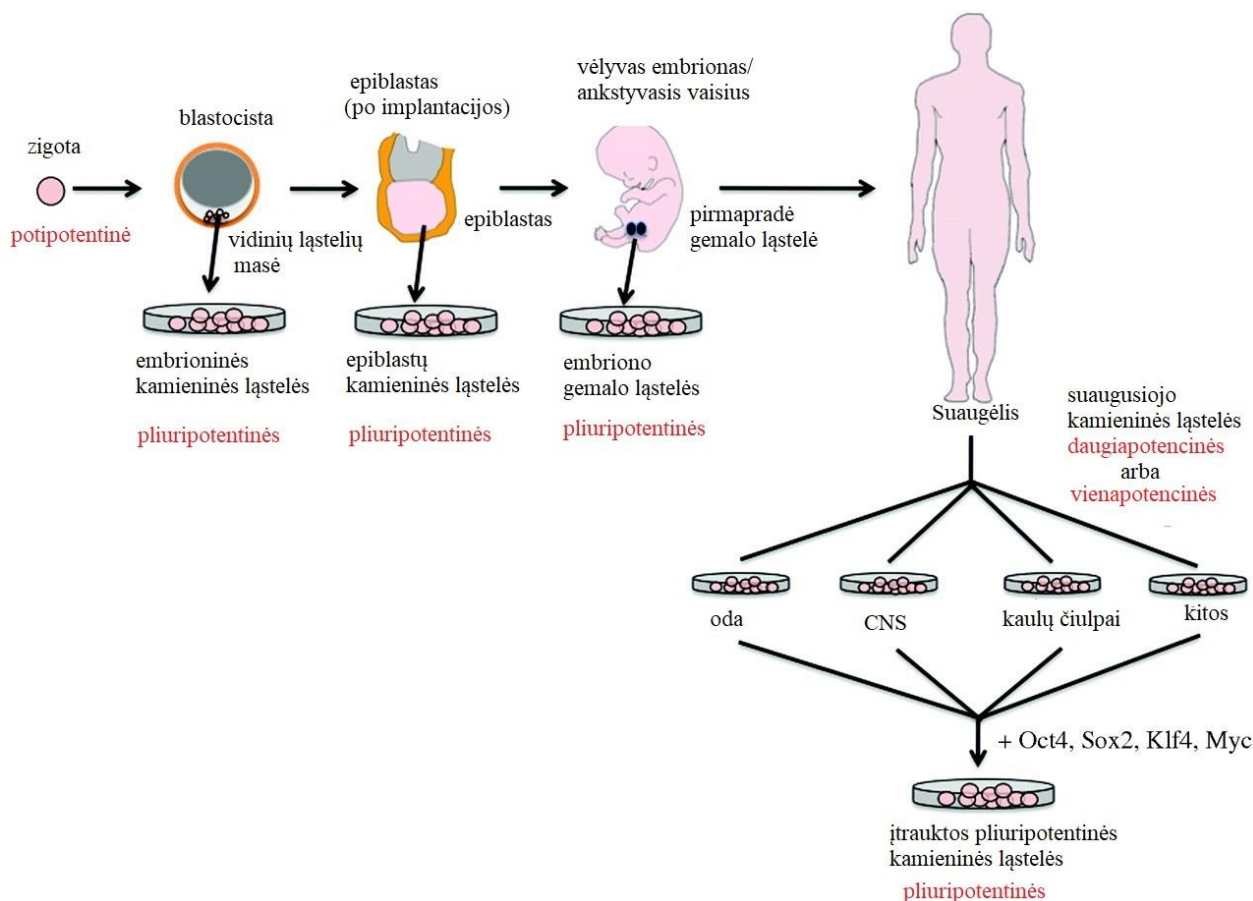
Žmogaus kūną sudaro daugiau nei 200 skirtingų ląstelių tipų. Ląstelės suskirstytos į audinius ir organus, tam jog užtikrintų reikalingas funkcijas gyvybingumui ir dauginimuisi. Domintis istoriškai, biologai pirmiausia nagrinėjo įvykius, kurie įvyksta prieš gimimą. XX a. antroji pusė žinoma kaip biologijos raidos laikotarpis, nes pagrindiniai reguliavimo keliai kontroliuojantys audinių specifikacija ir morfogenezę, buvo apibūdinti molekulinį lygiu (Arias, 2008).

1.1. Kamieninės ląstelės ir jų savybės

Kamieninės ląstelės galima apibūdinti kaip nespecializuotas žmogaus kūno ląsteles, kurios sugeba diferencijuotis į bet kurią organizmo ląstelę ir turi gebėjimą atsinaujinti (Zakrzewski et al., 2019).

Išskiriami du plačiausi žinduolių kamieninių ląstelių tipai: embrioninės ląstelės, kurių yra blastocituose ir suaugusiųjų kamieninės ląstelės, kurios randamos suaugusiųjų žmonių audiniuose. Embriono vystymosi metu, kamieninės ląstelės gali diferencijuotis į visus specializuotus embrioninius audinius. Daugelyje organų ir audinių randama suaugusiųjų kamieninių ląstelių, bet kiekviename rastame audinyje yra labai mažas šių ląstelių skaičius. Suaugusiųjų kamieninės ląstelės lieka ramybės būsenoje (nesidalina), bet jas suaktyvinti gali liga ar audinių pažeidimas. Suaugusiųjų kamieninės ląstelės veikia kaip kūno atstatymo sistema, palaikanti normalią organų regeneraciją, tokiu kaip: kraujas, žarnyno audiniai, oda (Kumar et al., 2010).

Pradinių kamieninių ląstelių tyrimų tikslas buvo suprasti kaip audiniai yra palaikomi suaugusiųjų žmonių kūne, o ne kaip atsiranda skirtingi ląstelių tipai embrione. Tam tikruose audiniuose yra ląstelių heterogeniškumas: kai kuriuose audiniuose, pavyzdžiui, odos, kraujo ir žarnyno epitelyje, diferencijuotų ląstelių gyvenimo trukmė trumpa ir jos negali savaime atsinaujinti. Visa tai, paskatino sampratą, kad tokius audinius palaiko kamieninės ląstelės, kurios buvo apibrėžtos kaip didelių atsinaujinimo pajėgumu ir galimybe generuoti dukterines ląsteles, kurios toliau diferencijuojamos (Lajtha, 1979). Šias savybes turinčios ląstelės gali sukurti tik diferencijuotas linijas kurios tinkamos audiniui, kuriame jos gyvena, dėl to vadinamos daugiapotencinėmis arba unipotencinėmis (1 pav.) (Watt ir Driskell, 2010).



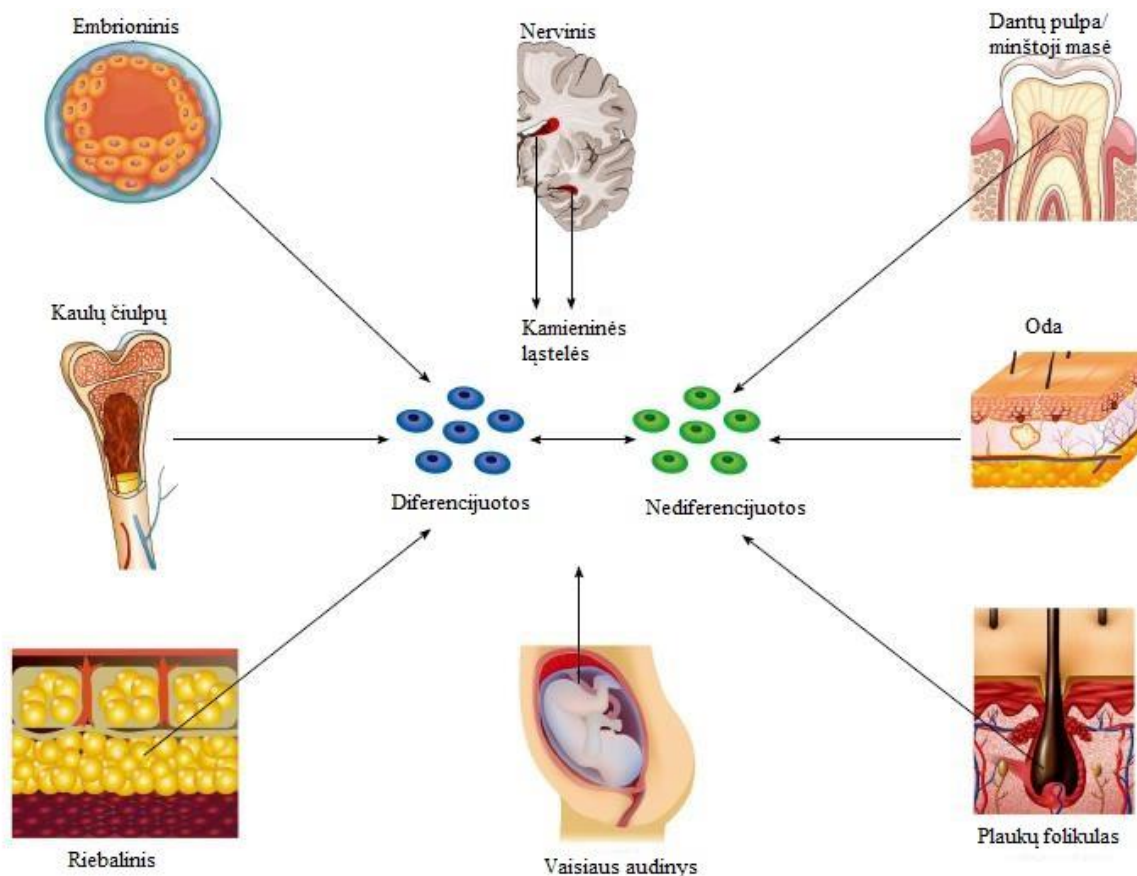
1 pav. Kamieninių ląstelių kilmė. Šaltinis: adaptuota pagal Watt ir Driskell, 2010.

Pluripotentinėmis ląstelėmis apibūdinamoms tos kurios gali suformuoti visus suaugusio organizmo ląstelių tipus. O jeigu ir gali kartu suformuoti papildomus embriono audinius tada – totipotencinės. Multipotencinės kamieninės ląstelės gali suformuoti kelis vienos giminės ląstelių tipus, pavyzdys - kraujodaros kamieninės ląstelės. Jeigu ląstelės sudaro vieną tipą, pavyzdžiui – spermatogoninės kamieninės ląstelės, tokios ląstelės – vienapotentinės (Jaenisch ir Young, 2008).

1.2. Kamieninių ląstelių šaltiniai

Pradžioje paminėti, plačiausiai išskirtų kamieninių ląstelių tipai: embrioninės ir suaugusiųjų kamieninės ląstelės. Embrioninės kamieninės ląstelės yra išskiriamos iš vidinės blastocistos ląstelių masės, norint jas išskirti reikalingas embriono sunaikinimas. Nervinės - surenkamos iš skilvelio pogumburio ir hipokampo pagrindinio sluoksnio. Kaulų čiulpu kamieninės ląstelės - iš ilgųjų kaulų čiulpu ertmės (dar vadinamos porėtosios). Riebalinės kilmės kamieninės ląstelės išskiriamos iš poodinių riebalų, dažniausia atliekant tokias procedūras kaip riebalų nusiurbimas. Odos kamieninės ląstelės - surenkamos iš dermos. Vaisiaus audinys išskiriamas iš vaisiaus vandenų, virkštelės kraujo ar virkštelės audinio ląstelių

populiacijos. Ir dantų minkštimo kamienines ląsteles, galima surinkti iš pieninių dantų (2 pav.) (Fairbairn, 2015).



2 pav. Skirtingi kamieninių ląstelių šaltiniai. Šaltinis: adaptuota pagal Fairbairn, 2015.

1.3. Mesenchiminės kamieninės ląstelės

Mesenchiminės kamieninės ląstelės (MSC) - daugiapotencinės stromos ląstelės, galinčios atsinaujinti, pasižyminčios daugialypę diferenciacija. MSC gali būti išskiriamos iš įvairių audinių: virkštelės, endometriumo polipų, menstruacijų kraujo, kaulų čiulpu, riebalinio audinio ir kt. Vystymosi metu, MSC gali diferencijuotis į įvairias mezodermos, ektodermos ir endodermos linijas, tokias kaip: kaulai, riebalai, chondrocitai, raumenys, neuronai, kepenų ląstelės esant specifinėms *in vitro* sąlygoms (Ding et al., 2011). Diferenciaciją, taip pat reguliuoja ir genetiniai faktoriai, susiję su transkripcijos veiksniais. Diferenciacija gali vykti pagal tam tikrą fenotipo kelią, kontaktuoti su kai kuriais reguliavimo genais ir sukelti nediferencijuotų ląstelių vystymąsi pagal tam tikrą giminę (Dennis et al., 2002). Kaulų čiulpu mezenchiminės kamieninės ląstelės, gaunamos iš kaulų čiulpu sudaro <0,0001% visų ląstelių. Atsižvelgus į lengvą prieinamumą, daugialypės diferencijos ir mažo imunogeniškumo

pranašumus, MSC buvo plačiai ištirtos ir daug žadančios gydant įvairias imuninės sistemos sukeltas ligas arba audinių defektus (Li ir Qu, 2017).

1.4. Elektros stimuliacija

Elektrocheminiais signalais ląstelės bendrauja tarpusavyje ir su aplinkiniais audiniais, organais. Signalai kyla iš teigiamai ir neigiamai įkrautų jonų perėjimo per ląstelių membranas ir yra pagrindiniai reguliuojantys ląstelių funkcijas, embriono vystymąsi, gijimą ir taip pat regeneraciją (Heng et al., 2020). Dėl šios aktyvios įkrautų jonų pernašos į ląstelę ir iš jos atsiranda transmembraninės įtampos gradientas (Bhavsar et al., 2019).

Elektrinės stimuliacijos metodai daugiausiai gali būti suskirstyti į tris tipus: tiesioginis sujungimas, talpinis sujungimas ir elektromagnetinio lauko naudojimas (Chen et al., 2019). Tiesioginis sujungimas - elektrodai įtempiami tiesiai į ląstelių kultūros terpę ir pritvirtinami prie pastoliu (kurie imituoja audinio mechanines ir norimas biologines savybes), kad gautų elektrinę stimuliaciją. Tai, populiariausias metodas dėl paprasto veikimo, bet trūkumai, tokie kaip: nepakankamas elektrodo biologinis suderinamumas, kontaktas su terpe lemia temperatūros kilimą, pH pokyčius ir galimus kenksmingų šalutinių produktų susidarymus (Samadian et al., 2016). Talpinis sujungimas – du elektrodai dedami priešinguose galuose, kad numatyti vienodą elektrinį lauką į ląstelės pasėtas ant pastolių, kurie aptinkami tarp elektrodo. Tai biologiškai saugesnis metodas palyginus su pirmuoju ir nereikalingi laidūs pastoliai, kad būtų užtikrinta vienoda elektrinė stimuliacija. Trečias tipas, tai indukcinis sujungimas naudojantis valdomą elektromagnetinį lauką, kurį sukuria laidų ritė, išdėstyta aplink ląstelių kultūros sistemą ir vadinama – elektromagnetinio lauko stimuliavimu. Stimulus yra perduodamas pulsu, jog imituotu natūralų potencialo perdavimą žmogaus kūne (Chen et al., 2019). Šis metodas suteikia potencialo šalia tikslinės ląstelės, o ne tiesiogiai taiko elektrinę stimuliaciją ląstelėms. Pagrindinis trūkumas – laiko ir išteklių suvartojimas pvz., reikalinga 10 valandų stimuliacija arba gana aukšta įtampa (Fu et al., 2014).

Skirtingos stimuliacijos formos gali sukelti ląstelių dauginimąsi, diferenciaciją, visišką audinio atstatymą, bet parinkta netinkama elektrinė stimuliacija gali sukelti ląstelių mirtį arba nepaveikti stimuliuojamų ląstelių (Nuccitelli et al., 2013). Manoma, kad elektrinės stimuliacijos galimas veikimo būdas yra susijęs su ląstelės membranos depoliarizacija dėl tiesioginio įtampos nukreipto Ca^{2+} aktyvavimo kanalų, o tai lemtų ląstelės kalcio jonų koncentracijos padidėjimą (Leppik et al., 2020).

1.5. Transformuojantis augimo faktorius

TGF- β reguluoja ląstelių diferenciaciją ir dauginimąsi, embriono vystymąsi, žaizdų gijimą ir naujų kraujagyslių formavimąsi (Blobe et al., 2000). Išskiriamos trys TGF- β izoformos: TGF- β 1, TGF- β 2 ir TGF- β 3, šias paminėtas izoformas koduoja atskiri genai. TGF- β 1 - RNR (mRNR) ekspresuojamas endotelio, kraujodaros ir jungiamojo audinio ląstelių, TGF- β 2 iRNR epitelio ir neuronų ląsteles, TGF- β 3 iRNR pirmiausia mezenchiminėse ląstelėse. Augimo metu TGF- β 1 ir TGF- β 3 raiška vyksta ankstyvuose struktūrose, kuriuose vyksta morfogeneze, o TGF- β 2 pasireiškia vėliau subrendusiame ir diferencijuojančiame epitelyje (Taipale et al., 1998). Transformuojantis augimo faktorius-1 beta 3 (TGF-1 β 3) daugiafunkcinis augimo faktorius, unikalus dėl to, kad jo yra tik žinduoliuose, daugiausia išskiriamas kaip laterinis kompleksas ir iš karto laikomas tarpląstelinėje matricoje (Xu et al., 2018).

1.6. Interleukinas

Interleukinai - citokinų rūšis, kuri pradžioje buvo manoma, jog randama vien leukocituose, tačiau nustatyta, jog jas gamina daugelis kitų kūno ląstelių. Interleukinas (IL) yra svarbus aktyvinant ir diferencijuojant imunines ląsteles, bei dauginantis, brendimo metu taip pat turi uždegimą slopinančių savybių. Pagrindinė IL funkcija - augimo, diferenciacijos ir aktyvacijos moduliavimas uždegimų ir imuninių atsakų metu. Šios medžiagos susideda iš didelės grupės baltymų, kurie gali sukelti reakcijas ląstelėse ir audiniuose, kuomet jungiasi receptoriai ląstelių paviršiuose. Taip pat turi parakrininę (ląstelės išskiria signalines molekules, kurios veikia šalia esančias ląsteles), autokrininę (signalizuojančių molekulių tikslinė ląstelė yra ta pati ląstelė, iš kurios jie gaminami) funkcijas (Akdis et al., 2011).

Manoma, jog IL-1, uždegiminis citokinas, turintis skirtingas fiziologines funkcijas ir patologinę reikšmę, svarbias sveikatos ir ligų srityje (Kaneko et al., 2019). Žmogaus sekos algoritmo technologijos šiuo metu nustatė, kad IL-1 šeimą sudaro 11 narių (IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36Ra, IL-37 ir IL-38), kurie turi panašų ar skirtingą biologinį poveikį (Dinarello et al., 2010). IL-1 turi dvi atskiras formas, IL-1 α ir IL-1 β , jos išskiriamos iš dviejų skirtingų kDNR, bet pagal biologines funkcijas jų atskirti negalima (Lachman et al., 1977). Atitikimas tarp IL-1 α ir IL-1 β nėra didelis (27%) pagal aminorūgščių sekas, taip pat jos abi struktūriškai panašios, pastebimos tos pačios funkcijos, kuomet dalijimąsi bendru IL-1 tipo receptoriumi. IL- β gaminamas kaip 269-AA pirmtakių baltymas, apdorojamas kaspaze-1, kuris žinomas kaip IL-1 β konservuojantis fermentas, aktyvuojamas uždegimo. Apibendrinant, sutrikus IL-1 signalizacijos pusiausvyrai, jis gali prisidėti ne tik, kaip minėta anksčiau prie uždegiminių ligų, bet ir piktybinių naviku patogenezės. Šiandienai IL-1 taikomi

biologiniai vaistai plečiasi, nes nėra žinomų rimtų neigiamų padarinių, todėl tikimasi, kad IL-1 taps patraukliu molekulinį taikiniu gydant įvairiausias ligas, kaip autoimuninės ligos ir infekcinės ligos (Kaneko et al., 2019).

1.7. Nifedipinas

Nifedipinas (Nif) yra kalcio kanalų blokatorius priklausantis dihidropiridino poklasiui (Sorkin et al., 1985). Specifiškai priskiriamas kaip L-tipo kalcio kanalų blokatorius ir yra vienas iš efektyviausių, bei saugiausių vaistų pripažintų Pasaulio sveikatos organizacijos. Nifedipinas slopina Ca^{2+} srautą ir yra tinkamas gydyti hipertenzijai (Yang ir Friedlander, 2001).

1.8. Ramybės potencialas

Membranos ramybės potencialas – kelių skirtingų jonų rūšių judėjimo plazmos membranoje įvairiais jonų kanalais ir transporteriais rezultatas, kuris lemia skirtingus elektrostatinius krūvius per ląstelės membraną. Neuronų ir raumenų ląstelės yra sužadamos, todėl šių ląstelių tipai gali pasikeisti iš ramybės būsenos į sužadintą. Ląstelės ramybės būsenoje membranos potencialas apibūdinamas kaip elektrinio potencialo skirtumas ląstelės plazminėje membranoje kuomet ląstelė nesužadinta. Išskiriama keletas svarbiausių jonų, kurie prisideda prie ramybės potencialo, tai Na^+ ir K^+ , taip pat prisideda įvairūs neigiamai įkrauti viduląsteliniai baltymai, organiniai fosfatai kurie negali pereiti ląstelės membranos. Kadangi, ramybės būsenoje plazminė membrana turi didesnę K^+ pralaidumą, ramybės membranos potencialas (nuo -70 mV iki -80 mV) yra daug arčiau K^+ pusiausvyros, nei Na^+ (+65 mV). Tai parodo svarbų dalyką - kuo pralaidesnė plazminė membrana tam tikram jonui, tuo labiau jonas prisidės prie membranos potencialo reikšmės, tai reiškia, kad bendras membranos potencialas bus artimesnis dominuojančio jono pusiausvyros potencialui.

Depoliarizacija parodo membranos potencialo teigiamumo padidėjimą, o hiperpoliarizacija – membranos potencialo neigiamumo padidėjimą. Šie reiškiniai dažniausiai įvyksta tiek sužadinauose, tiek ir nesužadinauose ląstelėse (Wright, 2004).

1.9. L-tipo įtampos valdomi kalcio joniniai kanalai

Ląstelių membrana - fosfolipidų dvisluoksnis - iš esmės yra neįveikiamas barjeras jonų srautams. Dėl šio barjero, jonų pernaša vykdoma membranoje įterptais specializuotais baltymų nešikliais – jonų kanalais (Bezaniilla, 2008). Jonų kanalai suaktyvėja pajutus dirgiklius, tokius kaip membranos įtampa ar jungimasis su ligandu ir tai transformuojama į konformacinius pokyčius, kurie atveria kanalo poras (Horrigan ir Aldrich, 2002).

Jonų kanalai turi keletą neįprastų savybių, dėl kurių jie yra daugelio biocheminių, biofizikinių ir taip pat fiziologinių tyrimų objektas. Pirmiausia jie yra labai selektyvūs, išskiria ne tik anijonus ir katijonus, monovalentinius ir divalentinius jonus (pvz., Na^+ , K^+ , Ca^{2+}). Kita svarbi savybė, reakcija į specifinius signalus, ramybės būsenoje kanalai yra sandariai uždaryti ir nepralaidūs, tačiau jie atsidaro arba pasikeitus membranos potencialui, arba tam tikram ligandui. Pagal šį apibūdinimą jonų kanalai sudaryti iš dviejų funkcinių dalių: selektyvumo filtro – jis nustato, kurie jonų tipai gali būti perduoti per membraną ir vartų – kuriuose nurodoma, kokiomis sąlygomis kanalas atidarytas. Pagal tai kanalai suskirstyti į dvi pagrindines klases ir nukreipimo funkcija: įtampos kanalai ir ligandiniai kanalai (Hucho ir Weise, 2001).

Įtampa veikiami kalcio kanalai tai transmembraniniai jonų kanalų baltymai, kurie selektyviai praleidžia kalcio jonus per ląstelės membraną, reaguodami į membranos potencialą depoliarizacijos metu (Feng et al., 2018). Paulas Fattas ir Bernardas Katzas 1953 m. nustatė, kad vėžiagyvių raumenyse yra kalcį praleidžiančių jonų kanalų (Prakash et al., 2015). Pagal elektrofiziologines savybes, įtampos valdomus kalcio kanalus galima suskirstyti į žemos ir aukštos įtampos aktyvuotus kanalus (Dolphin, 2016). Aukštos įtampos aktyvuoti kanalai yra L, P/Q, N, R tipo, o žemos įtampos kanalas – T tipo (Feng et al., 2018). Mokslininkai Hess ir kt., (1984) nustatė, kad aukštos įtampos kanalai yra jautrūs 1,4-dihidropiridinams (DHP) L-tipo kalcio kanalų antagonistams (Tang et al., 2014).

L-tipo kalcio kanalai - pagrindinis kalcio patekimo į ląsteles kelias ir kaip minėta, priskiriami prie aukštos įtampos aktyvuotu kanalų grupės. Jie buvo pavadinti „L“ dėl ilgai trunkančių vidinių srovių depoliarizacijos proceso (Zamponi, 2016). Struktūriškai L-tipo įtampos kalcio kanalą sudaro keli skirtingi subvienetai kurie apima pagrindines poras formuojančius α_1 subvienetus, pagalbinus subvienetus - α_2 / δ , β ir γ (Dolphin, 2016). Pagalbiniai subvienetai yra nekovalentiškai α_1 subvieneto tolygioms biofizinėms savybėm (Bodi et al., 2005). α_1 subvienetas atitinka poras formuojanti L-tipo kalcio kanalo segmentą, kuris leidžia praeiti Ca^{2+} jonams ir susideda maždaug iš 2000 aminorūgščių. Kiti komponentai, pagalbiniai subvienetai modifikuoja kanalo funkcijas, pvz., β subvienetas ir $\alpha_2\delta$ – subvienetas pagreitina kanalo aktyvacijos ir deaktyvacijos kinetiką ir žymiai padidina joninės srovės laidumą (Dolphin, 2013).

Pagrindinės kanalų biofizinės ir farmakologinės savybė, įskaitant įtampos jutimą, jonų pralaidumą ir jungimąsi su vaistais, nustato - α_1 subvienetas, kuriame yra keturi homologiniai pasikartojimai, kiekvienas pasikartojimas susideda iš šešių membrana apimančių spiralių (Zamponi, 2016). Remiantis α_1 subvienetu skirtumais, L-tipo įtampos kalcio kanalai turi keturis potipius: Cav1.1, Cav1.2, Cav1.3, Cav1.4, jie plačiai pasiskirstę tarp skirtingų audinių ir

ląstelių, bei pasiřymi skirtingomis biofizinėmis ir farmakologinėmis savybėmis (Tan et al., 2019).

1.10. Jonų kanalai kamieninėse ląstelėse

Įvairių jonų kanalų srovės egzistuoja tarpusavyje kamieninėse ląstelėse. Apima įtampa valdomų K^+ jonų srovės, Ca^{2+} jonų aktyvuojamos K^+ jonų srovės, greitai inaktyvuojanti ištekanti K srovė, hiperpolarizacija aktyvuojančias ciklinio nukleotido reguliuojančio katijono srovės, chlorido srovės, įtampa valdomo Na^+ srovės, L-tipo kalcio srovės, trumpalaikio receptoriaus potencialo (TRP), neselektyvias katijonų srovės. Šios srovės egzistuoja embrioninėse ląstelėse, mezenchiminėse ląstelėse iš kaulų čiulpų, riebaliniame audinyje, žmogaus virkštelės venoje, nervinėse kamieninėse ląstelėse, širdies kamieninėse ląstelėse, skirtingų rūšių gautuose pluripotencinėse kamieninėse ląstelėse (Li ir Deng, 2011).

Yra penkios skirtingos jonų kanalų srovės išreikštos nediferencijuotomis mesenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis, įskaitant trijų tipų išorines srovės (I_{KCa} , I_I , ir I_K) ir dviejų tipų vidinės srovės (I_{Na} , I_{Ca}) (Li ir Xie, 2005).

2. METODIKA

2.1. Tiriamasis objektas

Šio elektrofiziologinių savybių tyrimo objektas yra žmogaus kaulų čiulpų kamieninės ląstelės. Buvo tirtos 7 grupės ląstelių: kontrolinės, paveiktos elektrine stimuliacija, TGF-1 β 3, IL-1 β , TGF-1 β 3+nif., IL-1 β + nif. Ląstelės buvo gaunamos bendradarbiaujant projekte su inovatyvios medicinos centru ir tiriamos neurobiologijos ir biofizikos katedroje, Vilniaus universitete.

2.2. Ląstelių paruošimas

Ląstelės atkeliauja +37°C temperatūroje, inkubuotos 24 val. chondrogeninėje terpėje. Elektrine stimuliacija kamieninės ląstelės paveiktos būna 5V, 5Hz, pulso trukmė 8 ms ir stimuliuotos 24 val. Kamieninės ląstelės atvyksta išsodintos ant stiklelio, kuris ištraukiamas ir nuplaunamas tirpalu (kuriame yra: (mM) NaCl 150, KCl 5.4, BaCl₂ 10, MgCl₂ 2, gliukozė 11, HEPES 10, jog pH būtų 7.4 koreguota su NaOH) (Heubach et al., 2004), tada naudojamos registravimui. Kai registruojamas nifedipino poveikis, tada papildomai įlašinama nifedipino (10 mM) į tyrimo vonelę. Kamieninės ląstelės yra patalpinamos į tirpalo vonelę (tirpalo sudedamosios dalys kuriuo užpildyta vonelė, tokios pat kaip naudojamos kamieninių ląstelių nuplovimui), ant vonelės dugno ir registruojamos kambario temperatūroje (~21-23°C). Likusios kamieninės ląstelės, kurios laukia registravimo laikomos +37°C.

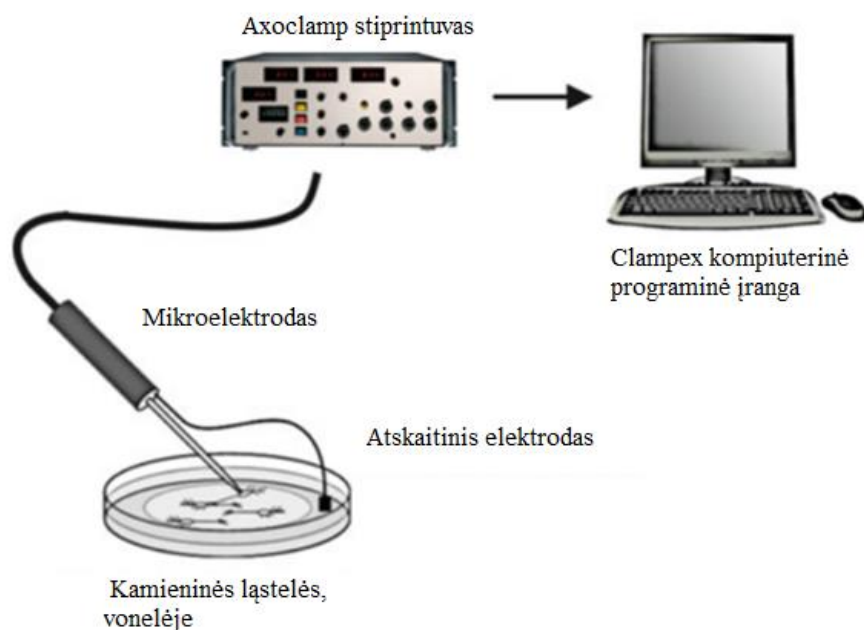
2.3. Registravimas

Elektrofiziologinių savybių nustatymas vyksta kambario temperatūroje (~21-23°C), ląsteles laikant vonelėje su registravimui skirtu tirpalu. Kamieninės ląstelės yra analizuojamos naudojant membranos jonų kanalų elektrinio aktyvumo registravimą (angl. Patch clamp), registruojama visos ląstelės registravimo būdu. Membranos jonų kanalų elektrinio aktyvumo registravimas apibrėžiamas kaip elektrofiziologinis metodas, naudojamas matuoti srovę per jonų kanalus ir ląstelių membranos potencialą. Membranos jonų kanalų elektrinio aktyvavimo registravimo įrašai gaunami, naudojant elektrolitu užpildytą aštrų stiklo mikroelektrodą (Nowotny ir Marra, 2015). Prisijungiant prie ląstelės naudotas stiklinis mikroelektrodas, kuris užpildytas viduląstelių patch mišiniu (kurio sudėtis: (mM) NaCl 8, KCl 40, K aspartatas 100, Tris- GTP 0.1, Mg-ATP 5, CaCl₂ 2, EGTA 5, jog pH būtų 7.3 koreguota su KOH) (Heubach et al., 2004).

Mikroelektrodas (1.5-4.0 M Ω) buvo pagamintas iš borosilikato kapiliaro (World Precision Instruments, Florida, USA) elektrodo ištraukikliu P-1000 (Sutter instruments).

Sidabro-sidabro chlorido elektrodas pritvirtintas kitame kapiliaro gale, užtikrinantis elektrinį tęstinumą pamatiniui elektrodai, įdėtam į tarpląstelinį tirpalą. Lipidinis dvisluoksnis sudarantis ląstelės membraną, susijungia su mikroelektrodu, suformuodamas didelės varžos kontaktą (gigaominį). Norint gauti didelės varžos kontaktą, pipetės gale suformuojamas nedidelis teigiamas slėgis, jog skystis išeitų iš pipetės galiuko ir prisitvirtintų prie membranos vidaus. Kai pipetės galiukas pakankamai užsandarintas su membrana, išleidžiamas teigiamas slėgis. Norint užtikrinti sandarumą, dažnai naudojama nedidelė neigiama srovė, pagerinti sandariklio kokybę, bei palaikoma šiek tiek hiperpolarizuota membrana (Nowotny ir Marra, 2015).

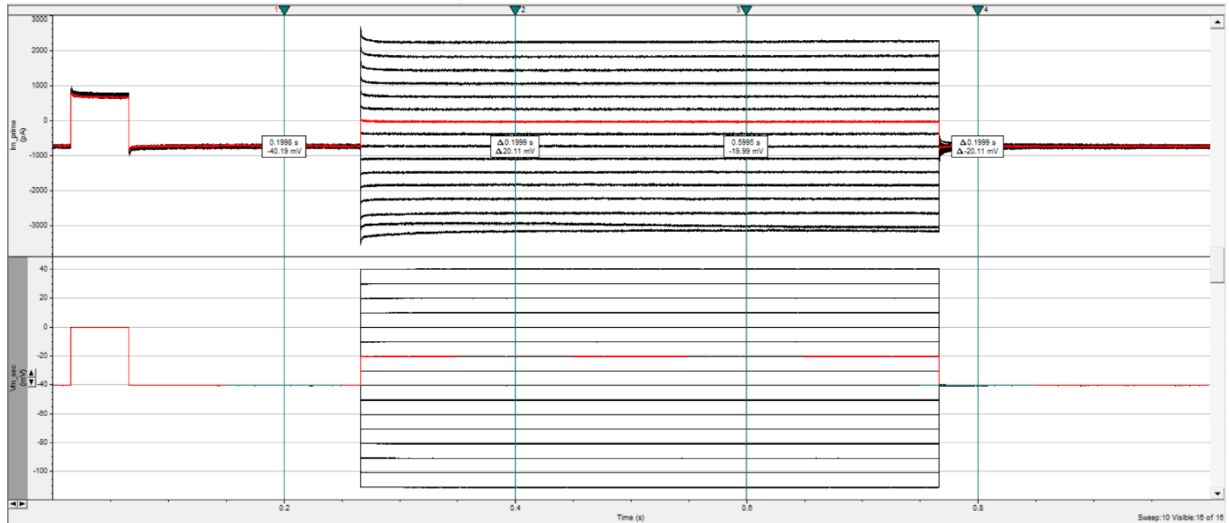
Gavus didelės varžos kontaktą, membranos elektrines savybes galima išmatuoti. Mikromanipulatorius yra naudojamas tiksliai nustatyti pipetės padėtį (Nowotny ir Marra, 2015). Tada signalai siunčiami į stiprintuvą (naudotas Axoclamp 2A arba Axoclamp 2B (Axon Instruments) stiprintuvas), kuris kompensuoja įrašymo artefaktus, filtruoja signalą ir jį sustiprina. Stiprintuvo signalas atstatomas analoginiu-skaitmeniniu keitikliu ir vizualizuojamas, bei saugomas kompiuteryje (Nowotny ir Marra, 2015). Taip pat, mikroelektrodo varža nuolat buvo stebima. Surinkti duomenys buvo vaizduojami ir analizuojami naudojant pCLAMP (Clampfit) programinę įrangą (3 pav.).



3 pav. Membranos joninių kanalų elektrinio aktyvumo registravimo schema. Šaltinis: adaptuota pagal Nowotny ir Marra, 2015.

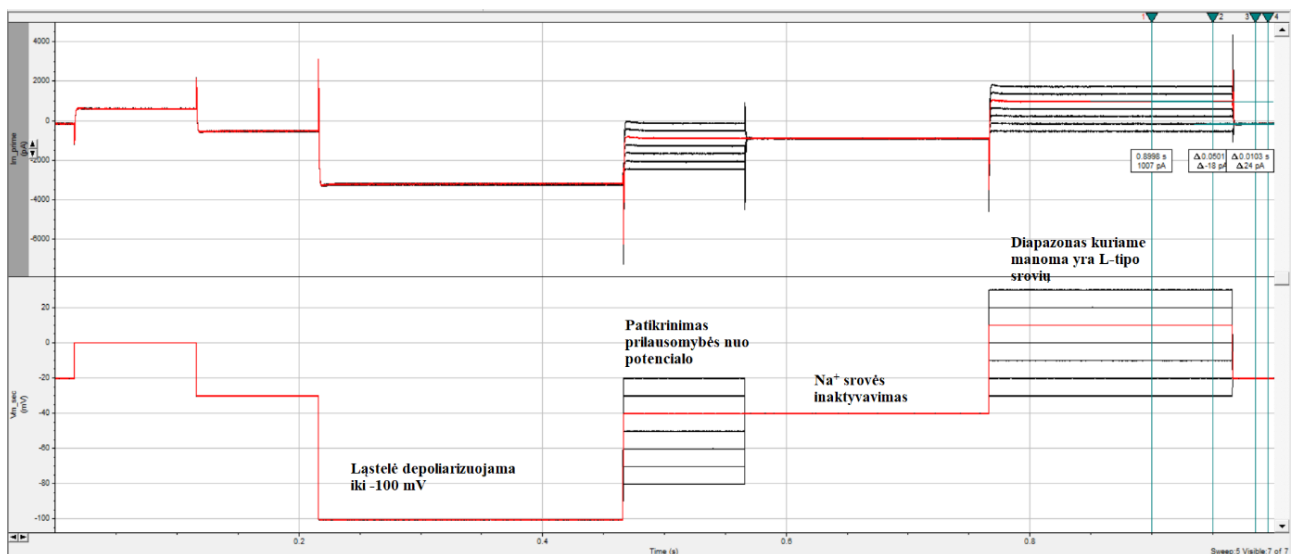
2.4.Naudoti protokolai

Pirmiausia vyksta registravimas visos ląstelės diapazone -110 mV iki +40 mV. (4 pav.)



4 pav. Visos ląstelės registravimas. Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis duomenų peržiūra, naudojant laboratorijoje turimą programą Clampfi.

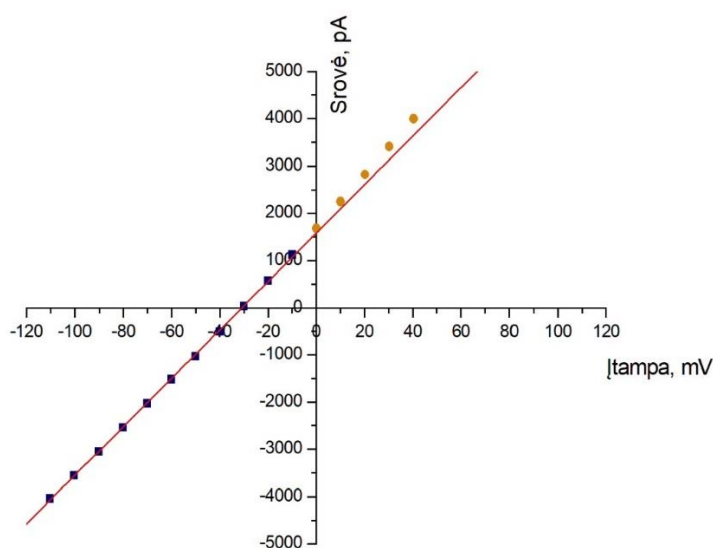
Protokolas kuris naudojamas kanalų registravimui, pirmiausia ląstelė depoliarizuojama iki -100 mV, kad išsijungtų ląstelėje esančios srovės. Toliau padaromi šuoliukai (-20 mV iki -80mV) jog matytųsi priklausomybė potencialo. Tada ląstelė depoliarizuojama iki -40 mV, nes L-tipo Ca^{2+} srovės dar nesiaktyvuoja, bet svarbu, jog Na^+ srovės inaktyvuojamos. Toliau atliekami 10mV įtampos šuoliukai diapazone nuo -30 mV iki 30 mV, kur manoma jog Ca^{2+} srovės veikia. Iš matomų stimulo atsakų, apskaičiavus, bandoma nusakyti ar yra minėtų srovių. Srovių viso registravimo laikas 1000 ms, o L-tipo kanalų diapazono vietoje registravimo trukmė 200ms (5 pav.).



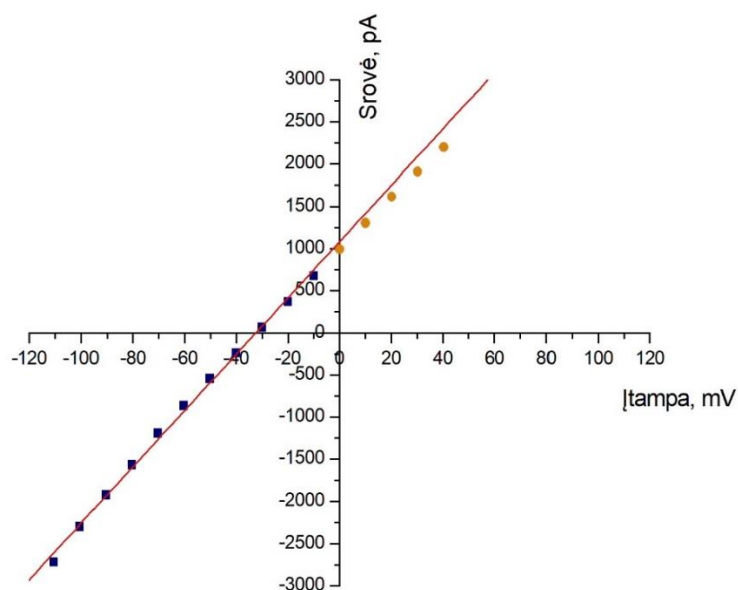
5 pav. Kalcinių srovių registravimas. Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis duomenų peržiūra, naudojant laboratorijoje turimą programą Clampfi.

2.5. Duomenų analizė ir pateikimas

Naudojantis Clampfit programa, pirmiausia buvo analizuojami ląstelės įrašai. Pirmasis protokolai, kurio metu ląstelė stimuliuojama nuo -110 mV iki +40 mV. Gauti duomenys buvo vidurkinami 50 ms, dėl duomenų tikslumo ir sumažinant triukšmus registravimo metu. Iš gautų taškų buvo brėžiama voltamperinė charakteristika (pagal vertes nuo -110 mV iki -10 mV), skaičiuojama varža pagal taškų vertes nuo 0 mV iki 40 mV pagal voltamperinės charakteristikos tiesės ir taškų (0 mV iki 40 mV) padėtį, buvo vertinama ar tai ištekamos (6 pav.) ar įtekančios srovės (7 pav.).

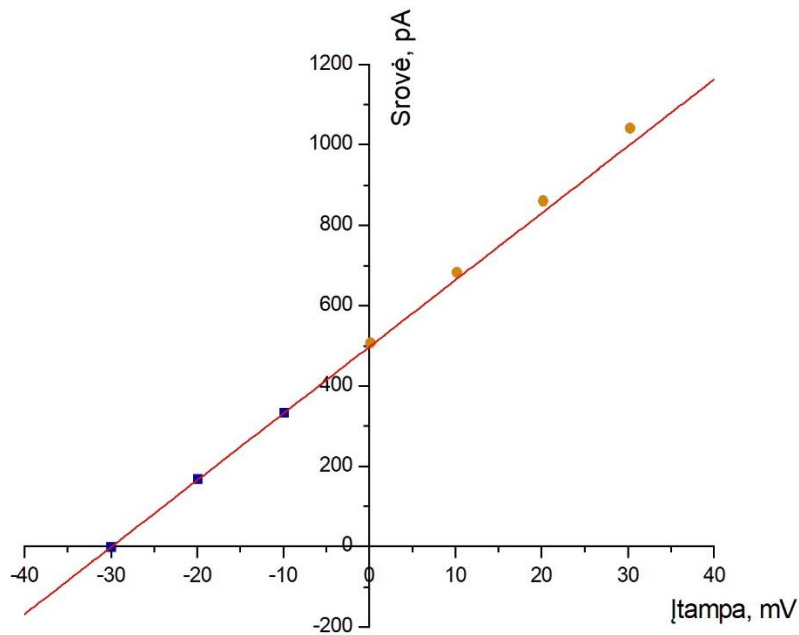


6 pav. Visos ląstelės voltamperinė charakteristika, ištekancios srovės. Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis tyrimo duomenimis.

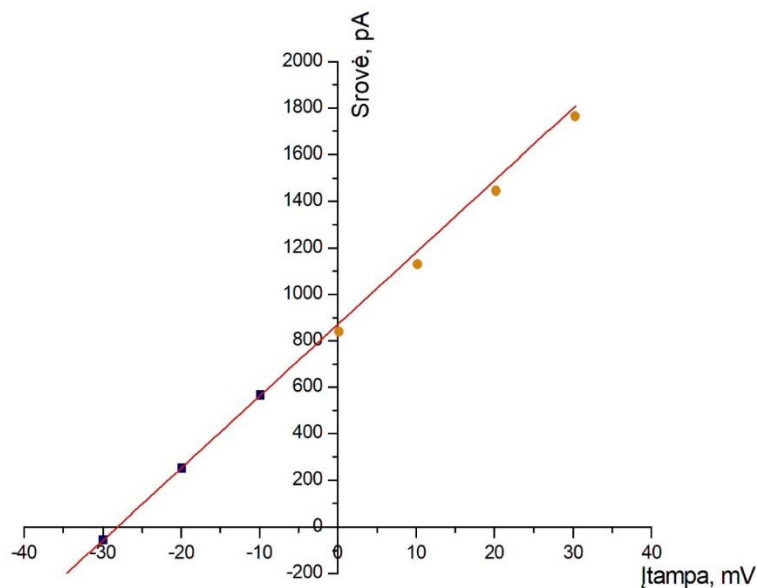


7 pav. Visos ląstelės voltamperinė charakteristika, įtekančios srovės. Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis tyrimo duomenimis.

Tada analogiškai buvo analizuojama registravimas diapazone nuo -30 mV iki 30 mV, kur manoma, jog L-tipo kalcio srovės atsidaro, vidurkinama 50 ms ir iš gautų taškų nuo -30 iki -10 mV brėžiama tiesinė voltamperinė charakteristika. Pagal taškų išsidėstymą nuo 0 mV iki 30 mV, tiesės atžvilgiu buvo įvertinta ar srovės ištekancios (8 pav.) ar įtekančios (9 pav.), paskaičiuojamos srovių vertės, įėjimo varža ir ramybės potencialas.



8 pav. Registruotas diapazonas kur turėtų atsidaryti L-tipo kalcio kanalai, voltamperinė charakteristika, ištekančios srovės. Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis tyrimo duomenimis.



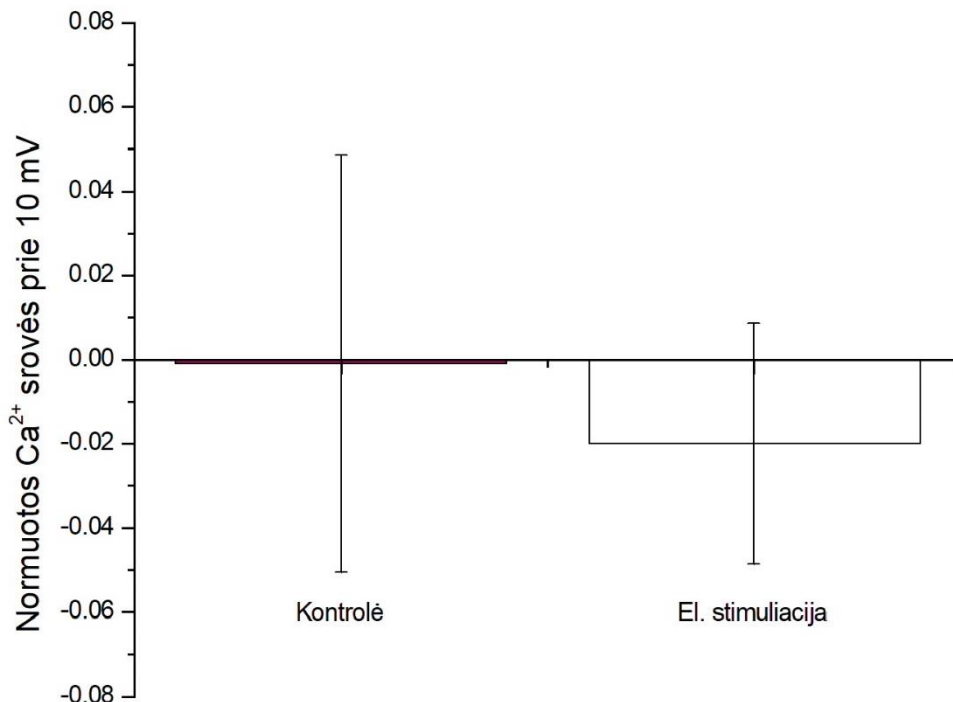
9 pav. Registruotas diapazonas kur turėtų atsidaryti L-tipo kalcio kanalai, voltamperinė charakteristika, įtekančios srovės. Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis tyrimo duomenimis.

Taip pat, toliau analizuojant statistiškai buvo vertinami duomenys naudojant Studento neporinį T-testą, buvo lyginamos kontrolinės ląstelės su paveiktomis elektrinę stimuliacija, TGF-1 β 3, IL-1 β , TGF-1 β 3+nif., ir IL-1 β +nif. T-testas nustato, ar yra reikšmingas skirtumas tarp dviejų grupių vidurkių, kurie susiję panašiomis savybėmis. O analizuojant įėjimo varžą, prie -20 mV ir 10 mV, naudojamas porinis T-testas. Vidurkiai reikšmingai skiriasi, jei $p < 0,05$. Duomenys pateikiami kaip vidurkis \pm standartinis nuokrypis (n = ląstelių kiekis).

3. REZULTATAI

Ląstelių analizė atliekama naudojant kitų tyrėjų užregistruotus įrašus. Darbe nagrinėtos kamieninės ląstelės, kurių įrašai atitinka šiuos kriterijus: tiesinė voltamperinė charakteristika, stabilus registravimo įrašas, nedepoliarizuotos, ramybės potencialas neigiamesnis nei -5 mV. Iš gautų 175 įrašų pagal aukščiau įvardintus kriterijus atrinkta 118 įrašų tinkamu nagrinėti. Visi duomenys buvo vidurkinami 50 ms tikslumu, norint išvengti triukšmų, gauti tikslesnius duomenų rezultatus.

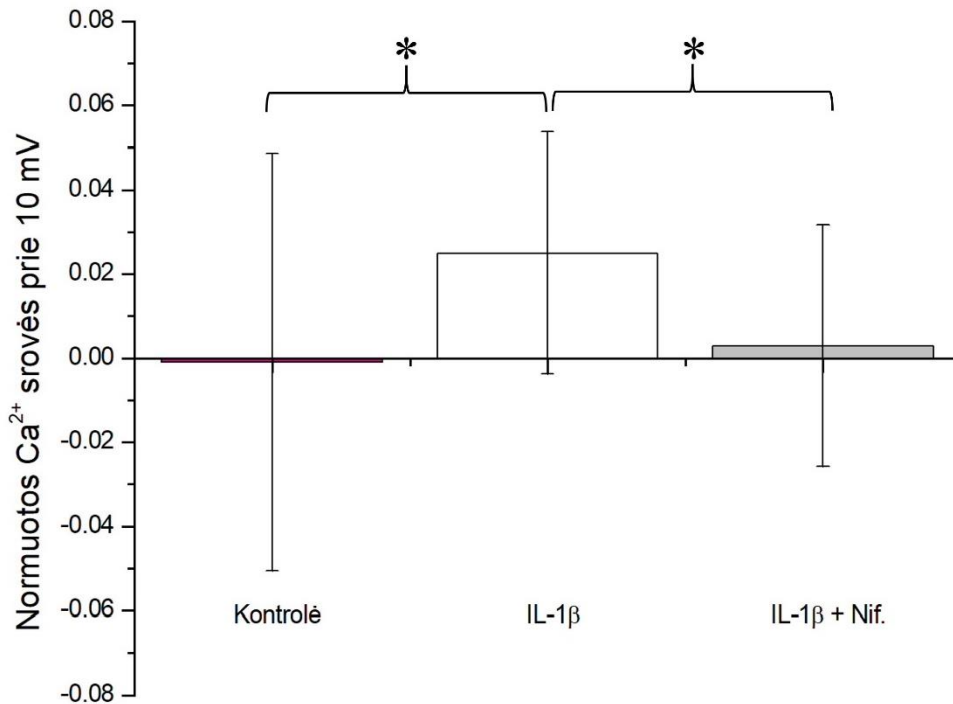
Tyrėme, ar ląstelėse matoma L-tipo įtekanti kalcio srovė. Tam ląstelės buvo stimuliuotos nuo -30 mV iki 30 mV ir registruotas atsakas ties 10 mV. L-tipo kalcio srovę vertinome kaip normuota apskaičiavus pagal voltamperine tiesę ir nuo jos nutolusių taškų atstumą, gautas atstumas parodo srovės vertę, kadangi ląstelės skirtingos srovės suvienodinamos gauta rezultata padalinus iš srovės vertės prie 10 mV. Kontrolinių kamieninių ląstelių normuotos L-tipo kalcio srovės ($n=23$) vidurkis buvo $-0,001 \pm 0,05$ mV. Tyrėme, ar stimuliacija elektros impulsais įtakoja normuota L-tipo kalcio srovę. Gavome, kad po elektrinės stimuliacijos normuota kalcio srovė buvo $-0,20 \pm 0,03$ mV ($n=16$) ir nesiskyrė nuo kontrolinės (10 pav.).



10 pav. Normuotos Ca²⁺ srovės prie 10 mV, kontrolinės ir elektrinę stimuliacija paveiktos.
Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis tyrimo duomenimis.

Tyrėme ar poveikis su IL-1 β įtakoja L-tipo kalcio srovę. Po IL-1 β įtekanti srovė ženkliai padidėjo iki $0,03 \pm 0,03$ mV ($n=21$). Paveikus selektyviu L-tipo kalcio srovės blokatoriumi IL-

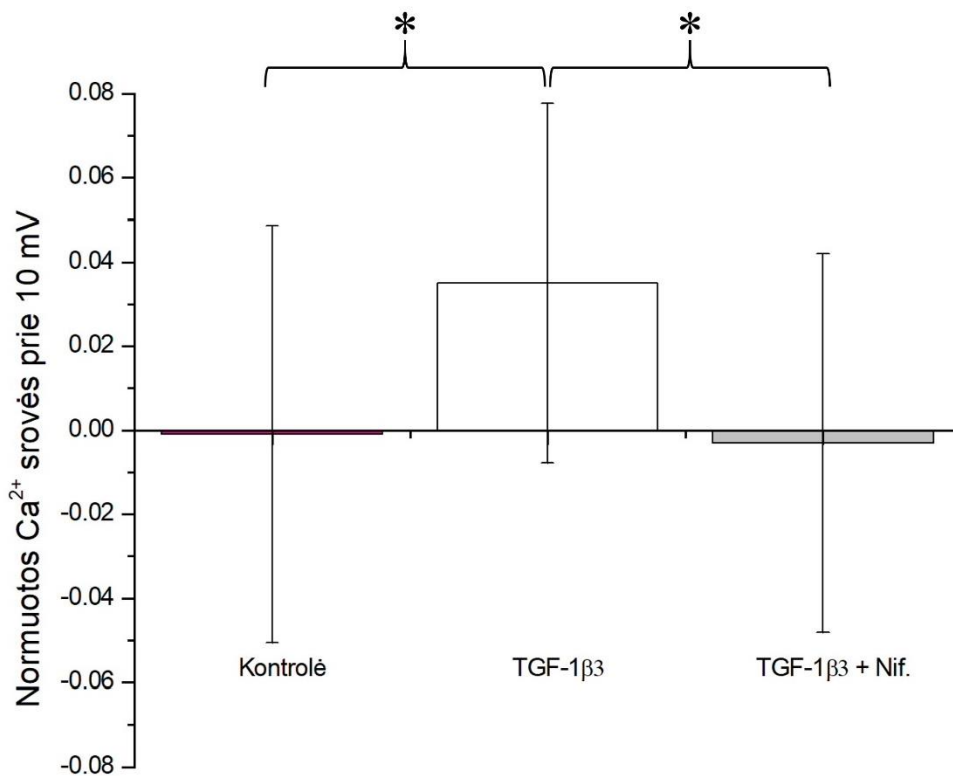
1 β +nif., srovė sumažėjo iki $0,003\pm 0,03$ mV (n=31) (11 pav.). T-testas parodė, kad normuotų Ca²⁺ srovių prie 10 mV vertės buvo teigiamesnės už pradinę (p < 0,05). Galime pastebėti tendencija, jog veikiant IL-1 β pastebima įtekanti L-tipo kalcio srovė, todėl jog tai kalcio kanalų aktyvatorius. O paveikus IL-1 β +nif., skirtumas su ir IL-1 β , srovė smarkiai padidėja, nes nifedipinas žinomas kaip kalcio kanalų blokatorius.



11 pav. Normuotos Ca²⁺ srovės prie 10 mV, kontrolinės, IL-1 β , IL-1 β +nif.

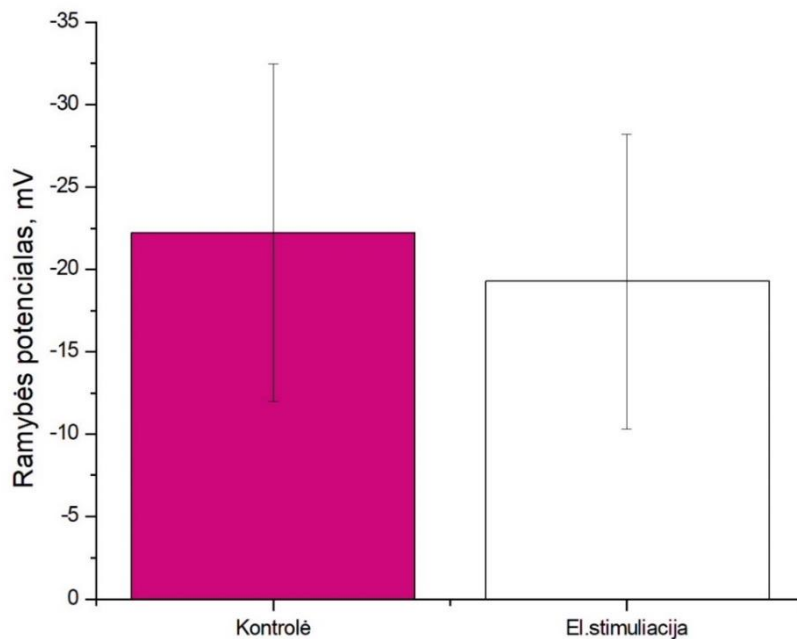
* - p < 0,05 (reikšmingai skiriasi). Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis tyrimo duomenimis.

Tyrėme ar poveikis su TGF-1 β 3 įtakoja L-tipo kalcio srovę. Po TGF-1 β 3 įtekanti srovė ženkliai padidėjo $0,04\pm 0,04$ mV (n=13). Paveikus selektyviu L-tipo kalcio srovės blokatoriumi TGF-1 β 3+nif., srovė sumažėjo iki $0,003\pm 0,05$ mV (n=14) (12 pav.). T-testas parodė, kad normuotų Ca²⁺ srovių prie 10 mV vertės buvo teigiamesnės už pradinę (p < 0,05). Paveikus su TGF-1 β 3 yra L-tipo įtekanti kalcio srovė, dėl to jog naudojamas transformuojanti augimo faktorius, kuris manoma padidina membranoje esančių kanalų kiekį.



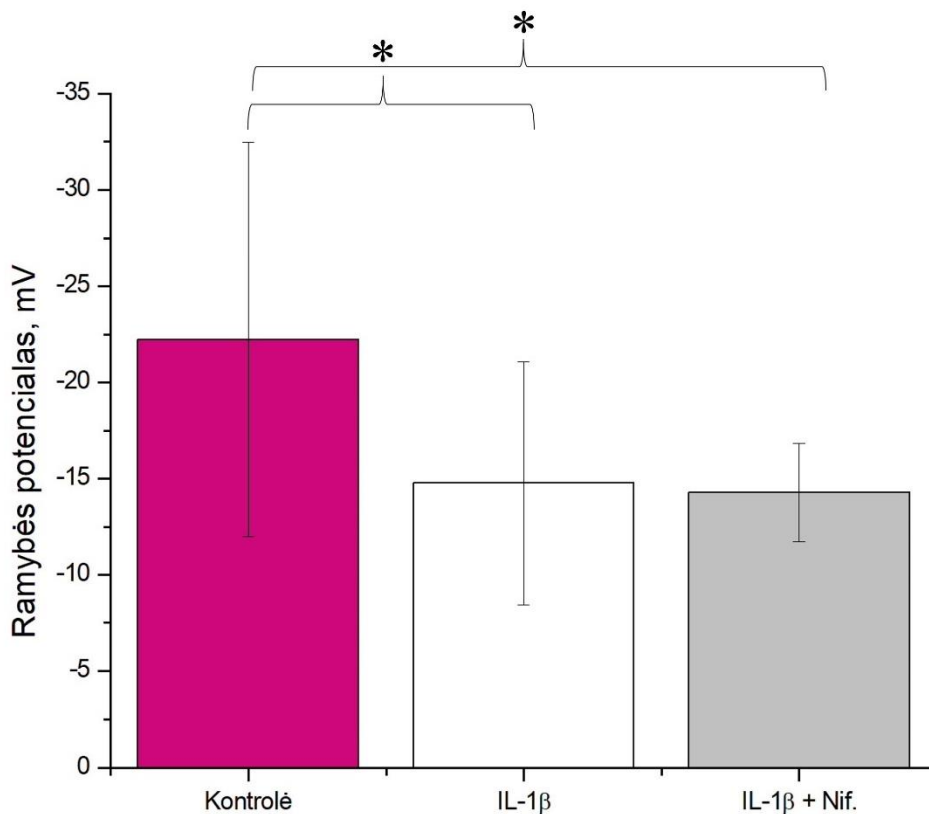
12 pav. Normuotos Ca^{2+} srovės prie 10 mV, kontrolinės, TGF-1 β 3, TGF-1 β 3+nif.
 * - $p < 0,05$ (reikšmingai skiriasi). Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis tyrimo duomenimis.

Toliau tyrėme kontrolinės grupės ir elektros stimuliacija paveiktų ląstelių ramybės potencialą (13 pav.). Vidurkis kontrolinių ląstelių $-22,23 \pm 10,26$ mV elektros stimuliacija paveiktų $-19,28 \pm 8,96$ mV. Gauti duomenys grupių neturi ženklaus skirtumo, todėl galima galvoti, jog elektrinė stimuliacija neturi didelio poveikio ląstelių ramybės potencialui.



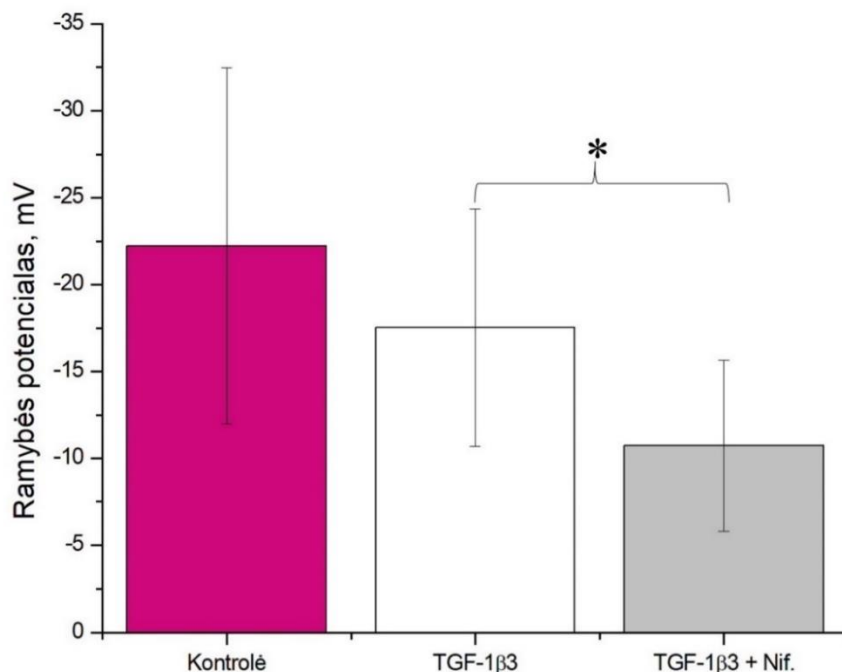
13 pav. Ramybės potencialas kontrolinių ir elektrinė stimuliacija paveiktų ląstelių. Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis tyrimo duomenimis.

Tyrėme ar turėjo įtakos ramybės potencialui paveikimas IL-1 β ir IL-1 β +nif., (14 pav.). Ramybės potencialas gautas paveikus IL-1 β 14,75 \pm 6,31 mV ir su IL-1 β +nif., gautas rezultatas 14,29 \pm 2,56 mV. T-testas parodė, kad ramybės potencialai buvo teigiamesnis už pradinę ($p < 0,05$). Paveikus IL-1 β ir IL-1 β +nif., ramybės potencialai yra panašūs, bet ženkliai skyrėsi nuo kontrolinės grupės.



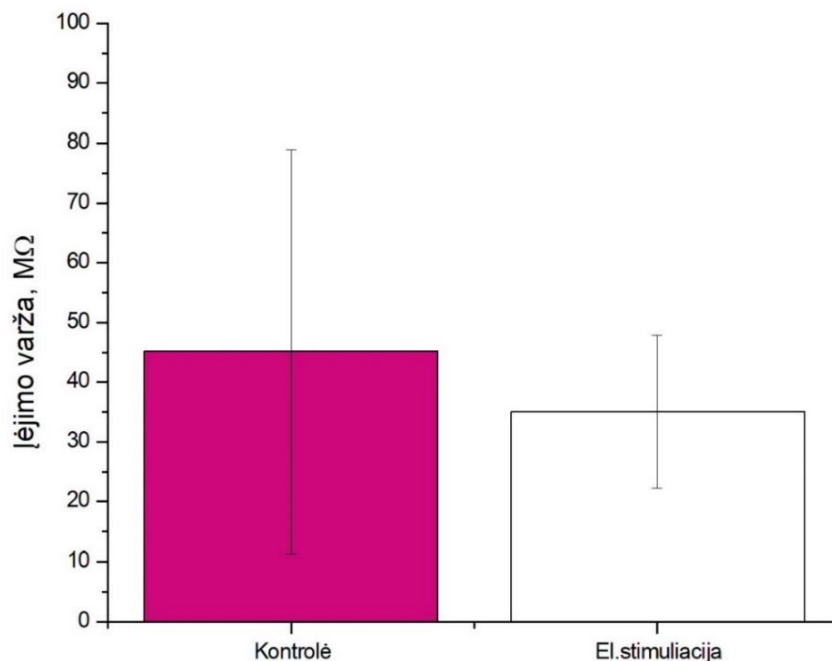
14 pav. Ramybės potencialas IL-1 β ir IL-1 β +nif. * - $p < 0,05$ (reikšmingai skiriasi). Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis tyrimo duomenimis.

Paskutinė grupė kurioje lyginama ramybės potencialas buvo TGF-1 β 3, TGF-1 β 3+nif., (15 pav.). Ramybės potencialo vidurkis TGF-1 β 3 17,52 \pm 6,86 mV, o TGF-1 β 3+nif., 10,72 \pm 4,92 mV. T-testas parodė, kad TGF-1 β 3+nif., ramybės potencialo vertės buvo teigiamesnės už pradinę ($p < 0,05$). Analizuojant poveikį ramybės potencialui pastebėtas ženklus pokytis paveikus kamienines ląsteles TGF-1 β 3, bet dar ženklesnis pokytis pridėjus nifedipino.



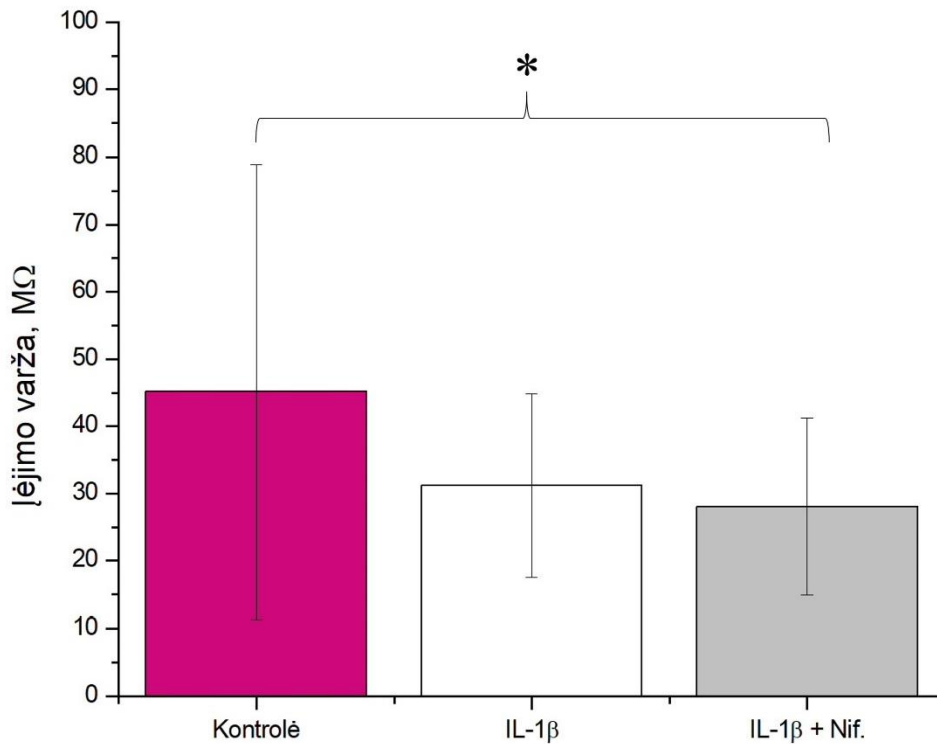
15 pav. Ramybės potencialas TGF-1β3, TGF-1β3+nif. * - $p < 0,05$ (reikšmingai skiriasi). Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis tyrimo duomenimis.

Tęsiant tyrimą, buvo analizuojamos įėjimo varža, kontrolinės grupės ir elektros stimuliacija paveiktų ląstelių (16 pav.). Buvo gauti kontrolinės grupės duomenys $45,13 \pm 33,83 \text{ M}\Omega$, o elektrinės stimuliacijos paveiktų ląstelių įėjimo varža yra mažesnė, nei kontrolinių, tai turētu įtakoti L-tipo įtekančių ląstelių sroves.



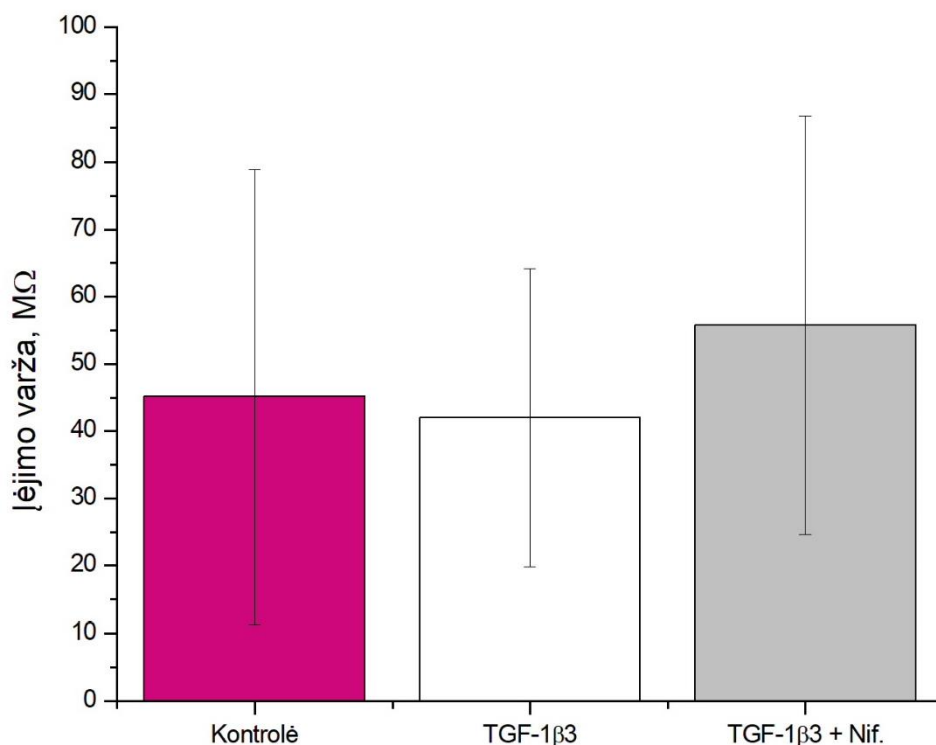
16 pav. Įėjimo varža kontrolinių ir elektrine stimuliacija paveiktų ląstelių. Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis tyrimo duomenimis.

Tirta įėjimo varža buvo IL-1 β 31,16 \pm 13,64 M Ω ir su IL-1 β +nif., gautas rezultatas 28,04 \pm 13,13 mV (17 pav.). T-testas parodė, kad įėjimo varža IL-1 β +nif., mažesnė už kontrolinių ląstelių ($p < 0,05$). Tarp IL-1 β grupės ir IL-1 β +nif., nepastebimas ženklus pokytis įėjimo varžoje, bet ženklus pokytis su kontroline grupe, ko pasekoje turētu šis rezultatas įtakos L-tipo įtekančių kalcio srovių rezultatui.



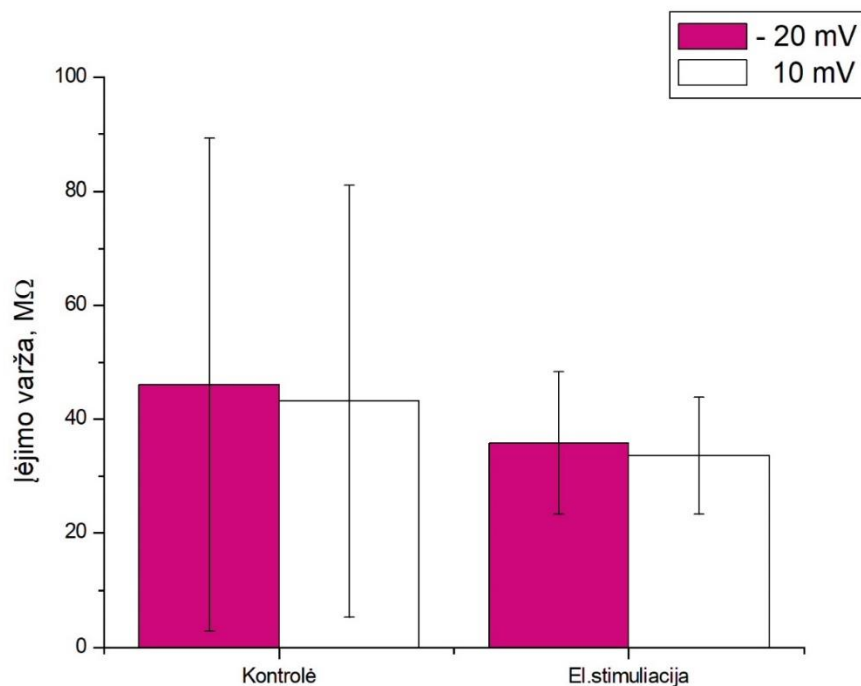
17 pav. Įėjimo varža IL-1 β ir su IL-1 β +nif. . * - $p < 0,05$ (reikšmingai skiriasi). Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis tyrimo duomenimis.

Paskutinė grupė kurioje lyginama įėjimo varža buvo TGF-1 β 3, TGF-1 β 3+nif., (18 pav.). Įėjimo varžos vidurkis TGF-1 β 3 41,95 \pm 22,17 M Ω , o TGF-1 β 3+nif., 55,71 \pm 31,10 M Ω . Ženkliai didesnė įėjimo varža pastebima grupėje su TGF-1 β 3+nif.



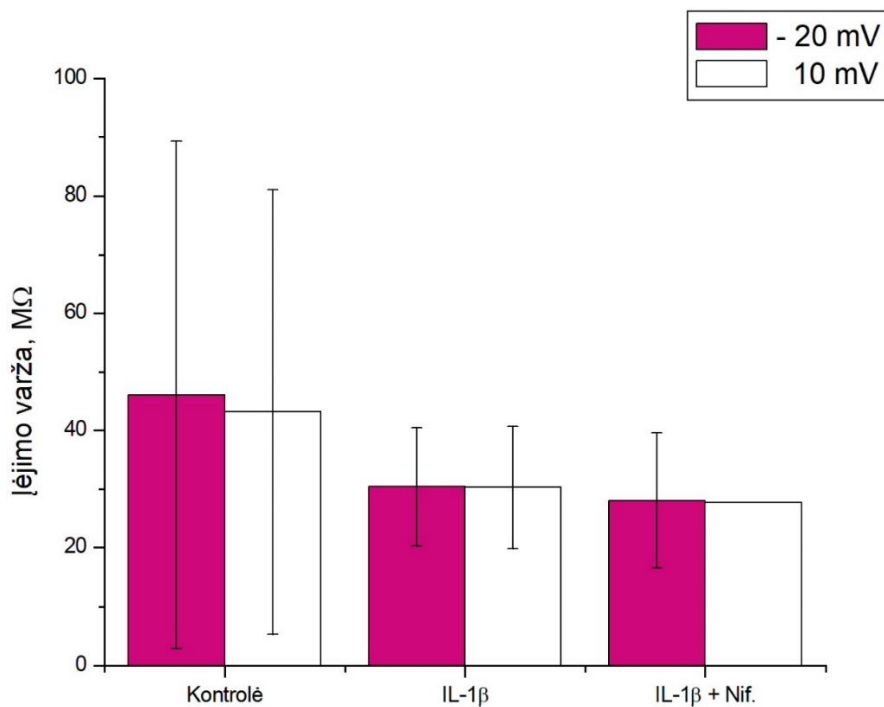
18 pav. Iėjimo varža TGF-1β3, TGF-1β3+nif. Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis tyrimo duomenimis.

Atsidarant L-tipo kalcio kanalams prie depoliarizuotų membranos potencialų, turi mažėti ląstelių įėjimo varža. Tyrėme, ar ir kaip skiriasi ląstelių įėjimo varža ties -20 mV (L-tipo kalcio kanalai uždaryti) ir ties 10 mV (L-tipo kalcio kanalai atidaryti). Pirmoji grupė buvo lyginama kontrolinės ir elektrinę stimuliaciją paveiktos ląstelės (19 pav.). Kontrolinė grupė ties -20 mV 46,05±43,20 MΩ, ties 10 mV 43,22±37,93 MΩ. Elektrine stimuliacija paveiktos ląstelės ties -20 mV buvo 35,82±12,47 MΩ, o prie 10 mV 33,57±10,30 MΩ. Tarp analizuojamų grupių įėjimo varžų ties -20 mV ir 10 mV nepastebimas ženklus pokytis, tai patvirtina pradžioje analizuotas normuotas Ca²⁺ L-tipo įtekančias sroves, jog jų nebuvo rasta, nes nėra žymaus kanalų atsidarymo.



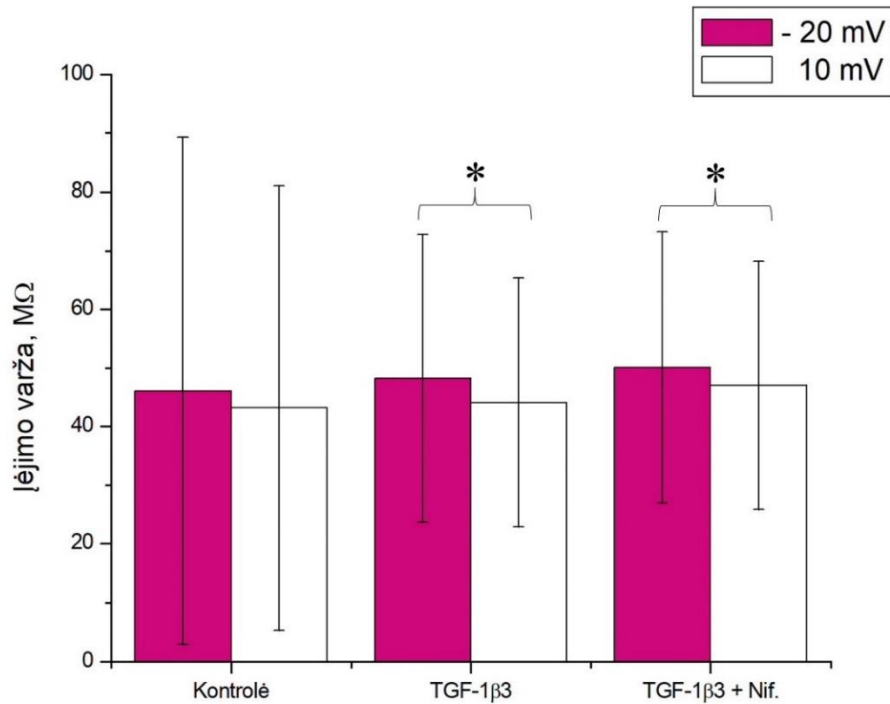
19 pav. Įėjimo varžos prie -20 mV ir 10 mV, kontrolinės ir elektrine stimuliacija paveiktų ląstelių. Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis tyrimo duomenimis.

Toliau buvo lyginama įėjimo varža prie -20 mV ir 10 mV IL-1 β ir IL- β + nif., (20 pav.). IL-1 β grupė ties -20 mV $30,39 \pm 10,11$ M Ω , ties 10 mV $30,27 \pm 10,41$ Ω . O IL-1 β +nif., ties -20 mV buvo $28,04 \pm 11,51$ M Ω , o prie 10 mV $27,68 \pm 11,30$ M Ω . Galime pastebėti, kad IL-1 β ir IL- β + nif., grupėse, nepakito įėjimo varža prie 10 mV.



20 pav. Įėjimo varžos prie -20 mV ir 10 mV, IL-1 β ir IL- β + nif., ląstelių. Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis tyrimo duomenimis.

Paskutinė grupė kurios įėjimo varža prie -20 mV ir 10 mV buvo analizuojama TGF-1β3 ir TGF-1β3+ nif., (21 pav.). TGF-1β3 grupė ties -20 mV $48,18 \pm 24,56 \text{ M}\Omega$, ties 10 mV $44,10 \pm 21,21 \text{ M}\Omega$. O TGF-1β3+nif., ties -20 mV buvo $50,12 \pm 23,15 \text{ M}\Omega$, o prie 10 mV $47,01 \pm 21,21 \text{ M}\Omega$. T-testas parodė, kad TGF-1β3, TGF-1β3+nif., įėjimo varžos ties -20 mV ir 10 mV vertės buvo didesnės už pradinę ($p < 0,05$).



21 pav. Įėjimo varžos prie -20 mV ir 10 mV, TGF-1β3 ir TGF-1β3+ nif., ląstelių.
* - $p < 0,05$ (reikšmingai skiriasi). Šaltinis: sudaryta autoriaus, remiantis tyrimo duomenimis.

TYRIMO REZULTATŲ APTARIMAS

Tyrėme, kaip kamieninių ląstelių chondrogeninė diferenciacija įtakoja elektrofiziologines savybes: L-tipo įtekančias kalcio sroves, ramybės potencialą ir įėjimo varžą. Tyrimo metu buvo analizuotos 7 skirtingos grupės: kontrolinės, paveiktos elektrine stimuliacija, TGF-1 β 3, TGF-1 β 3+nif., IL-1 β , IL-1 β +nif. Gavome, kad L-tipo kalcio normuotai srovei įtakos neturėjo ląstelių elektrine stimuliacija. Įtekanti srovė ženkliai padidėjo paveikus IL-1 β ir TGF-1 β 3. Toliau tyrėme kaip paveikiamas ląstelių ramybės potencialas. Gauti duomenys parodė, kad ženklaus poveikio nepastebime paveikus tik elektrine stimuliacija. Tirta buvo įėjimo varžos poveikis, gauti žymūs poveikiai su IL-1 β , IL-1 β +nif., TGF-1 β 3 ir TGF-1 β 3+nif. Buvo lyginami įėjimo varžos pokyčiai prie -20 mV ir 10 mV. Gavome, kad ženklūs pokyčiai pastebimi tarp TGF-1 β 3 ir TGF-1 β 3+nif.

Analizuojant kontrolinę grupę kamieninių ląstelių, L-tipo kalcinių įtekančių srovių nepastebėta. Tyrime gauti rezultatai atitinka su mokslininkų (Kawano et al., 2002)(Kawano et al., 2003) gautais rezultatais. Autorius teigia, kad ląstelės kalcio reguliavimas žmogaus mezenchiminių kamieninių ląstelių priklauso nuo kelių mechanizmų, o įtampa valdomi kalcio kanalai nelabai prisideda. Kawano ir kt., (2002) publikavo, kad tik 15% hMSC parodė nedidelę L-tipo kalcinių kanalų jautrumą esant didelei išorinei kalcio koncentracijai. Taip pat, Heubach ir kt., (2004) publikacijoje teigė, kad elektrofiziologiniai stebėjimai patvirtino žema hMSC dažnį funkcinį L-tipo kalcio kanalų.

Elektrinė stimuliacija naudojama, kad sužadintu ląstelės membranos receptorius ir jonų kanalus, kad paskatintu depoliarizacija, hiperpoliarizacija, ląstelių augimą dalijimosi būdu, migracija ir diferenciacija (Sato et al., 2009). Tyrime, elektrine stimuliacija paveiktų kamieninių ląstelių L-tipo kalcio įtekančių srovių – nepastebėta. Cao ir kt., (2019) tyrime nustatė, kad elektrinės stimuliacijos poveikis turėjo mažai įtakos tiek N-tipo, tiek L-tipo aukštos įtampos kalcio kanalams.

TGF- β 1–3 yra unikalūs daugiafunkciniai augimo faktoriai, nes jų yra tik žinduoliuose, daugiausia išskiriami kaip latentinis kompleksas ir iškart laikomi tarpląstelinėje matricoje. TGF- β kompleksas veikia kaip molekulinis jutiklis, kuris reaguoja į aplinkos trikdžius, skatindamas arba slopindamas ląstelių dauginimąsi, TGF- β aktyvinimas tinkamoje vietoje, kad kamieninės ląstelės būtų įdarbintos dalyvauti audinių regeneracijos procese (Xu et al., 2018). Tyrimo metu, kamieninės ląstelės kurios buvo paveiktos transformuojančiu augimo faktoriumi, turėjo įtekančia normuota L-tipo kalcio srovę.

Uždegiminius citokinas IL-1 β svarbus mezenchiminių kamieninių ląstelių migracijoje, IL-1 β sustiprina kamieninių ląstelių migraciją, tačiau neveikia ląstelių dauginimosi. Kai kurie tyrimai parodė, kad IL-1 β gali suaktyvinti baltymų kinazių kaskadas pasrovyje, o tai lemia uždegiminių baltymų ekspresiją (Tseng et al., 2013). Autorius Chen ir kt., (2018) nustatė, kad 100 ng/ml IL-1 β padidino kamieninių ląstelių migraciją. Tyrime, kamieninėse ląstelėse su interleukinu-1 β , pastebėta padidėjusios L-tipo įtekančios kalcinės srovės. Yang ir kt., (2005) ištyrė, kad 10 ng/ml IL-1 β žymiai padidina nuo įtampos priklausančios Ca²⁺ amplitudę ir dėl to atsiranda L-tipo srovės padidėjimas.

Tyrime, paveikus kamienines ląsteles IL-1 β ir TGF-1 β 3 buvo užregistruotos įtekančios kalcio srovės, bet paveikus jas kartu su nifedipinu (IL-1 β +nif., TGF-1 β 3+nif.) srovės buvo užblokuotos, tai patvirtino, kad tai yra L-tipo kalcio srovės. Nifedipinas yra kalcinių kanalų blokatorius. Zhou ir kt., (2006) norėdami iširti IL-1 β poveikį įtampos valdomiems kalcio kanalams, užregistravo Ca²⁺ sroves, kai L-tipo kanalus selektyviai blokavo 10 μ M nifedipinas, nustatė, kad nifedipinui nejautrios Ca²⁺ srovės IL-1 β sumažėjo apie 50%. Taip pat Mukherjee ir kt., (2015) mokslininkai tyrė L-tipo Ca²⁺ kanalams poveikį paveikdami 1 nM TGF-1 β , paveikiant 1 μ M nifedipino ir nustatė, kad paveikimas nifedipinu žymiai sumažino TGF-1 β Ca²⁺ svyravimų dydį ir dažnį.

Toliau analizuotas ramybės potencialas. Didžiausias kamieninių ląstelių registravimo metu ramybės potencialas išreikštas kontrolinėje grupėje (-22.23 mV), mažiausias skirtumas pastebėtas su elektrine stimuliacija paveiktų ląstelių grupe (-19.28 mV). L-tipo kanalams reikalinga didelė potencialo depoliarizacija, kad jie būtų suaktyvinti, paprastai pradeda kanalai atsiverti esant potencialams teigemesniems nei 0-10 mV (Snutch et al., 2013). Todėl eksperimento metu, galima pastebėti jog paveikimas IL-1 β , IL-1 β +Nif., neturėjo jokio skirtumo ramybės potencialui, bet TGF-1 β 3 pastebėtas aukštesnis ramybės potencialas nei TGF-1 β 3+Nif.

Analizuojant įėjimo varžos gautus duomenis grupėse, didžiausia įėjimo varža pasižymėjo TGF-1 β 3+Nif., o toliau dominavo kontrolinė grupė. Kalcio kanalų aktyvavimas turėtų būti susijęs su varžos pokyčiais, kanalams atsidarant įėjimo varža turėtų mažėti. Kadangi, L-tipo įtekančių srovių nepastebėja kontrolinėje ir elektrinę stimuliacija paveiktų kamieninių ląstelių grupėje, todėl ir analizuojant vidinę varžą prie -20 mV ir 10 mV įtampos didelio kritimo nepastebėta. Tarp IL-1 β ir IL-1 β +Nif., varžos pokyčiai vienodi.

Norit pagerinti tyrimą, reikėtų surinkti platesnę imtį (n) kamieninių ląstelių. Didesnė imtis duotų tikslesnius rezultatus. Tiriamų grupių imtis buvo skirtingų dydžių, tai davė mažesnę tikslumą.

IŠVADOS

1. Kamieninių ląstelių stimuliacija elektriniais impulsais neskatina funkcionalių L-tipo kalcio kanalų ekspresijos, nekeičia ląstelių ramybės potencialo bei varžos.
2. Veikiant kamienines ląsteles chondrogenine terpe su IL-1 β 24 val. padidėja funkcionalių L-tipo kalcio kanalų ekspresija, depoliarizuojasi membranos potencialas, tačiau nėra poveikio įėjimo varžai.
3. Veikiant kamienines ląsteles chondrogenine terpe su TGF-1 β 3 24 val. padidėja funkcionalių L-tipo kalcio kanalų ekspresija, tačiau nesikeičia membranos potencialas bei įėjimo varža.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS
BIOMOKSLŲ INSTITUTAS

Jogilė Mačytė

Magistro baigiamasis darbas

**KAMIENINIŲ LĄSTELIŲ ELEKTROFIZIOLOGINIŲ SAVYBIŲ
TYRIMAS**

SANTRAUKA

Žmogaus kaulų čiulpų kamieninės ląstelės turi galimybę plačiai diferencijuotis. Vis daugėja tyrimų, atliekamų su kamieninėmis ląstelėmis, kurios siekiamos panaudoti gydymo tikslams. Jonų kanalai yra ekspresuojami skirtingų tipų ląstelėse, jie svarbūs palaikant fiziologinę homeostazę.

Šio tyrimo tikslas buvo išsiaiškinti ar diferencijuojantis kamieninėse ląstelėse padaugėja funkcionalių L-tipo kalcio kanalų. Darbo uždaviniai buvo įvertinti ar paveikus kamienines ląstelės transformuojančiu augimo faktoriumi-1 β 3, interleukinu-1 β ir elektrine stimuliacija, ar tai turės įtakos L-tipo kalcio kanalų ekspresijai, nepakeis ląstelių ramybės potencialo ir varžos. Tyrimui atlikti buvo naudojama membranos jonų kanalų elektrinio aktyvumo registravimas.

Gauta, jog L-tipo įtekančios kalcio srovės kontrolinėse ląstelėse nepastebėtos. Paveikimas elektrine stimuliacija neskatina L-tipo įtekančių kalcio srovių, nepakeičia ląstelių ramybės potencialo ir varžos. Kai ląstelės buvo veikiamos transformuojamu augimo faktoriumi-1 β 3, tai padidino L-tipo kalcio kanalų ekspresiją, bet nepasikeitė membranos potencialo ir neturėjo poveikio įėjimo varžai. Poveikis su interleukinu-1 β padidino L-tipo kalcio kanalų ekspresiją, taip pat depoliarizavo membranos potencialą, bet poveikio įėjimo varžai neturėjo.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTRE
INSTITUTE OF BIOSCIENCES

Jogilė Mačytė

Master thesis

**INVESTIGATION OF ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF STEM
CELLS**

SUMMARY

Human bone marrow stem cells have the ability to differentiate into a variety of cells. This feature of stem cells has potential in regenerative medicine. Ion channels are important in maintaining homeostasis and are differently expressed in a variety of cells.

The aim of this study was to find if the expression of functional L-type Calcium channels changes during differentiation of stem cells. This included study the effects of Transforming Growth Factor-1 β 3, Intetrleukin-1 β , and electrical stimulation on L-type Calcium channel expression, cell resting membrane potential and input resistance. The method of whole-cell patch –clamp recordings from stem cells was used.

We found that inward L-type Calcium currents are not present in the control stem cells. Electrical stimulation of stem cells does not result in L-type Calcium currents or changes in cell membrane potential and input resistance. Cells affected by Transforming Growth Factor-1 β 3 showed increase in L-type Calcium channel expression without changes in membrane potential or input resistance. Intetrleukin-1 β treatment also increased L-type Calcium channel expression and caused membrane potential depolarization without affecting the input resistance.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Akdis, M., Burgler, S., Cramer, R., Eiwegger, T., Fujita, H., Gomez, E., Klunker, S., Meyer, N., O'Mahony, L., Palomares, O., Rhyner, C., Quaked, N., Schaffartzik, A., Van De Veen, W., Zeller, S., Zimmermann, M., Akdis, C.A., 2011. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 127, 701-721.e70. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.11.050>
- Arias, A.M., 2008. *Drosophila melanogaster* and the Development of Biology in the 20th Century, in: Dahmann, C. (Ed.), *Drosophila, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 1–25. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-583-1_1
- Berger, I., Ahmad, A., Bansal, A., Kapoor, T., Sipp, D., Rasko, J.E.J., 2016. Global Distribution of Businesses Marketing Stem Cell-Based Interventions. *Cell Stem Cell* 19, 158–162. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.015>
- Bezanilla, F., 2008. Ion Channels: From Conductance to Structure. *Neuron* 60, 456–468. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.035>
- Bhavsar, M.B., Cato, G., Hauschild, A., Leppik, L., Costa Oliveira, K.M., Eischen-Loges, M.J., Barker, J.H., 2019. Membrane potential (V_{mem}) measurements during mesenchymal stem cell (MSC) proliferation and osteogenic differentiation. *PeerJ* 7, e6341. <https://doi.org/10.7717/peerj.6341>
- Blobel, G.C., Schiemann, W.P., Lodish, H.F., 2000. Role of transforming growth factor β in human disease. *N. Engl. J. Med.* 9. 4;342(18):1350-8. doi: 10.1056/NEJM200005043421807
- Bodi, I., Mikala, G., Koch, S.E., Akhter, S.A., Schwartz, A., 2005. The L-type calcium channel in the heart: the beat goes on. *J. Clin. Invest.* 115, 3306–3317. <https://doi.org/10.1172/JCI27167>
- Cao, J., Zhang, Y., Wu, L., Shan, L., Sun, Y., Jiang, X., Tao, J., 2019. Electrical stimulation of the superior sagittal sinus suppresses A-type K^+ currents and increases P/Q- and T-type Ca^{2+} currents in rat trigeminal ganglion neurons. *J. Headache Pain* 20, 87. <https://doi.org/10.1186/s10194-019-1037-5>
- Chen, C., Bai, X., Ding, Y., Lee, I.-S., 2019. Electrical stimulation as a novel tool for regulating cell behavior in tissue engineering. *Biomater. Res.* 23, 25. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0176-8>

- Chen, M.-S., Lin, C.-Y., Chiu, Y.-H., Chen, C.-P., Tsai, P.-J., Wang, H.-S., 2018. IL-1 β -Induced Matrix Metalloprotease-1 Promotes Mesenchymal Stem Cell Migration via PAR1 and G-Protein-Coupled Signaling Pathway. *Stem Cells Int.* 2018, e3524759. <https://doi.org/10.1155/2018/3524759>
- Dennis, J.E., Carbillet, J.-P., Caplan, A.I., Charbord, P., 2002. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* 170, 73–82. <https://doi.org/10.1159/000046182>
- Dinarello, C., Arend, W., Sims, J., Smith, D., Blumberg, H., O’Neill, L., Goldbach-Mansky, R., Pizarro, T., Hoffman, H., Bufler, P., Nold, M., Ghezzi, P., Mantovani, A., Garlanda, C., Boraschi, D., Rubartelli, A., Netea, M., van der Meer, J., Joosten, L., Mandrup-Poulsen, T., Donath, M., Lewis, E., Pfeilschifter, J., Martin, M., Kracht, M., Muehl, H., Novick, D., Lukic, M., Conti, B., Solinger, A., Kelk, P., van de Veerdonk, F., Gabel, C., 2010. IL-1 family nomenclature. *Nat. Immunol.* 11, 973–973. <https://doi.org/10.1038/ni1110-973>
- Ding, D.-C., Shyu, W.-C., Lin, S.-Z., 2011. Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant.* 20, 5–14. <https://doi.org/10.3727/096368910X>
- Dolphin, A.C., 2016. Voltage-gated calcium channels and their auxiliary subunits: physiology and pathophysiology and pharmacology. *J. Physiol.* 594, 5369–5390. <https://doi.org/10.1113/JP272262>
- Dolphin, A.C., 2013. The $\alpha 2\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 1541–1549. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2012.11.019>
- Fairbairn, N.G., 2015. Augmenting peripheral nerve regeneration using stem cells: A review of current opinion. *World J. Stem Cells* 7, 11. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i1.11>
- Feng, T., Kalyaanamoorthy, S., Barakat, K., 2018. L-Type Calcium Channels: Structure and Functions, in: Shad, K.F. (Ed.), *Ion Channels in Health and Sickness*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.77305>
- Fu, Y.-C., Lin, C.-C., Chang, J.-K., Chen, C.-H., Tai, I.-C., Wang, G.-J., Ho, M.-L., 2014. A Novel Single Pulsed Electromagnetic Field Stimulates Osteogenesis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and Bone Repair. *PLOS ONE* 9, e91581. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091581>

- Heng, W., Bhavsar, M., Han, Z., Barker, J.H., 2020. Effects of Electrical Stimulation on Stem Cells. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 15, 441–448. <https://doi.org/10.2174/1574888X15666200129154747>
- Hess, P., Lansman, J.B., Tsien, R.W., 1984. Different modes of Ca channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature* 311, 538–544. <https://doi.org/10.1038/311538a0>
- Heubach, J.F., Graf, E.M., Leutheuser, J., Bock, M., Balana, B., Zahanich, I., Christ, T., Boxberger, S., Wettwer, E., Ravens, U., 2004. Electrophysiological properties of human mesenchymal stem cells: Electrophysiology of human mesenchymal stem cells. *J. Physiol.* 554, 659–672. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.055806>
- Horrigan, F.T., Aldrich, R.W., 2002. Coupling between Voltage Sensor Activation, Ca²⁺ Binding and Channel Opening in Large Conductance (BK) Potassium Channels. *J. Gen. Physiol.* 120, 267–305. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028605>
- Hucho, F., Weise, C., 2001. Ligand-Gated Ion Channels. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40, 3100–3116. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010903\)40:17<3100::AID-ANIE3100>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010903)40:17<3100::AID-ANIE3100>3.0.CO;2-A)
- Jaenisch, R., Young, R., 2008. Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell* 132, 567–582. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.015>
- Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T., Morikawa, S., Masumoto, J., 2019. The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm. Regen.* 39, 12. <https://doi.org/10.1186/s41232-019-0101-5>
- Kawano, S., Otsu, K., Shoji, S., Yamagata, K., Hiraoka, M., 2003. Ca²⁺ oscillations regulated by Na⁺ + –Ca²⁺ exchanger and plasma membrane Ca²⁺ pump induce fluctuations of membrane currents and potentials in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* 34, 145–156. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(03\)00069-1](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(03)00069-1)
- Kawano, S., Shoji, S., Ichinose, S., Yamagata, K., Tagami, M., Hiraoka, M., 2002. Characterization of Ca²⁺ signaling pathways in human mesenchymal stem cells. *Cell Calcium* 32, 165–174. <https://doi.org/10.1016/S0143416002001240>
- Kumar, R., Sharma, A., Pattnaik, A., Varadwaj, P., 2010. Stem cells: An overview with respect to cardiovascular and renal disease. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 1, 43. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.71674>

- Lachman, L.B., Hacker, M.P., Handschumacher, R.E., 1977. Partial purification of human lymphocyte-activating factor (LAF) by ultrafiltration and electrophoretic techniques. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 119, 2019–2023.
- Lajtha, L.G., 1979. Stem Cell Concepts. *Differentiation* 14, 23–33. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.1979.tb01007.x>
- Leppik, L., Oliveira, K.M.C., Bhavsar, M.B., Barker, J.H., 2020. Electrical stimulation in bone tissue engineering treatments. *Eur. J. Trauma Emerg. Surg.* 46, 231–244. <https://doi.org/10.1007/s00068-020-01324-1>
- Li, G.-R., Deng, X.-L., 2011. Functional ion channels in stem cells. *World J. Stem Cells* 3, 19–24. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v3.i3.19>
- Li, G.-R., Sun, H., Deng, X., Lau, C.-P., 2005. Characterization of Ionic Currents in Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow. *STEM CELLS* 23, 371–382. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0213>
- Li, J.-R., Qu, T.-T., 2017. Into the eyes of bone marrow-derived mesenchymal stem cells therapy for myocardial infarction and other diseases. *Stem Cell Investig.* 4. <https://doi.org/10.21037/sci.2017.08.01>
- Li, L., Xie, T., 2005. Stem cell niche: Structure and Function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 605–631. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131525>
- Mukherjee, S., A. Ayaub, E., Murphy, J., Lu, C., Kolb, M., Ask, K., J. Janssen, L., 2015. Disruption of Calcium Signaling in Fibroblasts and Attenuation of Bleomycin-Induced Fibrosis by Nifedipine. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 53, 450–458. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0009OC>
- Nowotny, T., Marra, V., 2015. Patch Clamp Technique, in: Jaeger, D., Jung, R. (Eds.), *Encyclopedia of Computational Neuroscience*. Springer, New York, NY, pp. 2223–2226. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6675-8_133
- Nuccitelli, R., Lui, K., Kreis, M., Athos, B., Nuccitelli, P., 2013. Nanosecond pulsed electric field stimulation of reactive oxygen species in human pancreatic cancer cells is Ca²⁺-dependent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 435, 580–585. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.014>
- Prakash, P., Hancock, J.F., Gorfe, A.A., 2015. Binding hotspots on K-ras: Consensus ligand binding sites and other reactive regions from probe-based molecular dynamics

- analysis: Consensus Ligand Binding Sites on Ras. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 83, 898–909. <https://doi.org/10.1002/prot.24786>
- Samadian, H., Zakariaee, S.S., Adabi, M., Mobasheri, H., Azami, M., Faridi-Majidi, R., 2016. Effective parameters on conductivity of mineralized carbon nanofibers: an investigation using artificial neural networks. *RSC Adv.* 6, 111908–111918. <https://doi.org/10.1039/C6RA21596C>
 - Sato, M.J., Kuwayama, H., van Egmond, W.N., Takayama, A.L.K., Takagi, H., van Haastert, P.J.M., Yanagida, T., Ueda, M., 2009. Switching direction in electric-signal-induced cell migration by cyclic guanosine monophosphate and phosphatidylinositol signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 6667–6672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809974106>
 - Snutch, T.P., Peloquin, J., Mathews, E., McRory, J.E., 2013. Molecular Properties of Voltage-Gated Calcium Channels, Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Landes Bioscience.
 - Sorkin, E.M., Clissold, S.P., Brogden, R.N., 1985. Nifedipine. *Drugs* 30, 182–274. <https://doi.org/10.2165/00003495-198530030-00002>
 - Taipale, J., Saharinen, J., Keski-Oja, J., 1998. Extracellular matrix-associated transforming growth factor-beta: role in cancer cell growth and invasion. *Adv. Cancer Res.* 75, 87–134. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60740-x](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60740-x)
 - Tan, Y., Fei, D., He, X., Dai, J., Xu, R., Xu, X., Wu, J., Li, B., 2019. L-type voltage-gated calcium channels in stem cells and tissue engineering. *Cell Prolif.* 52. <https://doi.org/10.1111/cpr.12623>
 - Tang, L., Gamal El-Din, T.M., Payandeh, J., Martinez, G.Q., Heard, T.M., Scheuer, T., Zheng, N., Catterall, W.A., 2014. Structural basis for Ca²⁺ selectivity of a voltage-gated calcium channel. *Nature* 505, 56–61. <https://doi.org/10.1038/nature12775>
 - Tseng, H.-C., Lee, I.-T., Lin, C.-C., Chi, P.-L., Cheng, S.-E., Shih, R.-H., Hsiao, L.-D., Yang, C.-M., 2013. IL-1 β Promotes Corneal Epithelial Cell Migration by Increasing MMP-9 Expression through NF- κ B- and AP-1-Dependent Pathways. *PLoS ONE* 8, e57955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057955>
 - Watt, F.M., Driskell, R.R., 2010. The therapeutic potential of stem cells. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 155–163. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0149>

- Wright, S.H., 2004. Generation of resting membrane potential. *Adv. Physiol. Educ.* 28, 139–142. <https://doi.org/10.1152/advan.00029.2004>
- Xu, L., Sun, L., Xie, L., Mou, S., Zhang, D., Zhu, J., Xu, P., 2021. Advances in L-Type Calcium Channel Structures, Functions and Molecular Modeling. *Curr. Med. Chem.* 28, 514–524. <https://doi.org/10.2174/0929867327666200714154059>
- Xu, X., Zheng, L., Yuan, Q., Zhen, G., Crane, J.L., Zhou, X., Cao, X., 2018. Transforming growth factor- β in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Res.* 6, 2. <https://doi.org/10.1038/s41413-017-0005-4>
- Yang, J.-L., Friedlander, M.L., 2001. Effect of nifedipine in metastatic colon cancer with DNA mismatch repair gene defect. *The Lancet* 357, 1767–1768. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04892-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04892-3)
- Yang, S., Liu, Z.-W., Wen, L., Qiao, H.-F., Zhou, W.-X., Zhang, Y.-X., 2005. Interleukin-1 β enhances NMDA receptor-mediated current but inhibits excitatory synaptic transmission. *Brain Res.* 1034, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.11.018>
- Zakrzewski, W., Dobrzyński, M., Szymonowicz, M., Rybak, Z., 2019. Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Res. Ther.* 10, 68. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1165-5>
- Zamponi, G.W., 2016. Targeting voltage-gated calcium channels in neurological and psychiatric diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 15, 19–34. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.5>
- Zhou, C., Tai, C., Ye, H.H., Ren, X., Chen, J.G., Wang, S.-Q., Chai, Z., 2006. Interleukin-1 β downregulates the L-type Ca²⁺ channel activity by depressing the expression of channel protein in cortical neurons. *J. Cell. Physiol.* 206, 799–806. <https://doi.org/10.1002/jcp.20518>

Padėka

Norėčiau nuoširdžiai padėkoti savo baigiamojo darbo vadovui profesoriui dr. Aidui Alaburdai už galimybę atlikti baigiamąjį darbą pas jį, visapusišką pagalbą, patarimus, pamokymus, atsakytus klausimus ir kantrybę. Taip pat norėčiau padėkoti Anastasiia Shelest už pagalbą, pamokymus, patarimus.